Leila Eliza Barbosa Lima

Caracterização dos efeitos moleculares do interferon-gama sobre a produção de melatonina por glândulas pineais de ratos

Characterization of the molecular effects of interferon-gamma on the production of melatonin by rat pineal glands

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

Orientador: Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes Barbosa-Lima, Leila Eliza

Caracterização dos efeitos moleculares do interferon-gama sobre a produção de melatonina por glândulas pineais de ratos (79 páginas)

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

1. Melatonina 2. IFN- γ 3. Eixo Imunepineal

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral, 2015

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

À minha família e amigos,

O escultor da vida

"Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite.

É minha função escolher que tipo de dia terei hoje.

Posso reclamar que está chovendo ou agradecer as águas por levarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício.

Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.

Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido.

Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter um trabalho.

Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a

Deus por ter um teto para morar.

Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a

possibilidade de fazer novas amizades.

Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar

feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está na minha frente, esperando para ser o que eu quiser.

E aqui estou eu, o escultor que pode dar a forma.

Tudo depende de mim."

Charles Chaplin

Agradecimentos

O apoio da minha família e amigos foi imprescindível para a realização deste projeto de pesquisa. Por isso, agradeço aos meus pais o incentivo e amparo incondicional em toda minha trajetória do mestrado e aos meus irmãos, o companheirismo.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Gabriela Kinker, Cláudia Emanuele e Mariana Irino por terem contribuído grandemente para a realização deste trabalho, por terem dividido comigo tantos momentos importantes nesta fase, e por toda estima e apoio.

Aos integrantes do laboratório ou que já fizeram parte dele, Débora, Marco, Letícia, Marina, Michelle, Eliana, Lívia, Priscilla, Renato, Zulma, Paula, Luiza, Sanseray, Vanderlei, Ray, Daiane, Erika, Eduardo e novamente Cláudia e Gabriela, agradeço por toda amizade e colaboração.

Agradeço também à Débora Moura e ao Eduardo Braga por todo auxílio técnico nestes anos e, em especial, à grande amiga, técnica e colaboradora Sandra Muxel, por todo suporte científico.

À minha coorientadora e professora, Regina Markus, agradeço pela recepção em seu grupo de trabalho, pelas aulas, pela colaboração, e por todo conhecimento científico compartilhado ao longo desses anos.

E ao meu orientador, Pedro Fernandes, agradeço pela orientação, pela dedicação, por todo apoio científico, pela amizade, e por todo o aprendizado profissional e pessoal que me proporcionou.

Por fim, e não menos importante, agradeço às agências financiadoras, CAPES e FAPESP (processo 2012/09622-1), indispensáveis para a realização deste projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eixo imune-pineal
Figura 2 - Efeito do IFN-γ sobre a via biossintética de melatonina
Figura 3 - Caracterização do acúmulo nuclear de STAT1 induzido por IFN-γ42
Figura 4 - Caracterização do acúmulo nuclear de NF-κB induzido por IFN-γ44
Figura 5 - Expressão de genes envolvidos com a via JAK/STAT de glândulas pineais estimuladas com IFN-γ
Figura 6 - Quantidade de interações entre a sequência nat-κBp e os fatores de transcrição STAT1 e NF-κB na presença de NA e/ou de IFN-γ49
Figura 7 - Efeito do 2-NP sobre a produção de NAS e melatonina induzidas por IFN-γ na presença de NA
Figura 8 - Efeito do PDTC sobre a potenciação da produção de NAS e melatonina induzida por IFN-γ na presença de NA51
Figura 9 - Modelo do controle da atividade transcricional dos genes <i>Aanat</i> e <i>Hiomt</i> em condições fisiológicas ou na presença do IFN-γ
Figura 10 - O Eixo imune-pineal e o IFN-γ62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modulação da expressão gênica pelo IFN-γ na glândula pineal......47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μΜ	micromolar
2-NP	potenciador da atividade transcricional
5-HT	serotonina
AAAD	descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AA-NAT	arilalquilamina-N-acetil-transferase
AC	adenilato ciclase
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
Ag	prata
AgCl	cloreto de prata
AMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein 1
APCs	células apresentadoras de antígeno
AR	receptores adrenérgicos
BCG	Bacillus Calmette-Gueri
BSA	albumina sérica bovina
С	Celsius
CA	catecolamina
cDNA	DNA complementar
cm ³	centímetro cúbico
CO_2	dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
cpm	centrifugações por minuto
CRE	CREB element
CREB	cAMP response element-binding protein
Ct	threshold cycle
Cxcl9	quimiocina ligante 9

DAMPs	damage-associated molecular pattern
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
EPM	erro padrão da média
Fcer	fragmento de IgE
G	força gravitacional
g	grama
Gapdh	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene
GAS	interferon-gamma activated
GH	hormônio do crescimento
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
Gq	Proteína Gq
Gs	Proteína Gs
h	horas
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIOMT	hidroxindol-O-metiltransferase
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IFNGR	interferon gama receptor
IFNs	interferons
IgGs	imunoglobulinas G
IKK	IκB quinase
IL	interleucina
IML	porção intermédio lateral da medula espinhal
iNOS	sintetase de óxido nítrico induzível
IRF-E	interferon regulatory factor element

IRFs	interferon regulatory factors
ISRE	IFN-stimulated response element
JAK2	Janus quinase 2
JAK3	Janus quinase 3
JAKs	Janus tirosina-quinases
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotássico
Ldha	Lactato desidrogenase (gene)
LPS	lipopolissacarídeo
Μ	molar
m/v	massa/volume
Mg	magnésio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHC I	complexo principal de histocompatibilidade I
MHC II	complexo principal de histocompatibilidade II
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Ν	normal
NA	noradrenalina
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO3	bicarbonato de sódio
NAS	N-acetil-serotonina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	fator nuclear de transcrição kappa B
ng	nanograma
NK	natural killer cells
nm	nanômetro
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
NSQ	núcleos supraquiasmáticos
NTC	no-template control

O_2	oxigênio
р	probabilidade
PAMPS	pathogen-associated molecular pattern
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
P-CREB	CREB fosforilado
PDTC	pirrolidina ditiocarbamato
pН	potencial hidrogeniônico
PIAS	protein inhibitor of activated STATs
РКА	proteína quinase A
PKR	proteína quinase R
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride
PBS	phosphate buffered saline
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RHD	Rel homology domain
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	ribonuclease
ROS	espécies reativas de oxigênio (reactive oxigen species)
S	segundos
s/a	sem anticorpo
SE	sem extrato proteico
SH2	Src Homology 2
SOCs	suppressors of cytokine signaling
STATs	signal transducers and activators of transcription
TAD	domínio de transativação gênica
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TLR4	Toll like receptor 4
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris–HCl	Tris- ácido clorídrico
U	unidade de atividade

V	volts
v/v	volume/volume
AR	receptores adrenérgicos
γ -ATP-P ³²	adenosina trifosfato marcada no grupo fosfato por P^{32}

I. INTRODUÇÃO	13
1. IFN-γ: funções e mecanismos de sinalização	13
2. O IFN-γ no contexto imunoendócrino	15
3. O eixo imune-pineal	16
4. Produção de melatonina: metabolismo e controle circadiano	
5. Fator de transcrição NF-кВ: estrutura e funções	21
II. OBJETIVOS	25
1. Objetivos específicos	25
III. MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Animais	
2. Drogas	
3. Preparo das drogas	
4. Protocolos experimentais	27
5. Cultura de pinealócitos e ensaio de viabilidade celular colorimétrico (MTT)	
6. Cultura de glândulas pineais	
7. Quantificação de indolaminas por HPLC	
8. Extração de RNA e construção de DNA complementar (cDNA)	
9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	
10. Extração de proteínas nucleares	
11. Ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA)	
11.1. EMSA-ensaio de competição	
11.2. EMSA-supershift	
12. qPCR array	35
13. Imunoprecipitação da cromatina (Chip)	
IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA	
V. RESULTADOS	
1. Ο IFN-γ modula a via biossintética de melatonina	
2. Vias intracelulares ativadas por IFN-γ	
3. Expressão de genes envolvidos com a via JAK/STAT de glândulas pineais estimuladas con	n IFN-γ 45
4. IFN-γ e NA modulam a quantidade de interações entre STAT1 e nat-κBp	
5. O STAT1 <i>enhancer</i> potencia a produção de NAS e melatonina induzidas por IFN-γ e/ou p	or NA 49
6. O inibidor de NF-кB suprime a potenciação da produção de NAS e melatonina induzidas na presença de NA	por IFN-γ 50
VI. DISCUSSÃO	
VII. CONCLUSÕES	63
VIII. RESUMO	64
IX. ABSTRACT	65
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS ¹	66
BIOGRAFIA	

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO

1. IFN-y: funções e mecanismos de sinalização

Os interferons (IFNs) são classicamente considerados como citocinas e receberam esse nome originalmente por sua ação de interferir com a replicação viral (ISAACS; LINDERMANN, 1957). Atualmente, outras funções foram descritas para essa família de citocinas, as quais são em geral subdivididas em dois tipos: I e II. Os interferons do tipo I compreendem os subtipos do IFN- α , IFN- β , IFN- ω e IFN- τ , os quais são estruturalmente relacionados e se ligam a um receptor comum, o IFNAR. Os interferons do tipo II compreendem apenas o IFN- γ , o qual se liga ao receptor IFNGR (para revisão, ler SCHRODER et al., 2004).

O interferon do tipo II, o IFN- γ , possui diversas fontes de produção, como linfócitos B, células NK, células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês, *antigen presenting cells*) e linfócitos T, sendo que estes últimos são sua maior fonte de síntese (YOUNG, 1996). No início da montagem da resposta inflamatória (resposta imune inata), o reconhecimento de muitos patógenos pelas APCs induz a secreção de muitas citocinas, como a IL-12 e a IL-18, e quimiocinas, as quais atraem células NK (do inglês, *natural killer*) para o local da inflamação (SALAZAR-MATHER; HAMILTON; BIRON, 2000). A IL-12, juntamente com a IL-18, promovem a produção de IFN- γ pelas células NK e por linfócitos T CD4+, induzindo a diferenciação destes últimos em células CD4+ T *helper cell type* 1 (CD4+Th1) – resposta imune adaptativa (BOEHM et al., 1997; DINARELLO, 1999). Este processo de diferenciação é amplificado por meio da produção ainda maior de IL-12 pelas APCs induzida pelo IFN- γ , o que constitui um circuito de retroalimentação positiva (MUNDER et al., 1998). Paralelamente, o IFN- γ inibe a diferenciação de células T CD4+ naive em T *helper type* 2 por meio da inibição da produção de IL-4 por macrófagos (GAJEWSKI; FITCH, 1988). Desta forma, o IFN- γ está relacionado com a polarização de respostas imunes do tipo Th1.

O IFN-γ sinaliza classicamente por meio da via JAK/STAT, via comum utilizada por mais de 50 citocinas, fatores de crescimento e hormônios por admitir a combinação de diferentes JAKs (do inglês, *Janus tirosina-kinases*, JAK 1-3; Tyk2) e STATs (*signal transducer and activator of transcription*, STAT1-6) (para revisão, SUBRAMANIAM; TORRES; JOHNSON, 2001). A ativação desta via pelo IFN-γ, especificamente, causa uma mudança conformacional em seu receptor heterodimérico IFNGR (duas cadeias de IFNGR1 e duas cadeias de IFNGR2) de forma que as JAKs2, cada uma ancorada na porção intracelular de cada cadeia de IFNGR2, se ativem por autofosforilação. As JAKs2 fosforiladas, por sua vez, ativam as JAKs1, cada uma ancorada na porção intracelular de cada cadeia de IFNGR1, por fosforilação cruzada. As JAKs1 ativadas fosforilam as tirosinas do resíduo 440 de cada cadeia de IFNGR1, promovendo a formação de sítios de ligação para domínios SH2 de STATs1 latentes. Por fim, a fosforilação das STATs (no resíduo Y701 e S727), cada uma acoplada a uma JAK, permite que estas se dimerizem e se dissociem do receptor (para revisão, SCHRODER et al., 2004).

O homodímero STAT1:STAT1 formado migra ao núcleo e se liga a elementos GAS do DNA (do inglês, *interferon-gamma activated sites*), podendo causar inibição ou ativação da transcrição de diferentes genes (DECKER; KOVARIK; MEINKE, 1997; RAMANA et al., 2000). Muitos dos genes regulados positivamente por esta via são codificantes de fatores de transcrição como os IRFs (do inglês, *interferon regulatory factors;* IRF-1, IRF-2 e IRF-9), os quais são capazes de promover uma segunda etapa modulação gênica induzida indiretamente por IFN-γ (KERR; STARK, 1991). Mais raramente, a sinalização do IFN-γ também pode produzir o heterodímero STAT1:STAT2 ou heterotrímeros, como STAT1:STAT1:IRF-9 e STAT1:STAT2:IRF-9 (conhecido como ISGF3) (DARNELL; KERR; STARK, 1994; MATSUMOTO et al., 1999). O IRF-1, o heterotrímero STAT1:STAT1:IRF-9 e o ISGF3 reconhecem elementos ISRE (do inglês, *IFN-stimulated response element*) do DNA, modulando assim a expressão de muitos genes. O IRF-1 também é capaz de reconhecer outro elemento chamado IRF-E/GAS/IRF-E, induzindo a transcrição do RNAm da própria STAT1 (para revisão, SCHRODER et al., 2004).

Outros genes modulados positivamente pelo IFN-γ são aqueles que codificam para famílias de proteínas envolvidas com: apresentação de antígeno de classe I e II (MHC I, MHC II); efeitos antivirais; efeitos antiproliferativos; efeitos pró-apoptóticos; ativação de funções microbicidas, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxigen species*) e óxido nítrico (NO); imunomodulação; e diapedese (para revisão, SCHRODER et al., 2004). Estas funções, em sua maioria, estão envolvidas com a fase pró-inflamatória da resposta imune e, em geral, são decorrentes da ativação da via IFNGR/JAK1,2/STAT1 (para revisão, SCHRODER et al., 2004).

A importância do STAT1 nas respostas inflamatórias contra patógenos foi evidenciada a partir de experimentos com camundongos nocautes para STAT1, os quais apresentaram quadros graves de infecções seguidos por óbito (NAJJAR; FAGARD, 2010). Esta suscetibilidade tem sido atribuída à perda de respostas mediadas pelos dois tipos de interferons (I e II), já que ambos podem ativar STAT1 (DURBIN et al., 1996). No mesmo sentido, pessoas que não expressam STAT1 apresentam baixa resistência a patógenos e morte prematura (NAJJAR; FAGARD, 2010).

Além da ativação da via do STAT1 pelo IFN- γ , estudos com camundongos nocautes para este fator de transcrição demonstraram a existência de mecanismos envolvidos na sinalização do IFN- γ independentes da ativação de STAT1 (RAMANA et al., 2000; RAMANA et al., 2001). Estes efeitos compreendem sinais pró-proliferativos e antiapoptóticos, opostos aos efeitos promovidos pela sinalização do IFN- γ mediada por STAT1 (BROMBERG et al., 1996). Os exatos mecanismos intracelulares envolvidos com estes efeitos, no entanto, ainda não foram esclarecidos. Apesar da pouca informação disponível sobre as vias alternativas de sinalização por IFN- γ , já foi descrita a ativação do fator de transcrição NF- κ B induzida por IFN- γ por mecanismos independentes de STAT1 (DEB et al., 2001). Sabe-se que esta ativação é mediada pela proteína quinase PKR, porém, a relação molecular entre o receptor de IFN- γ e esta quinase ainda não foi determinada (KUMAR et al., 1994, DEB et al., 2001).

Em geral, o fim do sinal do IFN- γ é determinado por mecanismos de regulação negativa em todos os níveis da via, como: internalização do complexo IFN- γ :IFNGR1; expressão de proteínas SOCs (do inglês, *suppressors of cytokine signaling*) induzida por IFN- γ , as quais se associam com JAK1 e 2 e interferem em sua atividade catalítica ou as direcionam para degradação; inativação de STATs ativas (fosforiladas) por meio da interação destas com proteínas nucleares PIAS (do inglês, *protein inhibitor of activated STATs*) constitutivamente expressas; e desfosforilação do receptor, das JAKs e das STATs por ação das fosfatases citosólicas ou nucleares (para revisão, CALÒ et al., 2003; SCHRODER et al., 2004).

2. O IFN-γ no contexto imunoendócrino

Sabe-se que os interferons, além de imunomoduladores, também regulam funções endócrinas. Por este motivo e por sinalizarem por vias comuns a muitos hormônios, já foram considerados hormônios polipeptídicos secretados pelo sistema imune (GROLLMAN et al., 1978). Pesquisas *in vivo*, nas quais foram administradas altas doses de IFN-γ a pacientes com câncer, demonstraram, por exemplo, que a citocina induz um aumento da concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), do cortisol e do hormônio do

crescimento (GH, do inglês, *growth hormone*) após 2h de tratamento (GOLDSTEIN et al., 1987).

O IFN- γ também está envolvido com a estimulação da produção de indolaminas como serotonina (5-HT), N-acetil-serotonina (NAS) e melatonina por monócitos e linfócitos sanguíneos (FINOCCHIARO et al., 1988). Além da capacidade do IFN- γ de modular a via biossintética de melatonina em células imunes, também foram avaliados os efeitos desta citocina sobre esta via na glândula cujo principal hormônio produzido é a melatonina: a glândula pineal. Foi verificado que o IFN- γ potencia a produção de melatonina induzida por isoproterenol (ISO – agonista β -adrenérgico) em glândulas pineais em cultura (WITHYACHUMNARNKUL et al., 1990). Os mecanismos intracelulares envolvidos com as funções hormonais do IFN- γ supracitadas, no entanto, ainda não foram esclarecidos.

Assim como o IFN-γ é capaz de modular funções endócrinas, muitos hormônios são capazes de modular funções do sistema imune. A própria melatonina, em modelos *in vitro*, é capaz de aumentar a atividade de células Th, NK e macrófagos; aumentar a produção de IL-2 e do IFN-γ; e aumentar a expressão do RNAm da IL-1 em monócitos humanos, dentre outras funções (para revisão, CARILLO-VICO et al., 2013). Além disso, a melatonina também está envolvida com a organização circadiana do sistema imune, uma vez que sua produção constitui uma referência importante do relógio biológico (para revisão, SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). A modulação recíproca entre a melatonina e o sistema imunológico constitui um exemplo importante da comunicação bidirecional imune-endócrina, a qual é descrita e detalhada pelo conceito do Eixo Imune-Pineal, apresentado a seguir.

3. O eixo imune-pineal

Em 1997, Lopes e colaboradores verificaram a existência de ritmo circadiano da inflamação granulomatosa experimental dado pela variação da espessura da pata de camundongos inflamados cronicamente com BCG (Bacillus Calmette-Gueri). O ritmo, no entanto, era inexistente quando os animais eram pinealoctomizados, porém retomado com a reposição da melatonina noturna, indicando o papel central deste hormônio na manutenção do ritmo da inflamação. Neste mesmo trabalho, foi avaliada a permeabilidade vascular do tecido inflamado, a qual se mostrou maior durante o dia, o que justifica a variação circadiana da espessura da pata dos camundongos (LOPES et al., 1997).

Trabalhos subsequentes investigaram o papel da melatonina no controle da permeabilidade vascular e inicialmente demonstraram que concentrações endógenas de melatonina são capazes de inibir o rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação de ratos saudáveis enquanto que concentrações endógenas de N-acetil-serotonina, precursora direta da melatonina, é capaz de inibir apenas a adesão leucocitária (LOTUFO et al., 2001). Estudos posteriores *in vitro* sugerem que estas ações da melatonina endógena são resultantes da inibição da expressão de moléculas de adesão e da iNOS (sintetase de óxido nítrico induzível), mediada pela redução do acúmulo nuclear do fator de transcrição NF-κB em células endoteliais em cultura (TAMURA et al., 2009; MARÇOLA et al., 2012).

Em modelos inflamatórios, a melatonina aumenta a permeabilidade vascular e inibe a hiperadesividade de células endoteliais em cultura induzidas por leucotrieno B4, sugerindo uma redução da habilidade de interação entre o endotélio e os neutrófilos da microcirculação na presença da melatonina (LOTUFO et al., 2006). Além disso, esta indolamina também inibe a produção de NO induzida por bradicinina e por LPS através da inibição da produção de GMPc e da translocação nuclear do NF-κB, respectivamente (TAMURA; SILVA; MARKUS, 2006; SILVA et al., 2007; TAMURA et al., 2009). A indolamina N-acetil-serotonina apresenta o mesmo efeito de inibir a produção de NO induzida por bradição de NO induzida por SILVA; MARKUS, 2006; SILVA et al., 2007; TAMURA et al., 2009). A indolamina (TAMURA; SILVA; MARKUS, SILVA; MARKUS, 2006).

Na direção oposta, muitos agentes inflamatórios são capazes de modular a produção de melatonina. Foi verificado que grandes concentrações da citocina TNF (fator de necrose tumoral), são capazes de inibir a produção de melatonina induzida por NA tanto em modelos *in vivo* como *in vitro* (FERNANDES et al., 2006; PONTES et al., 2006; PONTES et al., 2007) e que este efeito é mediado pela ativação da via do NF- κ B (CARVALHO-SOUSA et al., 2011). Além disso, sabe-se que o principal componente da membrana de bactérias gramnegativas, o lipopolissacarídeo (LPS), sinaliza via receptores TLR4 (do inglês, *toll like receptor 4*) na glândula pineal e inibe a produção de melatonina induzida por NA também por meio da ativação da via do NF- κ B (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010). Nesse mesmo sentido, nosso grupo de trabalho também demonstrou a participação desta via na inibição da produção de melatonina por glândulas pineais em cultura promovida por peptídeos β-amiloides (CECON et al., 2015), reforçando assim a importância do NF- κ B na modulação do sistema melatonérgico por diferentes PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*) e DAMPs (do inglês, *damage-associated molecular pattern*) envolvidos em quadros inflamatórios infecciosos ou não.

Simultaneamente à ação dos sinais inflamatórios iniciais sobre a glândula pineal, os glicocorticoides são produzidos em resposta à injúria pela ativação do eixo HPA (hipotálamopituitária-adrenal) e também modulam a produção de melatonina pela glândula. Nosso grupo de trabalho demonstrou que os glicocorticoides apresentam um efeito dual sobre a síntese de melatonina (FERNANDES et al., submetido). No começo de uma resposta imunológica, a ativação de receptores de glicocorticoides inibe a produção de melatonina, no entanto, durante a fase resolutiva da resposta inflamatória, podem potenciar a produção da melatonina por meio da inibição da via do NF- κ B (FERREIRA et al., 2005; COUTO-MORAES et al., 2009; FERNANDES et al., 2009).

Interessantemente, os mesmos sinais pró-inflamatórios que inibem a produção central de melatonina pela glândula pineal (LPS e TNF), estimulam a produção de melatonina por células imunocompetentes. Foi verificado que bactérias *Escherichia coli* ou zimozan (componente antigênico de fungos) induzem a produção de melatonina por macrófagos de colostro humano *in vitro*, efeito mediado pela ativação da via do NF- κ B (PONTES et al., 2006; PIRES-LAPA et al., 2013). A melatonina produzida localmente, por sua vez, atua autócrina e paracrinamente aumentando a atividade fagocítica destas células imunes (MUXEL et al., 2012; PIRES-LAPA et al., 2013). Considerando que o IFN- γ também é capaz de induzir a síntese de melatonina por células imunocompetentes, estes dados em conjunto sugerem que a montagem de respostas inflamatórias agudas envolve um transiente deslocamento da fonte central de melatonina (glândula pineal) para fontes periféricas (células imunocompetentes) e que, conforme o quadro vai sendo resolvido, uma compensação entre mediadores pró- e anti-inflamatórios restaura a produção noturna de melatonina, reestabelecendo as condições de higidez (Fig. 1, retirada de MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013).

4. Produção de melatonina: metabolismo e controle circadiano

O aminoácido triptofano é o precursor de todas as 5-metoxindolaminas produzidas pela glândula pineal. Este aminoácido, captado da circulação, é inicialmente convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) no interior das mitocôndrias, processo catalisado pela enzima triptofano hidroxilase. O 5-HTP é, em seguida, convertido em serotonina (5-HT) por meio a ação de uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAAD). A partir desta etapa, a serotonina pode ser substrato para diferentes enzimas, como a arilalquilamina-N-acetil-transferase (AA-NAT) que catalisa a conversão da 5-HT à N-acetil-serotonina (NAS), a qual

é convertida finalmente em melatonina por ação da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (para revisão, SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

O controle da produção circadiana da melatonina pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ – o relógio biológico de mamíferos) tem sido estudado mais frequentemente em roedores (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). Em ratos, a informação luminosa é captada na retina por células ganglionares especializadas por meio do pigmento fotorreceptor melanopsina (PROVENCIO et al., 2000) e transmitida aos NSQ. Estes, por sua vez, inibem a estimulação da porção do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) via neurotransmissão gabaérgica, impedindo que o sinal seja propagado. Na ausência de luz e com o fim do sinal gabaérgico, o PVN é estimulado, o sinal é transmitido para a porção intermédio lateral da medula espinhal (IML) e consecutivamente para a glândula pineal, permitindo que a melatonina seja sintetizada (MOORE, 1996). O principal neurotransmissor envolvido nas sinapses entre o IML e a glândula pineal é a noradrenalina (NA) (KAPPERS, 1960).

A liberação noturna de NA é 100 vezes maior que a diurna (DRIJFHOUT et al., 1996b) e é capaz de sinalizar por meio de 3 tipos diferentes de receptores adrenérgicos (AR) presentes na pineal: β_1 -AR, α_1 -AR e α_2 -AR (para revisão, SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). O receptor β_1 -AR é o mais abundante na membrana dos pinealócitos e exibe ritmo diário, sendo que sua maior densidade é encontrada na transição claro/escuro (ROMERO; AXELROD, 1974; PANGER; PANGER; REITER, 1990). Este receptor é do tipo GPCR e sinaliza via Gs na presença da NA noturna, cuja transdução do sinal envolve a produção do AMPc via adenilato ciclase (AC), ativação da PKA e fosforilação do fator de transcrição CREB (STRADA et al., 1972; KLEIN, 1985). Este fator fosforilado (P-CREB) se liga a elementos CRE do genoma e aumentam a expressão de genes que codificam para as enzimas da via biossintética da melatonina, dentre outras proteínas (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

Dentre os genes modulados por P-CREB na glândula pineal, sabe-se o gene *Aanat* é um importante alvo de regulação deste fator, já que os níveis do RNAm e da proteína AA-NAT aumentam drasticamente durante a noite em roedores (BORJIGIN; WANG; SNYDER, 1995; ROSEBOOM et al., 1996; GARIDOU et al., 2001). A ativação dos β_1 -AR neste período também promove a fosforilação da AA-NAT pela PKA, possibilitando sua ligação com a chaperona 14-3-3 e a consecutiva ativação e estabilização desta enzima (KLEIN, 1985; GANGULY et al., 2001, GANGULY; COON; KLEIN, 2002). A maior expressão e ativação da enzima na fase do escuro determinam o pico de melatonina noturna. Portanto, na fase do claro, devido aos baixos níveis de expressão e atividade da enzima AA-NAT, a etapa de

conversão de 5-HT em NAS é a etapa limitante. Em contrapartida, a estimulação noradrenérgica causa uma grande liberação de NAS *in vivo* e *in vitro* MIGUEZ; SIMONNEAUX; PE'VET, 1997; AZEKAWA et al., 1991), indicando que a conversão de NAS em melatonina pela enzima HIOMT é a etapa limitante na fase do escuro (LIU; BORJIGIN, 2005).

Apesar da produção de melatonina ser fortemente suprimida pelo antagonista do β_1 -AR, o propranolol (DEGUCHI; AXEROLD, 1972b), o aumento máximo de cAMP intracelular só é alcançado quando os α_1 -AR são ativados simultaneamente (VANECEK et al., 1985). Estes receptores, do tipo GPCR, sinalizam via Gq e o *crosstalk* de sua via de transdução com a via Gs dos β_1 -AR na presença da NA noturna é que permite que o aumento adicional de AMPc intracelular ocorra (VANECEK et al., 1985). Acredita-se que a liberação do Ca⁺² intracelular induzida por ativação dos α_1 -AR ative PKCa⁺²/CaM, as quais, por sua vez, aumentam a atividade da AC (SUGDEN; KLEIN, 1988). Já os α_2 -AR, em menor quantidade na pineal, também modulam a atividade de AA-NAT, porém indiretamente via GMPc (VENKATARAMAN; DUDA; SHARMA, 1998).

Uma vez ativado, em geral, o P-CREB induz a expressão de fatores de transcrição como: subunidades do AP-1 (do inglês, *activator protein 1*), como c-fos, c-jun, junB, junD, NGFI-A e Fra-2; genes do relógio; fatores de transcrição específicos da pineal e retina (sítios PIRE); enzimas da via de biossíntese de melatonina; e do fator ICER, o qual compete por sítios CRE e controla negativamente a ação do fator P-CREB (STEHLE et al., 1993). A ação do fator CREB, no entanto, é especialmente estudada no controle transcricional do gene *Aanat*, uma vez que este codifica para a enzima chave para a produção de melatonina noturna pela pineal.

Sabe-se que apenas a ligação do P-CREB à *Aanat* não é suficiente para promover a máxima expressão noturna do gene (BALER; COVINGTON; KLEIN, 1999). Acredita-se que a indução noturna de sua expressão é resultado da ativação de mais de um elemento regulatório, como o sítio AP-1 e o sítio CCAAT invertido presente na região promotora de *Aanat* (natCCAAT) (CARTER, 1994; BALER et al., 1997; BALER; COVINGTON; KLEIN, 1999). Além destes sítios, o gene *Aanat* apresenta um elemento similar ao CRE (com diferença de uma base) chamado natCRE; elemento E-box, que admite ligação com proteínas do relógio (CHEN; BALER, 2000); e sítio PIRE (LI et al., 1998).

Dado o papel central do NF-κB no controle da produção de melatonina por diferentes agentes inflamatórios, nosso grupo de trabalho também descreveu sítios de ligação para este fator de transcrição no promotor do gene *Aanat* (MARKUS et al., 2007; MUXEL et al.,

2012). Muxel et al. (2012) observaram que a expressão induzida por LPS de um gene repórter associado a uma sequência do promotor de *Aanat* (nat- κ Bp; -151/-9), contendo 1 sítio de ligação ao NF- κ B, era reprimida na presença de um inibidor de NF- κ B (PDTC), indicando a importância deste elemento regulatório para produção de melatonina induzida por LPS em macrófagos (MUXEL et al., 2012).

Considerando que a expressão do gene *Aanat* constitui a etapa chave para produção de melatonina noturna em ratos e que a HIOMT é a enzima limitante para produção desta indolamina na fase do escuro, aumentos adicionais na expressão ou atividade da HIOMT são capazes de aumentar a produção de melatonina noturna. Já foi demostrado por estudos *in vitro* que a atividade da HIOMT pode ser aumentada quando glândulas pineais em cultura são estimuladas com corticosterona (FERNANDES et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre o controle transcricional e traducional da expressão de *Hiomt*. Em humanos, sabe-se que o promotor deste gene apresenta sítios CRE, AP-1 e PIRE (RODRIGUEZ et al., 1994; LI et al., 1998). Portanto, é possível que os mesmos fatores estejam regulando a expressão de *Hiomt* em ratos, além de outros ainda não descritos.

5. Fator de transcrição NF-ĸB: estrutura e funções

O fator de transcrição NF-κB está envolvido com diversas funções celulares, sendo que sua participação nos processos inflamatórios é a mais bem conhecida (para revisão, GHOSH; HAYDEN, 2008). Em geral, a montagem da resposta inflamatória consiste na ativação de programas transcricionais envolvendo o NF-κB, o qual induz a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, moléculas microbicidas e fatores de sobrevivência de leucócitos, dentre outras ações (HAYDEN; WEST; GHOSH, 2006).

Nos vertebrados, este fator de transcrição é encontrado na forma de homo- ou heterodímeros a partir da combinação das seguintes subunidades p50, p52, c-Rel, RelA (ou p65) e RelB, codificadas pelos genes *NfkB1*, *NfkB2*, *Rel*, *Rela* e *Relb*, respectivamente (GILMORE, 2006). Todas as subunidades apresentam um domínio de homologia da família Rel (RHD) responsável pela ligação ao DNA, dimerização e localização nuclear (HUXFORD; MALEK; GHOSH, 1999). Além do domínio RHD, algumas subunidades podem apresentar o domínio de transativação gênica (TAD) no caso, RelA, c-Rel e RelB (para revisão, GHOSH; HAYDEN, 2008). Estas subunidades, quando presentes no dímero, regulam positivamente a transcrição gênica, enquanto que, as subunidades p50 e p52, por não apresentarem o domínio TAD, estão associadas com repressão gênica (para revisão, GHOSH; HAYDEN, 2008).

Dímeros que contenham pelo menos uma subunidade com o domínio TAD são capazes de ativar a transcrição gênica (BAER et al., 1998).

No citoplasma, os dímeros de NF- κ B se encontram geralmente associados a proteínas do tipo I κ B (SCHEIDEREIT, 2006). Quando a via do NF- κ B é ativada, o I κ B é fosforilado pelo complexo I κ B quinase ativado (IKK) e posteriormente degradado por proteassomas. O dímero de NF- κ B, livre, migra para o núcleo e modula a expressão gênica por meio de interações com sequências κ B do DNA (para revisão, HOFFMANN; NATOLI; GHOSH, 2006).

Assim como para o NF- κ B, sabe-se que a família de proteínas IKK e I κ B também é diversa. O complexo IKK consiste em duas subunidades homólogas de quinases, IKK α e IKK β , e uma subunidade regulatória, a IKK γ (ou NEMO). A via de ativação canônica do NF- κ B envolve atividade da IKK β , cujos principais alvos são: I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ (HACKER; KARIN, 2006; SCHEIDEREIT, 2006). As vias de ativação não-canônicas envolvem diversas outras combinações, como ativação da IKK α , a qual processa a proteína p100 a subunidades p52 (SENFTLEBEN et al., 2001); ou ativação de outros componentes da família I κ B envolvidas com modulação direta da expressão gênica (p100, p105, BCL-3, I κ BNS e I κ B ζ) (para revisão, GHOSH; HAYDEN, 2008).

A ativação da via canônica envolve a liberação dos dímeros formados pelas subunidades p50 e ou RelA, em geral constitutivamente expressos (PHELPS et al., 2000a,b). No entanto, a expressão relativa de subunidades do NF-κB, assim como as diferentes maquinarias de IKK e IκB utilizadas, dependem intrinsicamente do tipo celular, tipo de estímulo e histórico de diferenciação (para revisão, HOFFMANN; NATOLI; GHOSH, 2006).

O fim da via de transdução do NF- κ B envolve mecanismos de regulação negativa em diferentes níveis intracelulares. Um dos principais mecanismos de regulação da atividade do NF- κ B é a ressíntese de proteínas I κ B, as quais previnem a ligação dos dímeros ao DNA e o acúmulo nuclear destes (PHELPS et al., 2000a). Além disso, existem proteínas reguladoras como a SOCS1 e PIAS1 nucleares que interrompem a modulação gênica por RelA e c-Rel por associação direta ao DNA ou por ubiquitinação e consecutiva degradação (para revisão, GHOSH; HAYDEN, 2008). A IKK α também pode inibir diretamente a atividade de RelA, uma vez que esta quinase é capaz de migrar para o núcleo e fosforilar esta subunidade, promovendo sua ubiquitinação e degradação (LAWRENCE et al., 2005).

No contexto do eixo imune-pineal, foi observado que o NF-κB é expresso constitutivamente na glândula e que o acúmulo nuclear deste fator se dá de forma rítmica (CECON et al., 2010). A concentração de p50:p50 no núcleo aumenta ao longo do dia e decai

abruptamente no começo da noite (apesar de existir uma concentração basal de p50 nesta condição – CECON et al., 2010) por mecanismos que parecem ser dependentes do pico de corticosterona endógena (DA SILVEIRA CRUZ MACHADO, submetido). Deste modo, acredita-se que estes homodímeros, desprovidos de TAD, reprimem a transcrição de *Aanat* contribuindo assim para a inibição da síntese de melatonina na fase do claro. Já na fase do escuro, o estímulo noradrenérgico e a baixa taxa de translocação nuclear de NF-κB permitiria que o gene *Aanat* fosse transcrito e que a melatonina fosse sintetizada. Portanto, além do CREB, sugere-se que o NF-κB também participe do controle circadiano da produção de melatonina (CECON et al., 2010).

Na presença do TNF e/ou do LPS, no entanto, a produção de melatonina noturna é inibida através da ativação da via do NF- κ B (CARVALHO-SOUSA et al., 2011; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010; FERNANDES et al., 2006). A ativação desta via por estes agentes pró-inflamatórios induzem a translocação nuclear de dímeros p50:p50 em quantidades capazes de reprimir a transcrição de *Aanat* e de inibir a produção de melatonina induzida por NA. Por outro lado, perifericamente, os mesmos estímulos induzem a produção de melatonina por macrófagos por meio da ativação da via do NF- κ B, especificamente das subunidades RelA e c-Rel, ativadoras de transcrição gênica (MUXEL et al., 2012).

Sabe-se que, assim como o NF- κ B, o STAT1 apresenta um papel chave na montagem e resolução de respostas inflamatórias, e que o IFN- γ é capaz de ativar ambos fatores de transcrição. Além disso, o NF- κ B possui um papel chave na modulação da produção de melatonina no contexto inflamatório por meio da modulação da expressão de *Aanat*. Portanto, tendo em vista o efeito modulador do IFN- γ sobre a síntese hormonal da pineal, hipotetizou-se que **o IFN-\gamma sinaliza via STAT1 e via NF-\kappaB na glândula pineal, promovendo um aumento da produção de NAS e melatonina induzida por noradrenalina.**



Retirado de MARKUS et al., 2013

Figura 1 - Eixo imune-pineal. A glândula pineal, além de ser um importante fototransdutor neuroendócrino em mamíferos, também participa ativamente da montagem e resolução de respostas inflamatórias. No início de um processo inflamatório, DAMPS e PAMPS, como o TNF e o LPS, ativam a via do NF-κB na glândula pineal inibindo a produção de melatonina. Esta inibição aumenta a permeabilidade vascular dos leucócitos para os locais de injúria. Os mesmos fatores inflamatórios estimulam a produção de melatonina pelos leucócitos pela ativação da via do NF-κB e, a melatonina produzida localmente, atua autócrina e paracrinamente aumentando a atividade fagocítica destas células imunes. Portanto, a montagem de respostas inflamatórias agudas envolve um transiente deslocamento da fonte central de melatonina (glândula pineal) para fontes periféricas (células imunocompetentes) e, conforme o quadro vai sendo resolvido, uma compensação entre mediadores pró- e anti-inflamatórios (como a corticosterona) restaura a produção noturna de melatonina, reestabelecendo as condições de higidez.

II. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi compreender os mecanismos de sinalização envolvidos na modulação da produção de NAS e melatonina promovida pelo IFN- γ em glândulas pineais de ratos. Em especial, avaliamos a participação das vias do NF- κ B e do STAT1 na modulação da produção destas indolaminas, bem como na modulação da expressão dos genes *Aanat* e *Hiomt* promovidas pelo IFN- γ . Dessa forma, visamos ampliar o entendimento dos mecanismos de regulação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imune e, portanto, contribuir para a caracterização do conceito do Eixo Imune-Pineal.

1. Objetivos específicos

1.1. Produção de NAS e melatonina modulada por IFN-y

Avaliar a modulação da produção de NAS e melatonina, bem como da expressão dos genes *Aanat* e *Hiomt* promovida pelo IFN-γ na presença de NA em glândulas pineais de ratos.

1.2. Análise da expressão de genes envolvidos com a via JAK/STAT de glândulas pineais estimuladas com IFN- γ

Caracterizar de forma geral a ação do IFN-γ sobre a expressão de genes relacionados com a via JAK/STAT de glândulas pineais de ratos.

1.3. Participação das vias do STAT1 e do NF-κB na potenciação da produção de NAS e melatonina

Caracterizar e avaliar temporalmente os fatores de transcrição STAT1 e NF- κ B translocados ao núcleo na presença do IFN- γ . Avaliar a quantidade de interações entre a sequência nat- κ Bp da região promotora de *Aanat* e o fator de transcrição NF- κ B ou STAT1. E determinar a participação das respectivas vias de sinalização na produção de NAS e melatonina modulada pelo IFN- γ por meio do uso de um inibidor de NF- κ B, o PDTC, ou de um potenciador da atividade transcriçional do STAT1, o 2-NP, respectivamente.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Ratos adultos da linhagem Wistar (2-3 meses; 200-250 g) foram mantidos em ciclo claro escuro 12:12h (o acender das luzes às 06h00 correspondente ao *zeitgeber time* zero ou ZT0) com água e comida *ad libitum* no biotério do Departamento de Fisiologia Geral (IB-USP, São Paulo, Brasil). A eutanásia dos animais foi realizada por decapitação entre o ZT9 e o ZT10. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo (protocolo 165/2012).

2. Drogas

HEPES, tripsina, inibidor de tripsina, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio), poli-L-lisina, glicose (dextrose), L-glutamina, glicerol, DTT. penicillina/estreptomicina, noradrenalina (NA), pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), Tris-HCl, albumina sérica bovina (BSA) e EDTA dissódico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ácido ascórbico, ácido bórico, ácido perclórico, 2-NP (STAT1 enhancer), acetato de sódio, metanol, cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂), cloreto de sódio (NaCl), NP-40, ácido cítrico, TRIzol[®], ácido ascórbico, clorofórmio, isopropanol e etanol foram fornecidos pela Merk (Darmstadt, Alemanha). Meio BGJb, meio DMEM, Trypan Blue, PMSF e SYBR Green máster mix® foram obtidos da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Acrilamida foi adquirida da Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EUA). Poly(dI-dC) e [γ -32P]-ATP foram fornecidos pela GE Healthcare (Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK). O metabissulfito de sódio e fosfato monopotássico (KH2PO4) foi adquirido da Reagen (Quimibrás, Indústrias Químicas S/A, RJ - Brasil). O dimetilsulfóxido (DMSO) e o bicarbonato de sódio (NaHCO3) foram obtidos da Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil).

3. Preparo das drogas

O IFN- γ foi inicialmente diluído em PBS acrescido de 1mM de DTT e 0,1% de BSA e em seguida aliquotado na concentração de 200 µg/mL (estoque). A mesma solução sem a citocina foi aliquotada e utilizada como veículo nos grupos controles. Para a realização dos protocolos experimentais, foi realizada diluição do IFN- γ -estoque ou do veículo em meio BGJb, de forma que a concentração da citocina quando adicionada ao meio de cultura das glândulas fosse de 0, 30 ou 100 ng/mL. A NA foi preparada à 10 mM em 0,01N de HCL (estoque) e, para realização dos protocolos experimentais, foi realizada diluição do veículo ou da NA-estoque em 5 mg/mL de ácido ascórbico de forma que a concentração de NA quando adicionada ao meio de cultura das glândulas fosse de 0 ou 10 nM. O PDTC foi preparado na concentração de 100 mM em meio BGJb e, para a realização dos protocolos experimentais, foi realizada diluição do veículo ou do PDTC-estoque de forma que a concentração da droga quando adicionada ao meio de cultura das glândulas fosse de 0 ou 25 µM. A droga 2-NP foi inicialmente preparada a 45mM em DMSO e, para realização dos protocolos experimentais, foi realizada diluição do veículo ou do 2-NP-estoque de forma que a concentração da droga quando adicionada ao meio de cultura das pineais fosse de 0 ou 50µM.

4. Protocolos experimentais

Inicialmente foi avaliada por MTT a viabilidade celular das glândulas pineais na presença do IFN- γ 30 e 100 ng/mL por diferentes períodos (1, 2, 4 e 6h). A viabilidade celular dos pinealócitos não foi afetada pela citocina nos períodos e nas concentrações de citocina analisados. O perfil de produção de NAS e melatonina induzidas por NA na presença de IFN- γ foi obtido por HPLC a partir de glândulas pineais incubadas ou não com duas diferentes concentrações de IFN- γ (30 ou 100 ng/mL) por 30 min seguidos pela incubação de 5h de NA 10 nM (ainda na presença da citocina ou do veículo). A modulação da expressão dos genes codificantes para as enzimas AA-NAT e HIOMT promovida pelo IFN- γ foi avaliada por qPCR a partir de glândulas estimuladas com IFN- γ 30 ou 100 ng/mL, ou com o veículo por 30 min, seguidos por 30 min de NA 10 nM ou com seu respectivo veículo. O perfil de modulação temporal das vias do STAT1 e do NF- κ B por IFN- γ foi avaliado por EMSA a partir de glândulas pineais em cultura estimuladas com IFN- γ 30 ou 100 ng/mL, ou com o veículo por veículo por períodos crescentes (0-60 min). A caracterização dos complexos DNA-STAT1 formados no EMSA a partir de glândulas estimuladas estimuladas com IFN- γ 100 ng/mL por 60 min foi

realizada por meio de supershift e ensaio de competição. A composição de subunidades de NF-kB (p50, p52, p65 e cRel) e de STAT1 (total ou fosforilada) acumuladas no núcleo de glândulas pineais estimuladas com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min foi avaliada por EMSAsupershift. A caracterização da ação global do IFN-y sobre a expressão de genes relacionados com a via JAK/STAT foi realizada por qPCR a partir de glândulas pineais estimuladas ou não com IFN-γ 10, 30 ou 100 ng/mL nos tempos de 30 ou 60 min. A análise das interações entre a sequência nat-κBp da região promotora de *Aanat* e o fator de transcrição STAT1 ou NF-κB foi realizada por Chip a partir de glândulas pineais em cultura estimuladas ou não com IFN-y 100 ng/mL por 30 min, seguidos por 30 min de NA 10 nM ou veículo. A participação da via do STAT1 na modulação da produção de NAS e melatonina foi avaliada por HPLC a partir de pineais em cultura incubadas ou não com 2-NP 50 µM por 60 min, seguidos por 30 min de IFN-y 30 ng/mL e mais 5h de NA 10 nM (ainda na presença das drogas ou dos respectivos veículos). A participação da via do NF-kB na modulação de NAS e melatonina promovida por IFN-y foi avaliada por HPLC a partir de glândulas pineais em cultura incubadas ou não com PDTC 25 μM por 30 min, seguidos por 30 min de IFN-γ 100 ng/mL e mais 5h de NA 10 nM (ainda na presença das drogas ou dos respectivos veículos). A modulação da expressão de Aanat e Hiomt promovida pelo IFN- γ foi avaliada por qPCR a partir de glândulas estimuladas ou não com IFN- γ 30 ng/mL por 30 min, seguidos por 30 min de NA ou veículo.

5. Cultura de pinealócitos e ensaio de viabilidade celular colorimétrico (MTT)

Glândulas pineais recém coletadas foram processadas em solução tampão (mM: NaCl 120; KCl 5; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; glicose 12 e 0,1 % m/v albumina bovina) para o isolamento dos pinealócitos por dissociação enzimática com tripsina (15 min, 0,25% m/v, 37°C) (FERREIRA et al., 2003). Este processo de dissociação foi interrompido inibidor de tripsina (0,3 % m/v) na mesma solução tampão. Após a dispersão, a solução final foi centrifugada (15 min, 1000 g, temperatura ambiente) e as células foram ressuspensas em meio DMEM (suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL). A viabilidade celular e o número total de células foram estimados pelo método de exclusão de Trypan Blue. Em seguida, as células foram cultivadas (0,5 x 10⁵/poço) em placa de 96 poços pré-tratados com poli-L-lisina (50 mg/mL, 1h em temperatura ambiente, seguida por lavagem com PBS).

As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C por 18 horas e submetidas aos tratamentos com IFN-γ 30 ou 100 ng/mL por períodos crescentes (1, 2, 4 ou 6h). Em seguida, avaliou-se a viabilidade dos pinealócitos com base no método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Segundo o método, a viabilidade celular é avaliada de forma indireta, com base na redução do MTT solúvel à formazan (insolúvel, cor roxa) por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Para isso, após os tratamentos com IFN-γ ou veículo, foi adicionado 100 mL por poço de MTT (0,5 mg/mL) e a placa foi mantida por 4 h em estufa umidificada a 37°C. O conteúdo de formazan formado foi determinado após solubilização dos cristais com DMSO por meio da leitura da absorbância em 570 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). Subtrai-se dos valores obtidos a absorbância do *background* em 690 nm.

6. Cultura de glândulas pineais

As glândulas pineais de ratos foram dissecadas e incubadas por 48h (37°C, 95% O_2 , 5% CO_2) em meio BGJb enriquecido com 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicillina, e 10 µg/mL de estreptomicina (pH 7,4) e foram cultivadas em placa de cultura de 24 poços (1 glândula em 200 µL de meio por poço), como descrito por Ferreira et al. (1994). A cultura de 48h permite a degeneração de elementos pré-sinápticos e a completa desnervação da glândula (o meio de cultura foi renovado a cada 24h) (PARFITT; WELLER; KLEIN, 1976).

7. Quantificação de indolaminas por HPLC

Após os tratamentos, as indolaminas presentes nos meios de cultura foram extraídas com metanol através de colunas C18 RP. 1 cm3 /100 (IBL, Hamburg - Alemanha). Em seguida, os extratos foram liofilizados e ressuspendidos em solução de ácido perclórico 0,1 M acrescida de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA dissódico. A concentração de NAS e melatonina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se um sistema de detecção eletroquímico (FERREIRA; CIPOLLA-NETO; MARKUS, 1994). Resumidamente, 20 µL da solução final de cada amostra foi injetada no sistema cromatográfico Shimadzu (Kyoto, Japan), o qual foi isocraticamente operado. A fase móvel era composta por 0,1 M de acetato de sódio, 0,1 M de ácido cítrico, 0,15 de mM EDTA, e metanol (10% para detecção de NAS ou 30% para detecção de melatonina) (pH

3,7). A taxa de fluxo da fase móvel era de 0,5 mL/min através de uma coluna de fase reversa Resolve C18 de 5-μm (150 X 3,9 mm i.d., Waters). O potencial do detector foi ajustado para +0,90 V (eletrodo de referência Ag/AgCl).

8. Extração de RNA e construção de DNA complementar (cDNA)

Realizados os protocolos experimentais, a extração de RNA total das glândulas pineais foi realizada seguindo o método TRIzol[®]. Em resumo, cada glândula foi homogeneizada com uso de pistilo em microtubo de plástico de 1,5 mL com TRIzol[®] e, em seguida, foi adicionado clorofórmio à solução (16% final, v/v). Os tubos foram vortexados por 25 segundos e, após 3 min em temperatura ambiente, foram centrifugados a 12000 g, 4°C por 15 min. A fase aquosa contendo o RNA solubilizado foi transferida para outro tubo, no qual foi adicionado 500 μ L de isopropanol, que permite a precipitação do RNA. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 1h e, ao fim deste período, foram centrifugados a 12000 g, 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 75% previamente à centrifugação a 7500 g, 4°C por 5 min (2x). Após a lavagem, o excesso de etanol foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em água livre de RNAse.

Devido à pouca quantidade de RNA obtida por glândula, todo o RNA (8 μ L) foi tratado com 1 μ L de DNAase (1U/ μ L) e 1 μ L de solução tampão (DNAse I Reaction Buffer 10x), conforme as especificações do fabricante (Invitrogen-Life Technologies, CA – EUA). A concentração do RNA foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

Após a quantificação, foi adicionado 1µL de *primers* randômicos (1µg/mL) e 1µL de mix de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP, 10mM) a 500 ng de RNA de cada pineal num volume final de 14 µL. Os tubos foram incubados a 65°C por 5 min e, ao fim deste período, foram colocados em gelo por 3 min. Em seguida, sintetizou-se o DNA complementar (cDNA) a partir da adição de 1 µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript III, 200 U/µL), 1 µL de DTT (0,1M) e 4 µL de tampão (PCR buffer 5x) à cada tubo, de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen-Life Technologies, CA – EUA). O cDNA foi estocado a -20 °C até a realização do qPCR.

9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Na etapa do qPCR, o cDNA correspondente aos genes de *Aanat* e *Hiomt* foi amplificado utilizando-se **SYBR Green master mix**[®] a partir dos *primers: Aanat, foward:* 5'- agcgcgaagcctttatctca-3', *reverse:* 5'-aagtgccggatctcatccaa-3'; *Hiomt*, *foward:* 5'- agcgcctgctgttcatgag-3', *reverse:* 5'-ggaagcgtgagaggtcaaagg-3'. As reações de amplificação foram realizadas com 5 μ L de cDNA, com 200 nM de cada primer e SYBR Green master mix (Applied Biosystems – Life Technologies, CA – EUA) num volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada no equipamento iQ5 (Bio-Rad Laboratories, CA - EUA) e o método consistiu nas seguintes etapas: ciclo 1 (95°C, 10 min), ciclo 2, 40 x (95°C, 15s + 60°C, 1 min), ciclo 3 (95°C, 1 min + 55°C, 1 min), e ciclo 4 (*melting curve*).

A especificidade da reação de amplificação foi determinada com base na análise das curvas de dissociação (*melting curvers*), realizada após o término dos ciclos de PCR. Em todos os ensaios de qPCR analisados foi verificada a boa qualidade da extração de RNA e de amplificação de cDNA, empregando-se controles negativos contendo apenas água (*no-template control*, NTC) ou extratos de RNA que não foram incubados com a transcriptase reversa.

A expressão de *Aanat* e *Hiomt* foi quantificada relativamente à expressão do gene constitutivo *Gapdh*, codificante da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, cujos *primers* utilizados foram: *foward*, 5'-ttcttgtgcagtgccagcc-3', *reverse*, 5'-gtaaccaggcgtccgatacg-3'.

Determinou-se a expressão relativa de *Aanat* e *Hiomt* com base nos valores de *threshold cycle* (Ct), empregando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foi obtida a diferença entre o Ct do gene alvo e a média dos Cts do gene de referência *Gapdh* (Δ Ct) e, em seguida, calculou-se a diferença entre cada Δ Ct e a média dos Δ Cts de glândulas pineais naives (não-estimuladas) ($\Delta\Delta$ Ct).

10. Extração de proteínas nucleares

A extração de proteínas nucleares foi realizada conforme protocolo descrito por Ferreira e colaboradores (2005). Em resumo, as glândulas pineais foram homogeneizadas em solução tampão de lise (10 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM KCl; 0,1mM EDTA; 10% (v/v) glicerol; 1mM DTT; 0,1 mM PMSF), e o homogenato foi tratado com NP-40 (10%, v/v; 15 min a 4°C). As amostras foram vortexadas por 10s, centrifugadas (12000g, 1 min, 4°C), e o sobrenadante, descartado. Em seguida, cada *pellet* foi ressuspendido novamente em tampão de lise, centrifugado (12000g, 1 min, 4°C), e o sobrenadante novamente descartado. Os novos *pellets*, contendo os núcleos celulares, foram incubados com tampão de extração nuclear (10 mM HEPES; 500 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF) por 15 min em gelo e centrifugados (20000g, 5 min, 4°C); os sobrenadantes, contendo as proteínas nucleares, foram coletados. A concentração de proteínas nucleares foi quantificada a 280 nm por meio do espectrômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) e as amostras foram estocadas a -80°C para posterior realização do ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA).

11. Ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA)

O perfil temporal do acúmulo nuclear de NF-κB foi avaliado por EMSA a partir de extratos nucleares de acordo com o protocolo descrito por Ferreira e colaboradores (2005). Em resumo, uma quantidade igual de proteínas/pineal (5 µg) foi incubada num volume final de 15 µL em tampão de ligação (10 mM Tris-HCl pH 1,5; 1 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 4% glicerol; 1 µg poli-dIdC) por 20 min em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente com aproximadamente 35000 cpm de uma sequência consenso de oligonucleotídeo de ligação ao NF-κB (5'-agttgaggggactttcccaggc-3'; sc-2505, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) marcado com γ-ATP-P³² (atividade específica de 3000 Ci/mmol). Os complexos formados entre o oligo marcado e proteínas foram aplicados num gel não-desnaturante de poliacrilamida (6%, v/v; 150V, 1h30 min, tampão Tris/borato-EDTA). Cada gel foi secado a vácuo e exposto a um filme XAR-5 Kodak (Rochester, NY, USA) por 72h a – 80°C.

Paralelamente, padronizamos a realização de EMSA para STAT1 na glândula pineal e avaliamos o perfil temporal do acúmulo nuclear deste fator de transcrição. Para isso, utilizouse uma quantidade igual de proteínas/pineal (12 µg), a qual foi incubada num volume final de 15 µL do mesmo tampão de ligação citado acima por 20 min em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente com aproximadamente 45000 cpm de uma sequência consenso de oligonucleotídeo de ligação ao STAT1 (5'-catgttatgcatattcctgtaagtg-3'; sc-2573, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) marcado com γ -ATP-P³² (atividade específica de 3000 Ci/mmol). Os complexos formados entre o oligo marcado e proteínas foram aplicados num gel não-desnaturante de poliacrilamida (6%, v/v; 150V, 1h30 min, tampão Tris/ácido bórico/EDTA). Cada gel foi secado a vácuo e exposto a um filme XAR-5 Kodak (Rochester, NY, EUA) por 10 dias a – 80°C.

A revelação dos filmes foi realizada por imersão em solução reveladora por 5 min (Kodak, Rochester, NY, EUA) seguida por imersão em solução fixadora por 10 min (Kodak, Rochester, NY, EUA). A densidade óptica das bandas formadas foi quantificada através do programa ImageJ Software e normalizadas pela quantidade basal de proteínas nucelares (0 ou 5 min, dependendo do complexo). Foi verificada a boa qualidade de todos os ensaios empregando-se controles negativos contendo apenas água (sem extrato proteico – SE).

Ressalta-se que o protocolo para identificação de STAT1 nuclear de glândulas pineais por meio da técnica de EMSA foi protocolado pela primeira vez no presente projeto.

11.1. EMSA-ensaio de competição

Afim de se verificar o padrão de afinidade dos complexos formados entre a sonda radioativa e as proteínas nucleares STAT1, foi realizado um EMSA de competição. Para isso, um *pool* de proteínas nucleares oriundas de 3-4 glândulas, estimuladas com IFN- γ (100 ng/mL, 30 min), foi aliquotado em 4 tubos (12 µg/ensaio) e incubado com o tampão de ligação por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, as alíquotas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente com aproximadamente 45000 cpm da sequência consenso de oligonucleotídeo de ligação ao STAT1 (citada anteriormente) marcado com γ -ATP-P³² (atividade específica de 3000 Ci/mmol) na presença ou não do mesmo oligo não-marcado (sonda fria) 10, 30 ou 100x em excesso (ensaio de competição). Em seguida, foi dado o prosseguimento do EMSA como descrito anteriormente. O grupo controle se refere a proteínas de pineais estimuladas, porém não-incubadas com sonda fria.

Foi verificada a boa qualidade de todos os ensaios empregando-se controles negativos contendo apenas água (sem extrato proteico – SE).

11.2. EMSA-supershift

Para identificação das subunidades do NF-κB, um *pool* de proteínas nucleares oriundas de 3-4 glândulas, estimuladas com IFN- γ (100 ng/mL, 30 min), foi aliquotado em 5 microtubos (5 µg/ensaio) e incubado com o tampão de ligação por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, as alíquotas foram incubadas ou não com 2 µL (200 µg/0,1 mL) de anticorpos policionais (*rabbit*) específicos para cada subunidade de NF-κB analisada: anti-

p50, anti-p52, anti-RelA e anti-cRel (sc-114x, sc-298x, sc-109x e sc-70x, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 45 min à temperatura ambiente. A partir daí, foi dado o prosseguimento do EMSA como descrito anteriormente e o reconhecimento das proteínas dos complexos pelos anticorpos pôde ser realizado pela mudança da mobilidade das bandas – *supershifts*- ou por seu desaparecimento parcial. Neste último caso, o complexo formado apresenta um tamanho maior que a malha de poliacrilamida, por isso a banda não se forma. A densidade óptica dos complexos formados foi quantificada por meio do programa ImageJ.

A caracterização dos complexos formados entre DNA-STAT1 foi complementada com uma análise da identidade das proteínas complexadas. Para isso, foi realizado um ensaio de EMSA-*supershift* a partir de um *pool* de proteínas nucleares oriundas de 3-4 glândulas estimuladas com IFN- γ (100 ng/mL, 30 min). O *pool* foi aliquotado em 3 tubos (12 µg/ensaio) e incubados com o tampão de ligação por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, os ensaios foram realizados com o uso ou não de 3µL do anticorpo anti-STAT1 (200 µg/0,1 mL, policional *rabbit*) ou 3µL do controle negativo anti-STAT3 (200 µg/0,1 mL, policional *rabbit*) (sc-592x e sc-7179x, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 45 min à temperatura ambiente.

Adicionalmente, realizou-se outro EMSA-*supershift* para a identificação do STAT1 nuclear (total ou fosforilado) a partir de um *pool* de proteínas nucleares (12 µg/ensaio) oriundas de 3-4 glândulas, estimuladas com IFN- γ (100 ng/mL, 30 min). O *pool* foi aliquotado em 3 tubos (12 µg/ensaio) e incubado com o tampão de ligação por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, as alíquotas foram incubadas ou não com 3µL de anticorpo anti-STAT1 total (200 µg/0,1 mL, policional *rabbit*) ou 3µL de anti-pSTAT1 (200 µg/0,1 mL, monocional *mouse*) (sc-592x e sc-8394x, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 45 min à temperatura ambiente. A partir daí, foi dado o prosseguimento do EMSA como descrito anteriormente e o reconhecimento das proteínas dos complexos pelos anticorpos pôde ser realizado pela mudança da mobilidade das bandas – *supershifts* - ou pelo seu desaparecimento parcial. A densidade óptica das bandas destes ensaios foi quantificada e representada por curvas (*plots*) geradas a partir do software ImageJ.

O grupo controle dos experimentos de *supershift* se refere a proteínas de pineais estimuladas, porém não-incubadas com anticorpos, e a boa qualidade de todos os ensaios foi verificada empregando-se controles negativos contendo apenas água (sem extrato proteico – SE).

12. qPCR array

A expressão dos genes relacionados com a via JAK/STAT foi determinada pelo kit comercial de microarranjo (*array*) de PCR: *JAK STAT Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array rat* (CAT: PARN-039A, Qiagen, SABioscience, MD - EUA). Para isso, o RNA total das glândulas pineais foi extraído e convertido em cDNA (conforme protocolos descritos anteriormente), o qual foi utilizado no qPCR, conforme instruções do fabricante, no aparelho iQ5 (Bio-Rad Laboratories, CA – EUA).

Cada placa de *array* fornecida pelo fabricante continha 96 poços, cada qual contendo pares de *primers* específicos para 1 gene fixados em sua base. Destes 96 poços, 84 correspondem a genes relacionados com a via JAK/STAT; dos 12 restantes, 5 poços correspondem a genes constitutivos (*Actb, B2m, Hprt1, Ldha, Rplp1*), 1 ao controle do DNA genômico, 3 aos controles da transcriptase reversa, e 3 a controles positivos do PCR.

A expressão dos genes foi quantificada relativamente à expressão dos genes B2m e Ldha, codificantes da microglobulina- β 2 e da enzima lactato desidrogenase, respectivamente. Apenas estes dois genes foram selecionados como referência para a análise pois tiveram sua expressão relativamente inalterada entre os grupos experimentais. Foi realizado o qPCR com 1 animal por placa (3 animais por grupo experimental), com exceção dos controles, cuja expressão gênica foi avaliada a partir de uma placa com um *pool* de cDNA de 3 glândulas. Após a realização do qPCR de todas as placas, calculou-se a média entre os Cts para cada grupo experimental (AvgCt) e a diferença entre o AvgCt de cada gene e a média dos Cts dos genes constitutivos (valor final = Δ Ct). Em seguida, foi obtida a diferença entre cada Δ Ct e a média dos ΔCts dos genes referentes aos animais controles ($\Delta \Delta Ct$). Por fim, através da formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram gerados os valores que indicam a variação da expressão entre os grupos (fold-change) (Tab. 1). Adicionalmente, a expressão gênica foi representada por gráficos do tipo xy (ScatterPlot) que relacionam o log na base 10 do valor $2^{-\Delta Ct}$ do grupo controle e o log na base 10 do valor 2^{-ΔCt} de cada grupo experimental. Os valores que representam expressão gênica maior ou igual a 2 vezes a do controle (*fold change* ≥ 2) são apresentados em verde; e aqueles que se referem à expressão gênica igual a 0,5 vezes a do controle ou ainda menor (fold change ≤ 0.5), são apresentados em vermelho. Devido à complexidade das análises, estas foram obtidas por meoi do software RT Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 disponibilizado pela Qiagen (SABioscience, MD – EUA).

Em todos os ensaios de qPCR analisados foi verificada a boa qualidade da extração de RNA e de amplificação de cDNA, conforme os valores obtidos dos controles negativos contendo apenas água (*no-template control*, NTC), ou extratos de RNA que não foram incubados com a transcriptase reversa.

13. Imunoprecipitação da cromatina (Chip)

A análise da quantidade de interações entre a sequência nat-kBp contida na região promotora de Aanat e o fator de transcrição NF-kB ou STAT1 foi realizada por meio do ensaio de imunoprecipitação de cromatina seguido por qPCR. A etapa de imunoprecipitação foi realizada a partir do kit comercial Pierce® Agarose ChiP Assay (Thermo Scientific, Waltham, MA - EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, imediatamente após os tratamentos, as glândulas pineais foram fixadas com 1% de formaldeído (v/v em PBS) por 15 min em temperatura ambiente, processo que favorece a formação de ligações covalentes (crosslink) entre os fatores de transcrição e a cromatina. Esta fixação foi neutralizada com glicina (v/v em PBS) por 10 min à temperatura ambiente e, em seguida, as glândulas foram lavadas com PBS gelado, colocadas em Solução de Lise (Thermo Scientific) e homogeneizadas com pistilo. Em seguida, seguiu-se o protocolo de extração de proteínas nucleares a partir de soluções comerciais prontas do kit (Chromatin Prep Module). Os extratos nucleares (100 μ L) foram incubados com 0,2 μ L de nuclease Microccocal (10 U/ μ L) (Thermo Scientific) por 15 min a 37°C, para clivagem parcial do DNA genômico (tamanhos entre 100-1000pb). A clivagem foi bloqueada com MNase Stop Solution por 5 min em gelo. Após centrifugação, coletamos os sobrenadantes (complexos proteína-cromatina) dos extratos nucleares e os reunimos em pools (formados por 2 ou 4 glândulas). Reservamos 10% do extrato nuclear (input) para normalização dos dados obtidos na amplificação em qPCR e o volume correspondente a 90% do extrato nuclear foi utilizado para os ensaios de imunoprecipitação, descritos a seguir.

Os extratos nucleares foram incubados com 10 µg dos anticorpos policionais (*rabbit*) anti-p50 (sc-114x), anti-RelA (sc-109x), anti-cRel (sc-70x) e anti-STAT1 (sc-592x), oriundos da Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA. Após a incubação, os complexos formados pela ligação entre anticorpo/proteína/DNA foram imunoprecipitados em *ChIP Grade Protein A/G Plus Agarose* (Thermo Scientific) a 4°C sob agitação constante por 1 h. Os complexos foram lavados (complexos proteína/DNA ou DNA livre são descartados) e aqueles formados por anticorpo/proteína/DNA foram eluídos com *ChIP Elution Buffer* (Thermo Scientific).
Para clivagem das proteínas ligadas ao DNA nas amostras imunoprecipitadas e no *input*, as alíquotas foram tratadas com 40 µg de Proteinase K (20mg/mL) (Thermo Scientific) por 1,5h a 65°C. Em seguida, o DNA foi purificado a partir de colunas e reagentes (*DNA Clean-Up Column and Reagents* - Thermo Scientific) e amplificado por qPCR (a seguir).

Na etapa do qPCR, a sequência nucleotídica amplificada corresponde à sequência nat- κ Bp da região promotora de *Aanat* (Genbank–NC_005109, *Rattus novergicus*), citada na introdução. As reações de amplificação foram realizadas com 5µL de cada amostra (*input* ou coimunprecipitado) com 200 nM de cada primer e *SYBR Green master mix* para um volume final de 25µL. A sequência dos *primers* utilizados nas reações são: *foward* (-151/-131) 5'tcctcagtaccaccgatgac-3'; *reverse* (-29/-9) 5'-acagcatgtgatggctcaga-3'. O método de amplificação consistiu em 1 ciclo 10 min a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguidos por 30 segundos a 63°C e 30 ciclos de 30 segundos a 72°C em Termociclador ExicyclerTM96 (Bioneer). A quantificação absoluta do conteúdo de DNA foi realizada a partir de uma curva padrão correspondente a uma diluição em série de dez vezes de um plasmídeo linearizado contendo uma quantidade conhecida de DNA a ser amplificado. A quantidade absoluta de moléculas de DNA inicialmente presente em cada alíquota imunoprecipitada foi normalizada pela quantidade de moléculas do *input*.

IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média para cada grupo amostral. Na análise de populações amostrais com distribuição normal, empregou-se o teste "t" de Student na comparação entre dois grupos independentes, e a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, no caso de três ou mais grupos independentes. Na análise de populações amostrais que não passaram no teste de normalidade (D'Agostino-Pearson), empregou-se o teste de Mann-Whitney na comparação entre dois grupos independentes, e o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, na comparação entre três ou mais grupos independentes. Assumiu-se um nível de significância de 5% (p < 0,05). A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0.

V. RESULTADOS

1. O IFN-γ modula a via biossintética de melatonina

Os efeitos da citocina IFN- γ sobre a via biossintética de melatonina (Fig. 3A) foram avaliados estudando-se a produção de NAS e de melatonina e a expressão das enzimas envolvidas em sua biossíntese em glândulas pineais em cultura. Para isso, pineais em cultura foram incubadas ou não com duas concentrações de IFN- γ (30 ou 100 ng/mL) por 30 minutos, seguidos pela estimulação com NA 10 nM por mais 5h (ainda na presença do IFN- γ ou do veículo). Finalizado o tratamento, as concentrações de NAS e de melatonina no meio de cultura das glândulas foram quantificadas por HPLC e os valores são apresentados na figura 2B. A partir dos dados obtidos, pode-se verificar que apenas a concentração de 100 ng/mL de IFN- γ potencia significantemente a produção de NAS (p < 0,05) enquanto que ambas as concentrações da citocina potenciam a produção desta indolamina e o IFN- γ 100 ng/mL aumentou significativamente esta produção cerca de 50% (p < 0,05).

Para análise da expressão de *Aanat* e *Hiomt* por qPCR, glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com IFN- γ 100 ng/mL por 30 min e por mais 30 min com NA 10 nM (ainda na presença da citocina ou do veículo). Analisando-se os resultados, verificamos que o IFN- γ 100 ng/mL induziu um aumento significativo na expressão de *Aanat* (p < 0,05) e de *Hiomt* (p < 0,05) em relação ao controle (NA 30 min), sendo este aumento cerca de 2,5x e 1,3x, respectivamente (Fig. 2C).



Figura 2 - Efeito do IFN- γ **sobre a via biossintética de melatonina. A)** Esquema da via biossintética de melatonina incluindo os substratos e as enzimas da via, localizadas acima das setas. **B)** Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com IFN- γ (30 ou 100 ng/mL) por 30 min e, em seguida, foram incubadas com NA 10 nM por mais 5 h (ainda na presença do IFN- γ ou do veículo). A concentração de N-acetil-serotonina (esquerda) e de melatonina (direita) no meio de cultura das glândulas foi quantificada por HPLC. Os valores representam a média ± EPM e são expressos em ng/mL; N =5-8 glândulas por ponto experimental (3 experimentos independentes). C) Glândulas pineais em cultura estimuladas ou não com IFN- γ 30 ou 100 ng/mL por 30 min foram incubadas com NA 10 nM por mais 30 min ainda na presença da citocina ou do veículo. A expressão de *Aanat* (esquerda) e de *Hiomt* (direita) foi quantificada por qPCR empregando-se o *Gapdh* como gene de referência e o grupo controle não-estimulado como calibrador (linha tracejada preta). Dados representam a média ± EPM; N = 8-12 glândulas por ponto experimental (4 experimentos independentes). * p < 0,05 vs. o grupo controle (barras brancas).

2. Vias intracelulares ativadas por IFN-γ

A modulação das vias do STAT1 e do NF- κ B pelo IFN- γ , possivelmente envolvidas na potenciação da produção de NAS e melatonina observada no item anterior, foi avaliada por meio do perfil temporal de translocação nuclear destes fatores de transcrição, bem como da caracterização das subunidades migradas na presença do IFN- γ .

2.1. Via do STAT: O IFN-y induz a translocação nuclear de STAT1

O perfil de modulação temporal da via do STAT1 por IFN- γ foi avaliado por EMSA a partir de glândulas pineais em cultura incubadas ou não com 30 ou 100 ng/mL de IFN- γ por diferentes períodos de tempo (5, 15, 30, ou 60 min). A partir deste ensaio, pôde-se observar a formação de complexos (C) de DNA-proteína (Fig.3A), dos quais se observou que as proteínas envolvidas com a formação do C1 não estão presentes no núcleo celular em glândulas não-estimuladas mas, há um grande aumento após 5 min de incubação com ambas as concentrações de IFN- γ . Devido à ausência de marcação no grupo controle, a quantificação da densidade óptica do C1 de diferentes autorradiografias obtidas foi normalizada a partir da densidade óptica verificada no tempo de 5 min (Fig. 3B). Analisando-se os dados obtidos para C1, observamos uma tendência de aumento adicional de STAT1 nuclear em 15 min de estimulação com IFN- γ 30 ng/mL em relação ao grupo IFN- γ 30 ng/mL/5 min, o qual retorna aos níveis iniciais a partir de 30 min de estimulação. Já na presença de IFN- γ 100 ng/mL, observa-se uma tendência maior de acúmulo da proteína a partir de 15 min de estimulação, o qual se mantém elevado até o tempo de 60 min (aprox. 35% de aumento) (Fig. 3B).

Dando continuidade à caracterização dos complexos formados, os que apresentam maior afinidade de ligação são C3 e C4, já que no ensaio de competição, altas concentrações da sonda fria (100x em excesso) não foram capazes de deslocar totalmente a sonda marcada (Fig. 3C). O C1 que apresentou variação após tratamento com IFN- γ foi totalmente deslocado pelo ensaio de competição. Na sequência, foi realizado um ensaio de EMSA-*supershift* (Fig. 3D). Este ensaio revelou a especificidade do C1, já que a banda desaparece na presença de anticorpo anti-STAT1, o que não ocorre na presença do controle negativo (anticorpo anti-STAT3). Os complexos C3 e C4 aparentemente não sofreram nenhum tipo de mudança de mobilidade no gel na presença destes anticorpos e não tiveram sua alteração alterada pelo tratamento com IFN- γ (Fig. 3D). O C2 não pôde ser detectado em todas as amostras no EMSA e, portanto, não foi possível caracterizar este complexo de forma satisfatória.

A fim de se avaliar se o STAT1 acumulado no núcleo correspondia a proteínas fosforiladas ou não, glândulas pineais em cultura foram estimuladas com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min e um *pool* de seu conteúdo de proteínas nucleares foi utilizado para realização de EMSA-*supershift* com o uso de anticorpos específicos para STAT1 total ou fosforilado. Foi observado um *supershift* apenas para os complexos de C1, por esse motivo, a autorradiografia apresenta apenas essas bandas. A densidade óptica de C1 apresentado na autorradiografia da figura 3E foi representada por curvas geradas pelo programa ImageJ (Gel Analyzer). Nesta

representação, o *supershift* pode ser verificado pela redução da área abaixo da curva. Analisando-se os dados obtidos, verificamos um *supershift* na presença de ambos anticorpos, sendo que o uso do anticorpo para STAT1 total causou total desaparecimento da banda (a densidade óptica observada corresponde apenas ao *background* do filme). Já o uso do anticorpo anti-pSTAT1 causou um desaparecimento parcial do complexo (cerca de 30,2% de redução) (Fig. 3E).



Figura 3 - Caracterização do acúmulo nuclear de STAT1 induzido por IFN-γ. **A**) Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com IFN-γ 30 (esquerda) ou 100 ng/mL (direita) por períodos crescentes (5-60 min) e seu conteúdo nuclear de STAT1 foi determinado por EMSA. Cada coluna representa um animal. **B**) Quantificação da densidade óptica do complexo C1 do grupo do IFN-γ 30 ng/mL (linha preta) e do IFN-γ 100 ng/mL (linha laranja). Os valores foram normalizados a partir do grupo 5 min para ambas concentrações de IFN-γ. Dados representam a média ± EPM; N = 3-6 glândulas por ponto experimental (2 experimentos independentes). **C**) Ensaio de competição: glândulas pineais em cultura foram incubadas com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min e o *pool* de proteínas nucleares destes animais foi utilizado para determinação do conteúdo nuclear de STAT1 por EMSA na presença ou não da sonda de STAT1 não-marcada (fria) 10, 30 ou 100x em excesso. **D**) Glândulas pineais em cultura foram incubadas com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min e a especificidade das proteínas STAT1 foi avaliada por EMSA a partir do uso de anticorpos anti-STAT1 ou do controle negativo, anticorpos anti-STAT3. **E**) Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min e o conteúdo nuclear de forám incubadas de gradina por EMSA a partir do uso de anticorpos anti-STAT3. **E**) Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min e o conteúdo nuclear de STAT1 total e fosforilado foi aferido por EMSA a partir do uso dos respectivos anticorpos (IgGs). Cada complexo foi obtido a partir de proteínas de um *pool* de 3-4 glândulas; SE = sem extrato proteico; s/a = sem anticorpo; Oligo (STAT1)-P³² = sonda radioativa; * p < 0,05 vs. o grupo controle.

2.2. Via do NF-κB: O IFN-γ induz a translocação nuclear de NF-κB, majoritariamente da subunidade RelA

O perfil de modulação temporal da via do NF-κB por IFN-γ foi avaliado por EMSA a partir de glândulas pineais em cultura incubadas ou não com 30 ou 100 ng/mL de IFN-γ por diferentes períodos de tempo (5, 15, 30, ou 60 min). A partir da análise das autorradiografias obtidas, é possível observar a formação de 3 complexos de DNA-NF-κB (Fig. 4A). Quantificando-se a densidade óptica dos três complexos (% relativa ao controle – figura 4B), observa-se um aumento transitório do acúmulo nuclear de NF-κB, o qual atinge seu máximo no tempo de 30 minutos de incubação com IFN-γ 30 e 100 ng/mL para os três complexos (aprox. C1= 2x, C2= 2x e C3= 1,35x de aumento em relação ao grupo controle). A única exceção a este perfil é o C1 correspondente ao tratamento com IFN-γ 100 ng/mL, o qual apresenta acúmulo proteico crescente até o tempo de 60 min. Neste tempo, este acúmulo é significantemente maior que o controle (aprox. 2,3x o controle; p < 0,05) e que o acúmulo verificado no mesmo tempo de tratamento com IFN-γ 30 ng/mL (p < 0,05) (Fig. 4B).

A fim de se identificar as subunidades de NF- κ B envolvidos na ativação da via, glândulas pineais em cultura foram incubadas com 100 ng/mL de IFN- γ por 30 min e seus extratos de proteínas nucleares foram utilizados para determinação dos níveis de NF- κ B por EMSA *supershift* com o uso de anticorpos específicos para: p50, p52, RelA e cRel. A densidade óptica dos complexos apresentados na autorradiografia da figura 4C foi representada por curvas geradas pelo programa ImageJ (Gel Analyzer). Nesta representação, o *supershift* pode ser verificado pela redução da área abaixo da curva. A partir dos dados obtidos, verificamos um *supershift* parcial (de 31,8%) do C1 na presença do anticorpo antip50, e um *supershift* total de C1 e C2 na presença do anticorpo anti-RelA. Não foi verificado *supershift* nos ensaios com anti-p52 e anti-cRel (Fig. 4C). Estes resultados sugerem que o C1 provavelmente constitui-se por dímeros p50/RelA e outros dímeros contendo RelA. De forma similar podemos afirmar que todos os dímeros presentes em C2 possuem a subunidade RelA, ou seja, tanto C1 quanto C2 possuem dímeros de NF- κ B que controlam positivamente a transcrição gênica.



Figura 4 - Caracterização do acúmulo nuclear de NF-κB induzido por IFN-γ. **A)** Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com IFN-γ 30 (esquerda) ou 100 ng/mL (direita) por tempos crescentes (5-60 min) e seu conteúdo nuclear de NF-κB foi determinado por EMSA. Cada coluna representa um animal. **B**) Quantificação da densidade óptica dos três complexos formados em "A" do grupo IFN-γ 30 ng/mL (linha preta) e do grupo IFN-γ 100 ng/mL (linha azul). Os valores foram normalizados a partir do controle e representam a média ± EPM; N = 5-6 glândulas por ponto experimental (3 experimentos independentes). **C**) Glândulas pineais em cultura foram incubadas com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min e o conteúdo nuclear de NF-κB foi aferido por EMSA. Cada complexo foi obtido a partir de um pool de proteínas de 3-4 glândulas e a composição de subunidades de NF-κB de cada um foi determinado a partir do uso de anticorpos específicos para p50, p52, RelA e cRel. Os *plots* apresentados à direita da autorradiografia correspondem à densidade óptica de cada banda. Os números, expressos em porcentagem, representam valores normalizados a partir do grupo não incubado com anticorpo; SS = banda correspondente ao *supershift*; SE = sem extrato proteico; s/a = sem anticorpo; * p < 0,05. vs. o grupo controle.

3. Expressão de genes envolvidos com a via JAK/STAT de glândulas pineais estimuladas com IFN-γ

A fim de se conhecer de forma geral a ação do IFN- γ sobre a expressão dos genes envolvidos com a sinalização via JAK/STAT na pineal, glândulas em cultura foram estimuladas ou não com IFN- γ (10, 30 ou 100 ng/mL) por 30 ou 60 min e a expressão gênica foi avaliada por qPCR. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão dos genes *B2m* e *Ldha* e calibrada pelo grupo controle (apenas o veículo). Os genes considerados modulados correspondem àqueles com modulação positiva (+) em média maior ou 2 vezes o controle (*fold change* \geq 2; verde) ou àqueles com modulação negativa (-) em média igual a 0,5 vezes o controle ou ainda menor (*fold change* \leq 0,5; vermelho). As mesmas cores, verde e vermelha, foram utilizadas para representar os valores apresentados na tabela 1, correspondente a esta modulação.

Analisando-se os gráficos gerados de *ScatterPlot* representativos da expressão gênica após 30 min de estimulação (Fig. 5A), é possível verificar 6 genes modulados, dos quais: *Ifnar1, Il20, Prl* e *Socs3* (+) e *Irf9* e *Pdgfra* (-) na presença de IFN- γ 10 ng/mL; 7 genes modulados, dos quais: *Cdkn1a, Gata3, Ghr, Ifnar1, Pdgfra* e *Socs3* (+) e *Fcer* (-) na presença de IFN- γ 30 ng/mL; e 5 genes modulados, dos quais: *Gata3, Ghr, Ifnar1* e *Socs3* (+) e *Fcer* (-) na presença de IFN- γ 100 ng/mL. Analisando-se os gráficos gerados para expressão gênica após 60 min de estimulação (Fig. 5B), é possível verificar 6 genes modulados, dos quais: *Cxcl9, Ghr, Il4r, Jak3* e *Socs3* (+) e *Pdgfra* (-) na presença de IFN- γ 10 ng/mL; 13 genes modulados, dos quais: *Cxcl9, Il4r* e *Socs3* (+) e *Cdkn1a, Egfr, Gata3, Gbp1, Ghr, Irf9, Jak2, Pdgfra, Smad1* e *Src* (-) na presença de IFN- γ 30 ng/mL; e 17 genes modulados negativamente (-) na presença de IFN- γ 100 ng/mL: *Akt, Egfr, Fcer, Gbp1, Il10rb, Irf9, Jak2, Jun, Lrg1, NfkB1, Nos2, Pdgfra, Prl, Ptpn11, Smad2, Src* e *Stat5a*. A descrição detalhada dos genes modulados e os valores da taxa de variação (*fold change*) ± EPM são apresentados na tabela 1. Ao todo, dos 84 genes analisados, 27 tiveram sua expressão modulada por IFN- γ .



Figura 5 - Expressão de genes envolvidos com a via JAK/STAT de glândulas pineais estimuladas com IFN- γ . Glândulas pineais em cultura foram estimuladas ou não com IFN- γ (10, 30 ou 100 ng/mL) por 30 (**A**) ou 60 min (**B**) e a expressão de 84 genes relacionados com a via JAK/STAT foi avaliada por qPCR, normalizada pela média da expressão dos genes *B2m* e *Ldha*, e calibrada pelos grupos controles, não-estimulados. A expressão gênica foi representada por gráficos do tipo xy (*ScatterPlot*) que relacionam o log na base 10 do valor $2^{-\Delta Ct}$ do grupo controle e o log na base 10 do valor $2^{-\Delta Ct}$ de cada grupo experimental. Nos gráficos, visualizam-se três linhas teóricas que delimitam uma faixa. Os valores que se aproximam da linha do meio representam pouca ou nenhuma alteração de expressão gênica em relação ao controle; os valores que representam expressão gênica maior ou igual a 2 vezes a do controle (*fold change* \geq 2) situam-se fora da faixa e são apresentados em verde; e aqueles que se referem à expressão gênica igual a 0,5 vezes a do controle ou ainda menor (*fold change* \leq 0,5) também situam-se fora da faixa (abaixo desta) e são apresentados em vermelho. N = 3 animais por grupo experimental tratado com IFN- γ ; 1 pineal por placa de qPCR *array*. Os valores dos controles de cada grupo de experimentos (30 ou 60 min de estimulação) foram obtidos de 1 placa de qPCR a partir de um *pool* de 3 glândulas não-estimuladas

				Média da	taxa de variação	vs. o grupo contre	ole ± EPM		
				30 min			60 min		
N° Gene	Abrev.	Acesso	IFN- γ 10ng/mL	IFN-y 30ng/mL	IFN-y 100ng/mL	IFN-y 10ng/mL	IFN-γ 30ng/mL	IFN-y 100ng/mL	Referência*
2 Oncogene viral de timoma de murino homólogo 1, V-akt	AktI	NM_03230	0.74 ± 0.59	$0,90\pm0.57$	$0,61\pm0,25$	$0,64\pm0,21$	$0,68\pm0,21$	$0,\!26\pm0,\!07$	[KAUR et al., 2008]
5 Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A	Cdknla	NM_080782	$1,17 \pm 0,05$	$2,24 \pm 0,58$	$1,19\pm0.42$	0.67 ± 0.03	$0,40 \pm 0,11$	0.57 ± 0.06	[HARPER et al., 1993]
11 Quimiocina ligante 9 (sequência C-X-C)	Cxcl9	NM_145672	0.96 ± 0.09	0.96 ± 0.23	$1,71\pm0.55$	$2,01 \pm 0,34$	$2,67 \pm 0,41$	$1,75\pm0,54$	[FARBER et al., 1999]
12 Receptor do fator de crescimento epidérmico	Egfr	NM_031507	0.95 ± 0.08	$1,16\pm0,16$	$1,16\pm0.08$	$0,94\pm0,06$	$0,44\pm0,10$	$0,29 \pm 0,19$	[HERBST, 2004]
16 Fragmento de IgE (Fc), baixa afinidade II, receptor para CD23	Fcer2	NM_133550	$1,03\pm1,35$	0.48 ± 0.15	0.45 ± 0.19	$0,77\pm0,36$	$1,22\pm0.85$	$0,46 \pm 0,41$	[HENNINGSSON et al., 2011]
18 Proteína de ligação GATA 3	Gata3	NM_133293	$1,27\pm0,10$	$3,10 \pm 0,85$	$2,19 \pm 0,39$	$0,62\pm0,12$	$0,40\pm0,09$	0.56 ± 0.07	[YAGIR; ZHU; PAUL, 2011]
19 Proteína de ligação guanilato 1, induzível por interferon	GbpI	XM_006224278	$0,85\pm0,33$	$1,13\pm0,34$	0.73 ± 0.07	0.78 ± 0.19	$0,39\pm0,20$	$0,45\pm0,07$	[CHENG; PATTERSON; STAEHELI, 1991]
20 Receptor do hormônio de crescimento	Ghr	NM_017094	0.77 ± 0.26	$2,31 \pm 0,55$	$3,67 \pm 0,47$	$3,88 \pm 3,57$	$0,47\pm0,23$	$1,49 \pm 1,56$	[FRANK et al., 1995]
22 Receptor de interferon (alfa, beta e ômega)	Ifnarl	NM_001105893	$3,56 \pm 0.98$	$3,01 \pm 0.56$	$3,60 \pm 1,60$	$1,59\pm0,43$	$1,51\pm0,06$	$1,07 \pm 0.65$	[NOVICK; COHEN; RUBINSTEIN, 1994]
26 Receptor beta de interleucina 10	1110rb	NM_001107111	$1,47\pm0,20$	$1,00\pm0.20$	$1,81 \pm 0,47$	0.73 ± 0.07	0.74 ± 0.16	$0,36 \pm 0,13$	[MOSSER; ZHANG, 2008]
27 Interleucina 20	1120	NM_001143881	$2,19 \pm 0,64$	$1,61 \pm 0,04$	$1,63\pm0,21$	0.92 ± 0.10	0.65 ± 0.08	0.58 ± 0.07	[RICH; KUPPER, 2006]
31 Receptor alfa de interleucina 4	Il4r	NM_133380	$1,25\pm0,03$	$1,47 \pm 0,19$	$1,76\pm0,34$	$2,57 \pm 0,07$	$2,45 \pm 0,18$	$1,73 \pm 0,46$	[T UNDUP; SRIVAST A VA; HARN, 2012]
35 Fator 9 de regulação de interferon	Irf9	NM_001012041	$0,44\pm0,24$	0.59 ± 0.36	0.57 ± 0.24	$1,35\pm0,11$	$0,35 \pm 0,13$	0.41 ± 0.30	[KERR; STARK, 1991]
38 Janus quinase 2	Jak2	NM_031514	0.92 ± 0.93	$1,57 \pm 0,48$	$1,21\pm0,16$	0.56 ± 0.07	$0,32 \pm 0,09$	0.15 ± 0.07	[CALÓ et al., 2003]
39 Janus quinase 3	Jak3	NM_012855	$1,18 \pm 0,13$	$1,08 \pm 0,20$	$0,85\pm0,22$	$2,02 \pm 0,44$	$1,58\pm0,42$	$0,73 \pm 0,71$	[WITTHUHN ET AL., 1994]
40 Oncogene Jun	Jun	NM_021835	$1,30\pm0,46$	$1,22\pm0,25$	$1,74\pm0,46$	$0,63 \pm 0,11$	0.62 ± 0.06	$0,43\pm0,02$	[WISDOM; JOHNSON; MOORE, 1999]
42 Glicoproteína 1-alfa-2 rica em leucina	Lrg1	NM_001009717	$1,43 \pm 0.62$	$1,56\pm0,15$	$1,14\pm0,10$	$0,90 \pm 0,04$	0.71 ± 0.09	$0,45\pm0,25$	[O'DONNELL; DRUHAN; AVALOS, 2002]
46 Polipeptideo leve do factor nuclear k, gene enhancer em células B1	NJKbI	NM_001276711	$1,31\pm0,10$	0.93 ± 0.08	0.77 ± 0.05	$0,71 \pm 0,11$	0.51 ± 0.13	0.25 ± 0.18	[HEISSMEYER et al., 1999]
47 Sintase 2 de óxido nítrico, induzível	Nos2	NM_012611	0.89 ± 0.17	0.98 ± 0.23	$1,17 \pm 0,13$	$0,78\pm0,12$	0.54 ± 0.07	$0,29 \pm 0,15$	[GELLER et al., 1993]
50 Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta, polipep. alfa	Pdgfra	NM_012802	0.45 ± 0.15	$9,68 \pm 1,40$	$1,69 \pm 1,17$	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,08\pm0,02$	[MAT SUMOTO et al., 2000]
53 Prolactina	Prl	NM_012629	$2,06 \pm 0,13$	$1,29\pm0,20$	$1,40 \pm 0.32$	$1,10 \pm 0,31$	0.99 ± 0.04	$0,50\pm0,38$	[BOLE-FEYSOT et al., 1998]
56 Fosfatase de tirosina, citoplasmática tipo 11	Ptpn11	NM_013088	$1,23\pm0,08$	$1,05 \pm 0,12$	$1,22 \pm 0,13$	$1,13\pm0,14$	$0,64\pm0,14$	$0,35 \pm 0,34$	[FREEMAN; PLUTZKY; NEEL, 1992]
60 Membro 1 da família SMAD	Smad1	NM_013130	$1,31 \pm 0,26$	$0,89\pm0,24$	0.90 ± 0.26	$1,19 \pm 0,11$	$0,45\pm0,07$	$0,61 \pm 0,23$	[HOODLESS et al., 1996]
61 M embro 2 da família SMAD	Smad2	NM_019191	$1,23\pm0,42$	$1,72 \pm 0.18$	$1,37\pm0,49$	$0,68\pm0,21$	0.77 ± 0.07	$0,14\pm0,22$	[EPPERT et al., 1996]
67 Supressor 3 da sinalização de citocina	Socs3	NM_053565	$2,55 \pm 0,32$	$3,01 \pm 0,35$	$3,15 \pm 0,61$	$5,65 \pm 1,03$	$4,15 \pm 1,03$	$1,86 \pm 2,38$	[CALÓ et al., 2003]
72 Oncogene viral de sarcoma (Schmidt-Ruppin A2) homólogo aviário	Src	NM_031977	0.94 ± 0.07	$0,94 \pm 0,09$	$1,00\pm0.14$	0.85 ± 0.05	$0,\!41\pm0,\!09$	$0,32\pm0,20$	[WHEELER; ILDA; DUNN, 2009]
78 Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5A	Stat5a	NM_017064	0.96 ± 0.13	0.92 ± 1.4	$1,08\pm0.17$	0.95 ± 0.05	$0,64\pm0,26$	$0,24 \pm 0,36$	[HOU et al., 1995]

Tabela 1 - Modulação da expressão gênica pelo IFN- γ na glândula pineal.

Dados do acesso aos genes foram retirados do banco de dados Genbank da National Center for Biotechnology Information (NCBI) *Nota: as referências se referem às proteínas codificadas.

4. IFN-γ e NA modulam a quantidade de interações entre STAT1 e nat-κBp

A fim de determinar se o gene *Aanat* é potencialmente um alvo de modulação pelos fatores de transcrição NF- κ B e STAT1 ativados pelo IFN- γ , avaliamos por Chip a quantidade de interações entre estes fatores e a sequência nat- κ Bp. Para isso, glândulas pineais em cultura foram estimuladas ou não com IFN- γ 100 ng/mL por 30 min e, em seguida, incubadas ou não com NA 10 nM por mais 30 min (ainda na presença da citocina ou dos veículos).

Para identificação das subunidades complexadas com o DNA foi realizado o protocolo de Chip com o uso dos anticorpos: anti-STAT1, anti-p50, anti-RelA ou anti-cRel. A partir dos resultados obtidos normalizados pelo input (DNA correspondente a 10% da cromatina total, não imunoprecipitada), pudemos observar que a estimulação com IFN-γ ou NA tendeu a aumentar a quantidade de interações entre STAT1 e nat-kBp em relação ao controle (glândulas não-estimuladas) (Fig. 6A), e que a presença de ambos estímulos simultaneamente tendeu a promover um aumento ainda maior desta quantidade Em relação às subunidades do NF- κ B, houve uma tendência de redução da quantidade de interações entre de p50 à nat- κ Bp com os tratamentos com NA (30 min de estimulação) ou com IFN-γ (30 min de estimulação) em relação ao controle (ausência de estimulação) (Fig. 6B). Porém, na presença de ambos os estímulos, esta quantidade se tornou maior que a observada com os tratamentos individuais e compatível com o controle. Já a quantidade de interações entre RelA e nat-kBp se mostrou reduzida nos tratamentos (NA) e (IFN- γ + NA) em relação ao tratamento apenas com IFN- γ , sendo nesta última compatível com a do controle. Por fim, a quantidade de interações entre cRel e nat-kBp diminuiu cerca de 2,5x em todos os tratamentos em relação ao controle (Fig. 6B).



Figura 6 - Quantidade de interações entre a sequência nat-κBp e os fatores de transcrição STAT1 e NF-κB na presença de NA e/ou de IFN-γ. Glândulas pineais em cultura foram estimuladas ou não com IFN-γ 100 ng/mL por 30 min seguidos ou não pela incubação com NA 10 nM por mais 30 min (ainda na presença do IFN-γ ou dos veículos). Em seguida, foi realizado o protocolo de Chip com o uso de anticorpos para STAT1 (A) ou para as subunidades do NF-κB (B), anti-p50, anti-RelA e anti-cRel. A quantidade absoluta de moléculas de DNA proveniente de cada imunoprecipitação foi obtida por qPCR e normalizada pela quantidade de moléculas do *input*. Os valores, expressos em %, representam a média \pm EPM. Tanto o *input* quanto a cromatina precipitada foram obtidos a partir de um pool de 2-4 glândulas; N = 3 experimentos independentes para análise de STAT1; N = 1 experimento para análise de NF-κB.

5. O STAT1 *enhancer* potencia a produção de NAS e melatonina induzidas por IFN-γ e/ou por NA

A fim de se avaliar a participação da via do STAT1 na produção de NAS e melatonina induzida por IFN- γ na presença da NA, glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com uma droga ativadora da atividade transcricional do STAT1, o 2-NP 50 µM, por 1h, seguida pelo tratamento ou não com IFN- γ 30 ng/mL por 30 minutos e com NA 10 nM por mais 5h (ainda na presença das drogas ou dos respectivos veículos). Finalizado o tratamento, as concentrações de NAS e de melatonina no meio de cultura das glândulas foram quantificadas por HPLC e os valores são apresentados na figura 7. Analisando-se os resultados obtidos, verificou-se que glândulas estimuladas com 2-NP e NA apresentam produção de NAS e melatonina significantemente maior que do controle (NA) (aprox. 10x de aumento, p = 0,0004; e aprox. 1,55x de aumento, p = 0,034, respectivamente). A estimulação tripla (2-NP, IFN- γ e NA) também induziu um aumento significante na produção de NAS (p = 0,0154), aumento este compatível com o verificado na presença de 2-NP e NA. A produção de melatonina induzida pela estimulação tripla apresentou uma tendência de aumento em relação ao controle, aumento este menor que o verificado entre o controle e o grupo (2-NP + NA).



Figura 7 - Efeito do 2-NP sobre a produção de NAS e melatonina induzidas por IFN- γ **na presença de NA.** Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com 2-NP por 1h e, em seguida, com IFN- γ 30 ng/mL ou com o veículo por 30 min. Ainda na presença das drogas, as glândulas foram estimuladas com NA 10 nM por mais 5h. A concentração de NAS (esquerda) e de melatonina (direita) no meio de cultura das glândulas foi quantificada por HPLC. Os valores representam a média ± EPM e são expressos em ng/mL; N = 5-8 glândulas por ponto experimental (2 experimentos independentes).

6. O inibidor de NF- κ B suprime a potenciação da produção de NAS e melatonina induzidas por IFN- γ na presença de NA

A fim de se avaliar a participação da via do NF- κ B na potenciação da produção de NAS e melatonina induzida por IFN- γ na presença de NA, glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com um inibidor do NF- κ B, o PDTC, na concentração de 25 μ M por 30 min, seguidos pelo tratamento ou não com IFN- γ 100 ng/mL por 30 minutos e com NA 10 nM por mais 5h (ainda na presença das drogas ou dos respectivos veículos). Finalizado o tratamento, as concentrações de NAS e de melatonina no meio de cultura das glândulas foram quantificadas por HPLC e os valores são apresentados na figura 8A. A partir dos resultados obtidos, verificamos que o PDTC reduz significativamente a potenciação da produção de NAS e de melatonina induzida por IFN- γ 100 ng/mL na presença de NA 10 nM (p = 0,032; p = 0,021, respectivamente) para níveis compatíveis aos dos controles (Fig. 8A).

Paralelamente, avaliou-se por qPCR a modulação dos genes *Aanat* e *Hiomt* promovida pelo IFN- γ na presença deste inibidor. Para isso, glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com PDTC 25 μ M por 30 min, seguidos pela estimulação com IFN- γ 100

ng/mL por 30 min e com NA 10 nM por mais 30 min (ainda na presença das drogas ou dos respectivos veículos). A expressão de *Aanat* e *Hiomt* foi normalizada pela expressão de *Gapdh* e calibrada pelo grupo naive (não-estimulado) (Fig. 8B, linha preta tracejada). Analisando-se os resultados, observamos que o PDTC reduz significantemente a expressão de *Aanat* e *Hiomt* induzida por IFN- γ 100 ng/mL (p = 0,034 e p = 0,014, respectivamente) na presença de NA para níveis compatíveis aos dos controles (Fig. 8B) e que apenas a presença do PDCT não interfere na expressão dessas enzimas em relação ao controle (apenas NA).



Figura 8 - Efeito do PDTC sobre a potenciação da produção de NAS e melatonina induzida por IFN-γ na presença de NA. A) Glândulas pineais em cultura foram estimuladas ou não com PDTC 25 μM por 30 min e, em seguida, com IFN-γ 100 ng/mL ou com o veículo por 30 min. Ainda na presença das drogas, as glândulas foram incubadas com NA 10 nM por mais 5h. A concentração de NAS (esquerda) e de melatonina (direita) no meio de cultura foi determinada por HPLC. Os valores representam a média ± EPM e são expressos em ng/mL; N = 4-6 glândulas por ponto experimental (2 experimentos independentes). B) Glândulas pineais em cultura foram incubadas ou não com PDTC 25 μM por 30 min e, em seguida, com IFN-γ 100 ng/mL ou com o veículo por mais 30 min. Ainda na presença das drogas ou dos veículos, as glândulas foram incubadas com NA 10 nM por 30 min e, em seguida, com IFN-γ 100 ng/mL ou com o veículo por mais 30 min. Ainda na presença das drogas ou dos veículos, as glândulas foram incubadas com NA 10 nM por 30 min e, em seguida, com IFN-γ 100 ng/mL ou com o veículo por mais 30 min. Ainda na presença das drogas ou dos veículos, as glândulas foram incubadas com NA 10 nM por 30 min. A expressão de *Aanat* (esquerda) e *Hiomt* (direita) foi quantificada por qPCR empregando-se o *Gapdh* como gene de referência e o grupo controle não-tratado como calibrador (2^{-ΔΔCt}) (linha tracejada preta). Dados representam a média ± EPM; N = 5-8 glândulas por ponto experimental (3 experimentos independentes).

VI. DISCUSSÃO

1. Mecanismos moleculares ativados pelo IFN-γ na pineal

No presente estudo, determinamos os mecanismos moleculares que modulam o efeito potencializador do IFN-y sobre a produção de melatonina induzida por NA em glândulas pineais de ratos. Constatamos que glândulas estimuladas com IFN-y liberam grande quantidade de NAS, a indolamina precursora da melatonina, o que reforça a ideia de que a HIOMT é a enzima limitante da via biossintética de melatonina (LIU E BORJIGIN, 2005). Os dados obtidos da análise da expressão de Aanat e Hiomt demonstraram que estes genes são alvos de modulação da via do IFN-γ, o que está em consonância com o aumento da produção hormonal pela glândula induzido por esta citocina. Ressalta-se que o aumento da produção de melatonina induzido por IFN-y pode ser decorrente tanto do aumento do conteúdo do substrato da HIOMT, a NAS, como do aumento da expressão de seu gene, Hiomt. Além disso, é possível que, na presença de IFN- γ , as enzimas AA-NAT e HIOMT estejam sofrendo uma alteração em sua atividade catalítica decorrente de mecanismos modulatórios póstraducionais, os quais poderiam contribuir para o aumento da produção de NAS e melatonina induzidas por NA. Isso ocorre, por exemplo, em glândulas estimuladas com corticosterona e com prolactina, as quais induzem um aumento da atividade da HIOMT em glândulas pineais de ratos (FERNANDES et al., 2009; CARDINALI et al., 1976). No entanto, estes mecanismos não foram avaliados no presente estudo, por isso ficam em aberto para pesquisas posteriores.

O estudo das vias relacionadas com a modulação gênica pelo IFN- γ na pineal revelou a existência de complexos proteicos nucleares formados por STAT1 e que diferentes períodos de estimulação com IFN- γ promovem a translocação nuclear deste fator de transcrição. Já o estudo da via do NF- κ B revelou que o IFN- γ aumenta a migração nuclear de p50/RelA e RelA/RelA, sendo que o acúmulo dos complexos formados por RelA pode ser transiente ou crescente ao longo do tempo (1h), dependendo da concentração de IFN- γ testada.

A ativação da via do NF-κB pelo IFN- γ é pouco descrita na literatura. Sabe-se que esta ativação é mediada pela proteína quinase PKR-induzida por IFNs, inicialmente conhecida por ser ativada por RNA dupla fita de vírus (para revisão, HOVANESSIAN, 1989). No entanto, Deb et al. (2001) demonstraram que o IFN- γ por si só é capaz de ativar esta quinase e promover ativação do NF-κB. A PKR ativada é capaz de fosforilar a IKK, a qual,

posteriormente, promove a degradação de IkBa e IkBb e a consequente liberação e translocação nuclear de NF-kB (ZAMANIAN-DARYOUSH et al., 2000). Curiosamente, a PKR também está relacionada com a ativação de STAT1 (WONG et al., 1997; RAMANA et al., 2000). Já foi demonstrado que a PKR se associa fisicamente à STAT1 em células de camundongo e em células humanas (WONG et al., 1997) e que células de camundongos nocautes para PKR estimuladas com IFN- γ apresentam STAT1 com fosforilação de serina defeituosa e atividade de transativação gênica prejudicada (RAMANA et al., 2000). Portanto, apesar de não termos avaliado as vias *upstream* da ativação de NF-kB e de STAT1, é possível que esta quinase esteja envolvida na modulação de ambas.

O estudo do papel da ativação das vias do STAT1 na potenciação da produção de melatonina promovida pelo IFN- γ na glândula pineal, experimentos realizados com um potenciador da atividade transcricional da atividade de STAT1, o 2-NP, demonstraram que a produção hormonal da glândula é potenciada na presença desta droga. E experimentos realizados com um inibidor de NF- κ B, o PDTC, bloqueou a potenciação da produção hormonal da glândula e o aumento da expressão de *Aanat* e *Hiomt* induzidos por IFN- γ na presença de NA. Estes dados em conjunto indicam a importância dos fatores de transcrição STAT1 e NF- κ B na modulação da produção hormonal realizada pelo IFN- γ .

Adicionalmente ao mecanismo de crosstalk (comunicação) entre as vias do NF-KB e STAT1 mediado por PKR, existe uma vasta literatura que descreve a ação sinérgica destes fatores de transcrição na indução/aumento da expressão de muitas proteínas, como: IRF-1, CXCL9, CXCL10, ICAM-1, iNOS, TAP-1 e VCAM1 (SIMS et al., 1993; HIROI; OHMORI, 2003, PINE, 1997; JAHNKE; JOHNSON, 1994; OHMORI; HAMILTON, 1995; GAO et al., 1997; XIE; KASHIWABARA; NATHAN, 1994; LEDEBUR: PARKS. 1995; CALDENHOVEN et al., 1994; LOOK; PELLETIER; HOLTZMAN, 1994; MIN; POBER; JOHNSON, 1996; NEISH et al., 1995). Ressalta-se que o gene Nos2 (que codifica para iNOS) em geral é expresso apenas na presença simultânea de LPS/TNF e do IFN-y (GAO et al., 1997). Na pineal, isso pode ser observado pelo fato de que o Nos2, classicamente ativado por IFN-γ, não apresentou modulação positiva na presença apenas desta citocina. Além disso, verificamos que o NF- κ B e o STAT1, ativados por IFN- γ , ligam-se na sequência nat- κ Bp do promotor de *Aanat*, sugerindo que o aumento da expressão de *Aanat* promovido pelo IFN- γ na presença da NA seja resultado de uma possível ação sinérgica da modulação transcricional efetuada por STAT1 e NF-κB.

Um dado interessante obtido no presente estudo é o fato de que o 2-NP por si só já aumenta a produção hormonal da glândula induzida por NA. Isso sugere que exista uma

ativação de STAT1 em glândulas estimuladas com NA, ou seja, durante a fase do escuro. Este dado é reforçado pelo fato de que a NA sozinha parece ser capaz de aumentar a ligação de STAT1 à nat- κ Bp. Já foi descrito, em células de linhagem humanas, que a ativação de receptores α_{1A} -AR por NA causa um aumento sustentado de fosforilação de STAT1 e aumento da atividade transcricional de elementos GAS (ZHONG et al., 2000). Isto sugere que a NA também seja capaz de ativar a via do STAT1 e que este fator de transcrição pode estar envolvido com o controle da expressão noturna de *Aanat* em glândulas pineais de ratos.

A estimulação das glândulas pineais com apenas com IFN- γ também tende a promover um aumento da ligação de STAT1 à nat- κ Bp e a estimulação dupla, ou seja, IFN- γ e NA, um aumento ainda maior da ligação de STAT1 à nat- κ Bp, provavelmente decorrente da adição dos efeitos individuais. Isso sugere que um dos mecanismos envolvidos com a potenciação da produção de NAS pelo IFN- γ na pineal seja o aumento da concentração de STAT1 nuclear além do já existente em decorrência do estímulo noradrenérgico. Este dado é corroborado pelos dados de EMSA que demonstraram o acúmulo nuclear de STAT1 (C1) na presença do IFN- γ . Apesar da forte tendência de aumento na ligação da STAT1 à região do promotor da *Aanat* (nat- κ Bp) o N amostral obtido até a finalização da presente dissertação (n=3) não foi suficiente para que pudéssemos detectar diferenças estatísticas entre os grupos. Novos experimentos estão sendo realizados para confirmar as tendências aqui descritas para a publicação do artigo referente ao presente trabalho. Contudo, tomados em conjunto com os outros resultados apresentados, uma potenciação da transcrição do gene *Aanat* induzida pela STAT1 é extremamente coerente.

Outro dado interessante é o de que o IFN- γ por si só aparentemente promove uma redução da ligação de p50 (repressora da transcrição) à nat- κ Bp, de forma que a RelA (ativadora de transcrição) seja a subunidade predominantemente ligada à esta sequência na presença da citocina. Além disso, observou-se a ligação de subunidades cRel à nat- κ Bp em média maior que a verificada no *input*. Isso significa que, apesar de estar ligada a esta sequência em menor proporção que RelA, somados, constituem uma maioria de subunidades ativadoras de expressão gênica em glândulas ativadas por IFN- γ . No entanto, isso não ocorre quando a NA é adicionada ao meio de cultura, pois, nesta condição, a subunidade p50 é a que apresenta maior atividade de ligação à nat- κ Bp em relação à RelA e cRel. Portanto, é possível que a configuração dos complexos transcricionais inicialmente acoplados à região promotora de *Aanat* na presença do IFN- γ seja tal que permita e/ou favoreça a formação de complexos com maior capacidade de transativação gênica com o estímulo posterior de NA Outra possibilidade é a de que os dímeros formados por RelA ativados por IFN- γ se liguem a outras regiões do promotor de *Aanat*, não avaliadas no presente estudo, modulando assim a transcrição deste gene. Como mencionado anteriormente, novos experimentos estão sendo realizados para confirmar/descartar as hipóteses levantadas

Sabe-se que, em condições de higidez, a expressão noturna de Aanat é controlada principalmente pelo fator CREB ativado por NA na glândula pineal (BORJIGIN; WANG; SNYDER, 1995; ROSEBOOM et al., 1996; GARIDOU et al., 2001). Este fator, quando ativado (P-CREB), admite ligação com outros fatores no núcleo e, o complexo final formado, adquire capacidade de transativação gênica (GONZALEZ et al., 1989). Um dos principais cofatores moduladores da atividade transcricional de P-CREB é a proteína CBP (do inglês, CREB binding protein) (GOODMAN; SMOLIK, 2000). Já foi descrita na literatura a ligação de um complexo, composto por NF-kB, STAT1 e pelo co-fator CBP, ao DNA, formando assim um elemento de regulação gênica denominado "enhanceossomo" (HIROI; OHMORI, 2003; HIROI; OHMORI, 2005). Dentre os enhanceossomos descritos, já foi verificado que o complexo formado por CBP, NF-KB e STAT1 pode se ligar ao elemento GAS/KB do promotor do gene Cxcl9 e induzir sua transcrição (HIROI; OHMORI, 2003). Neste estudo, os autores verificaram que o STAT1 e RelA se associam a CBP in vivo e que a co-estimulação com IFN- γ e TNF aumenta o recrutamento de STAT1, NF- κ B, CBP e RNA polimerase II à região promotora de Cxcl9. Além disso, verificaram que o sinergismo verificado na presença de STAT1 e de NF-kB depende da ligação da CBP ao complexo. Estes dados em conjunto indicam que a interação da CBP com os fatores NF-kB e STAT1 criam um arcabouço para ligação da RNA polímerase II, conferindo ao complexo final capacidade de transativação gênica.

Sabe-se que o promotor do gene *Aanat* apresenta elementos regulatórios CRE (para revisão, SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003) e verificamos neste trabalho que esta região possivelmente possui sítios GAS. Nosso grupo de trabalho também demonstrou que a região promotora de *Aanat* também apresenta elementos κ B, essenciais para a modulação da transcrição deste gene, e que esta regulação pode ser positiva ou negativa dependendo das subunidades do NF- κ B (TAD positiva ou negativa) ativadas por determinado estímulo (MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013). Tendo em vista que o IFN- γ induz a translocação de STAT1 e de dímeros de NF- κ B que contém a subunidade ativadora de transcrição gênica RelA, é possível que o controle transcricional de *Aanat* seja realizado por um enhanceossomo formado por NF- κ B, CREB e STAT1 dentre outros. Deste modo, as diferentes subunidades do NF- κ B e a quantidade de STAT1 nuclear podem estar relacionadas com a modulação

diferencial da expressão gênica de *Aanat*, considerando diferentes fases do dia e as diferentes fases de um processo inflamatório (Fig. 9).

Além da modulação da expressão de *Aanat* verificada em glândulas pineais estimuladas com IFN- γ , observamos também uma modulação positiva da expressão de *Hiomt* na presença desta citocina. Apesar de existirem poucos estudos sobre o controle transcricional de *Hiomt*, é possível que existam sítios κ B e GAS nesta região e que estes elementos estejam mediando a potenciação da expressão de *Hiomt* induzida por IFN- γ na presença de NA (Fig. 9). Um dado que corrobora esta hipótese é o de que o aumento da expressão destes genes promovido pelo IFN- γ é inibido na presença do inibidor de NF- κ B, o PDTC. Ressalta-se que STAT1 e o NF- κ B também podem estar envolvidos com a expressão noturna de *Hiomt*, uma vez que esse gene é expresso 2 vezes mais nesta fase do que na fase do claro (GAUER; CRAFT, 1996; RIBELAYGA et al., 1999b).



Fase do escuro

Figura 9 - Modelo teórico do controle da atividade transcricional dos genes Aanat e Hiomt em condições fisiológicas ou na presença do IFN-y. Em condições fisiológicas (quadro à esquerda), durante a fase do escuro, a NA liberada na fenda sináptica da glândula pineal ativa receptores adrenérgicos e promove a ativação do fator de transcrição CREB por meio da via AMPc/PKA. Concomitantemente, acredita-se que receptores α_1 adrenérgicos ativados promovam a ativação de fatores de transcrição STAT1. No núcleo, as proteínas CREB e STAT1, juntamente com concentrações basais de p50/p50, se ligariam ao promotor de Aanat e recrutariam cofatores como a CBP e a TBP (TATA binding protein), e o complexo transcricional final, chamado de enhanceossomo, adquiriria a capacidade de transativação gênica e promoveria a transcrição de Aanat, e consequentemente, a produção de melatonina. É possível que um complexo transcricional semelhante a este também esteja envolvido na expressão de *Hiomt* noturna. Na presença do IFN-γ e da NA (quadro à direita), além das vias ativadas pela NA já descritas, o IFN-γ induz a ativação dos fatores de transcrição STAT1 e NF-κB, possivelmente por mecanismos dependentes das quinases JAK1, JAK2 e PKR. É possível que esta última também esteja envolvida na ativação adicional de STAT1. As subunidades do NF-κB majoritariamente ativadas pelo IFN-γ constituem-se por RelA. Além das proteínas CREB ativadas por NA, estas altas concentrações de RelA juntamente com altos níveis de STAT1 permitiriam que o enhanceossomo formado por estes fatores de transcrição fosse capaz de recrutar uma maior concentração de RNA polimerase II, promovendo um aumento adicional da expressão de Aanat, e consequentemente, da produção noturna de melatonina. É possível que este mesmo complexo transcricional também esteja envolvido no aumento da expressão de *Hiomt* induzido por IFN-γ na presença de NA.

2. IFN-y no contexto do eixo imune-pineal

Do ponto de vista do papel do IFN- γ na montagem de respostas inflamatórias, esta citocina, juntamente com o TNF, atuam de forma pleiotrópica e estão envolvidas principalmente com resposta imune celular Th1 em infecções bacterianas e virais, e com quadros mais raros como a artrite reumatoide, diabete e a esclerose múltipla (PESTKA et al., 1987; CERAMI, 1992; BOEHM et al., 1997). Apesar do IFN- γ e do TNF serem produzidos amplamente nestas condições, o contexto fisiológico em geral define o conjunto de genes que são expressos em cada uma delas.

Sabe-se que numa resposta Th1 bacteriana uma grande concentração de interferons é produzida por macrófagos estimulados por altas concentrações de LPS, por exemplo, e que este antígeno elicita respostas imunes classicamente do tipo Th1 (para revisão, LICHTMAN; ABBAS, 2003). Nesta condição, o IFN-γ e o LPS/TNF participam da ativação de macrófagos de forma sinérgica por meio da superindução da expressão de um determinado conjunto de genes relacionados com a resposta inflamatória (DRAPIER; WIETZERBIN; HIBBS, 1988; CASSATELLA et al., 1989; HUANG et al., 2002; JAHNKE; JOHNSON, 1994). Esta ação sinérgica pode ser resultado da ação conjunta dos fatores de transcrição STAT1 e NF-κB em elementos regulatórios do DNA, como comentado anteriormente. No entanto, a contribuição do IFN-γ para a superindução da expressão gênica não consiste apenas na ativação de STAT1.

Já foi descrito que a co-estimulação de IFN- γ e TNF promove uma persistente ativação de NF- κ B mediada pelo aumento da degradação de I κ Ba e da degradação de I κ Bb-*de novo* (CHESHIRE e BALDWIN, 1997) e que o pré-tratamento de macrófagos RAW 264.7 com IFN- γ potencia a ativação do NF- κ B induzida por LPS, aumenta a cinética de ligação deste com o DNA e promove uma degradação mais rápida da I κ B α (HELD et al., 1999). Este efeito também foi observado em células neuronais, onde o co-tratamento com TNF e IFN- γ ativa sinergisticamente a via do NF- κ B, efeito mediado por PKR (CHESHIRE; WILLIAMS; BALDWIN JR., 1999). Portanto, estes dados em conjunto sugerem que um dos mecanismos envolvidos com o sinergismo entre o IFN- γ e o TNF consiste na potenciação da ativação do NF- κ B, o qual pode estar atuando conjuntamente com o STAT1 na modulação da expressão gênica.

Já foi verificado que monócitos humanos não estimulados apresentam altos níveis de p50 nuclear e baixos níveis de RelA. Porém, quando estimulados com IFN- γ , a quantidade de RNAm de RelA aumenta, o que promove uma potenciação da ativação da via do NF- κ B induzida por LPS (DE WIT et al., 1996). Tendo em vista que o IFN- γ também é capaz de

potenciar a produção de melatonina por células imunocompetentes (FINOCCHIARO et al., 1988), é possível que as mesmas vias envolvidas com a potenciação da produção deste hormônio pelo IFN- γ na pineal estejam também relacionadas com a modulação da expressão de *Aanat* nestas células. E, considerando que o LPS e o TNF modulam positivamente a produção de melatonina por macrófagos por meio da ativação de dímeros contendo RelA e cRel (MUXEL et al., 2012), especula-se que uma possível ação sinérgica entre o IFN- γ e o TNF promova uma expressão ainda maior de *Aanat* em macrófagos decorrente do acúmulo de RelA nuclear.

Por outro lado, na pineal, sabe-se que o LPS e o TNF promovem a translocação nuclear de dímeros p50/p50 e p50/RelA e que a inibição da produção hormonal da glândula por estes fatores é provavelmente um resultado da repressão da expressão de *Aanat* causada pelo aumento de p50/p50 nuclear (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010; CARVALHO-SOUSA et al., 2011). Além disso, verificamos que o IFN- γ promove majoritariamente a migração nuclear de dímeros contendo RelA (TAD positivos) e a redução da expressão de *NfkB1*, gene que codifica para as subunidades p50 do NF- κ B (HEISSMEYER et al., 1999). Portanto, especula-se que, na glândula pineal, o IFN- γ altere translocação nuclear de NF- κ B, passando de um perfil inibitório induzido inicialmente por TNF (p50/p50) para um perfil estimulatório pelo acúmulo de RelA induzido por IFN- γ . Deste modo, esta citocina estaria contribuindo posteriormente para o restabelecimento da produção de melatonina da glândula pineal uma vez inibida por LPS/TNF. Além da participação de RelA no restabelecimento da produção hormonal na pineal, os dados apresentados neste trabalho indicam que o STAT1 também contribui para este efeito como comentado anteriormente.

Em relação à ação do IFN- γ como sinalizador de uma infecção viral, apesar de não se ter conhecimento sobre a ação direta de vírus sobre a produção de melatonina pela glândula pineal, sabe-se que respostas antivirais envolvem a produção maciça deste interferon, além da produção de IFNs do tipo II, TNF, IL-6 e LTA, dentre outros (TANIGUCHI; TAKAOKA, 2002; LIEBERMAN; PITHA; SHIN, 1989). Portanto, tendo em vista o papel do TNF e do IFN- γ na modulação da expressão de *Aanat*, especula-se que a montagem de repostas antivirais também promova a modulação da produção de melatonina por células imunocompetentes e pela glândula. Neste sentido, dados do PCR array mostraram que o IFN- γ aumenta a expressão de *Ifnar1*, que codifica para o receptor do tipo I de interferons. Isso sugere que o IFN- γ aumenta a responsividade da glândula a essa família de IFNs, o que significa que existe a possibilidade dos IFNs em conjunto modularem a produção de melatonina da glândula numa resposta antiviral. O perfil desta modulação e a magnitude da produção de melatonina, no entanto, só poderá ser acessado com estudos específicos com PAMPs virais ou com IFNs do tipo I. Vale comentar que, pelo fato de que os dois tipos de IFNs ativarem STAT1 (homo- ou heterodímeros contendo este fator; CALÒ et al., 2003), é possível que a concentração de STAT1 nuclear verificada em glândulas pineais estimuladas com grandes concentrações de IFN- γ pode estar mimetizando a sinalização simultânea dos dois tipos de interferons *in vivo*.

Sabe-se que, além de estar relacionada com a ativação do NF- κ B e da STAT, a PKR também induz apoptose por mecanismos dependentes de fas (BALACHANDRAN et al., 1998; DONZE; DOSTIE; SONENBERG, 1999). Tendo em vista que o IFN- γ também apresenta efeitos antiproliferativos, acredita-se que estes efeitos em conjunto sejam essenciais na contenção da replicação viral (para revisão, SCHRODER et al., 2004). De fato, a expressão d muitos genes codificantes para fatores mitogênicos, ou relacionados com o controle do ciclo celular ou proliferação foram reprimidos após 1h de estimulação com altas concentrações de IFN- γ . Dentre eles, estão: *Akt1, Cdkn1a, Egfr, Fcer, Lrg1, Pdgfra, Ptpn11, Src, Stat5a, Jun, Smad1, Smad2*. Especula-se que estímulos prolongados com IFN- γ em altas concentrações promoveu forte repressão deste conjunto de genes na glândula pineal.

Portanto, estes dados avaliados juntamente com a literatura existente sobre o **eixo imune-pineal** indicam que a magnitude da produção de melatonina pela glândula ou por células imunocompetentes é decorrente de diferentes combinações e proporções de fatores de transcrição ativados pelos agentes inflamatórios produzidos de forma temporalmente coordenada na resposta imune.

Curiosamente, dados obidos de PCR *array* demonstraram que muitos genes relacionados com a polarização de respostas do tipo Th2 apresentaram uma regulação da expressão gênica quase sempre positiva em glândulas pineais estimuladas com IFN- γ . Dentre eles, estão aqueles relacionados com a produção/sinalização de citocinas como a IL-10 e a IL-4, típicas de resposta Th2 (para revisão, LICHTMAN; ABBAS, 2003), que codificam para: o fator de transcrição GATA3, o receptor beta da IL-10, a citocina IL-20 (estruturalmente relacionada com IL-10), o receptor de IL-4 e a Janus quinase 3 (proteína relacionada com a sinalização da IL-4).O aumento da responsividade da glândula aos componentes da resposta Th2 sugere que este possa ser um mecanismo de controle negativo da via do IFN- γ e, consequentemente, da resposta Th1, já que as citocinas envolvidas em cada um dos tipos de resposta inibem-se mutuamente (para revisão, LICHTMAN; ABBAS, 2003). Além destes componentes, dados do PCR *array* demonstraram que genes relacionados, de forma geral, com o controle da cascata de sinalização deflagrada pelo IFN-γ e do ciclo celular também são modulados por esta citocina na pineal. É interessante observar, por exemplo, que *Socs3* é regulada positivamente por IFN-γ, o que sugere que a proteína codificada por este gene, conhecida por suprimir a sinalização de citocinas (para revisão, CALÒ et al, 2003), seja uma das principais proteínas envolvidas com a retroalimentação negativa da via do STAT1 ativada por IFN-γ na pineal. Genes que codificam componentes relacionados com a sinalização celular do IFN-γ como a GTPase GBP1, o fator de transcrição IRF-9 e a JAK2 apresentaram modulação negativa na glândula pineal, o que também pode estar relacionado com o controle negativo desta via. Também se verificou que o gene *Ghr*, que codifica o receptor do hormônio de crescimento (GH), é modulado pelo IFN-γ. Não se conhecem mecanismos de controle negativo da via do IFN-γ pelo GH, porém é possível que o aumento de responsividade da glândula ao GH também seja um dos mecanismos de contenção da produção de melatonina potenciada pelo IFN-γ na glândula pineal.

Estes dados sugerem que o efeito potencializador do IFN- γ sobre a produção de melatonina pela pineal é compensado pela expressão de componentes relacionados com a desativação/dessensibilização da cascata de sinalização do IFN- γ . Adicionalmente, o aumento da responsividade da glândula a componentes da resposta imunológica do tipo Th2 também poderiam estar contribuindo para este controle, de forma a conter os efeitos mediados pelo IFN- γ , uma citocina tipicamente envolvida com respostas do tipo Th1 (para revisão, LICHTMAN; ABBAS, 2003).

Considerando a montagem de respostas do tipo Th1 do ponto de eixo imune-pineal, apesar do LPS/TNF e o IFN- γ apresentarem efeitos contrários na glândula pineal, especula-se que o controle temporal da produção hormonal da glândula contribua para a montagem adequada da resposta inflamatória da seguinte forma: a inibição inicial da produção da melatonina por LPS/TNF permitiria a migração de células imunocompentes para os locais injuriados (LOTUFO et al., 2001; TAMURA et al., 2010). Estes mesmos agentes inflamatórios potenciam a produção de melatonina por macrófagos, a qual, juntamente com estes fatores, estariam cooperando para aumentar a atividade fagocítica e a citotoxidade destas células (para revisão, LICHTMAN; ABBAS, 2003; MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013; CARRILLO-VICO et al., 2013) (Fig. 10). Com o aumento da produção de IFN- γ por células Th1 induzida por LPS durante a fase adaptativa da resposta inflamatória, a potenciação da produção de melatonina promovida pelo IFN- γ estaria aumentando ainda mais a concentração plasmática desta indolamina, contribuindo ainda mais para o aumento da

atividade fagocítica e da citotoxicidade de macrófagos. Simultaneamente ao restabelecimento da produção de melatonina, a permeabilidade vascular aos leucócitos começaria a ser restabelecida, possibilitando a montagem da fase resolutiva da resposta inflamatória. Portanto, embora a glândula e as células imunocompetentes reconheçam e respondam diferentemente aos agentes inflamatórios, todas essas ações estariam contribuindo para a montagem e resolução de uma resposta imunológica (Fig. 10). Neste contexto, nossos dados reforçam o papel do NF-κB como fator chave nesta modulação da produção de melatonina por diferentes fatores inflamatórios e abrem uma nova perspectiva de pesquisa em relação ao papel do fator de transcrição STAT1 sobre o controle transcricional de *Aanat* e sobre a configuração dos complexos transcricionais que se ligam ao promotor deste gene considerando as diferentes fases do dia e do processo inflamatório.



Adaptado de FERNANDES, 2009.

Figura 10 – **O Eixo imune-pineal e o IFN-** γ **.** A inibição inicial da produção da melatonina por LPS/TNF permitiria a migração de células imunocompentes para os locais injuriados. Estes mesmos agentes inflamatórios potenciam a produção de melatonina por macrófagos, a qual, juntamente com estes fatores, estariam cooperando para aumentar a atividade fagocítica e a citotoxidade destas células. Com o aumento da produção de IFN- γ por células Th1 induzida por LPS durante a fase adaptativa da resposta inflamatória, a potenciação da produção de melatonina promovida pelo IFN- γ estaria aumentando ainda mais a concentração plasmática desta indolamina, contribuindo ainda mais para o aumento da atividade fagocítica e da citotoxicidade de macrófagos. Simultaneamente ao restabelecimento da produção de melatonina, a permeabilidade vascular aos leucócitos começaria a ser restabelecida, possibilitando a montagem da fase resolutiva da resposta inflamatória.

VII. CONCLUSÕES

- IFN-γ potencia a produção de NAS e melatonina induzida por NA em pineais em cultura por mecanismos associados ao aumento da expressão dos genes que codificam para as enzimas AA-NAT e HIOMT.
- IFN-γ aumenta a translocação nuclear dos fatores de transcrição STAT1 e NF-κB em pineais em cultura.
- IFN-γ modula a expressão de genes relacionados com a via JAK:STAT em pineais em cultura.
- IFN-γ e/ou a NA tendem a aumentar a ligação de STAT1 à região promotora de gene Aanat, nat-κBp.
- O aumento na produção de NAS e melatonina induzido por IFN-γ é induzido por um ativador da via STAT1 em pineais em cultura estimuladas com NA.
- O bloqueio da via NF-κB inibe o aumento induzido por IFN-γ sobre a produção de NAS e melatonina induzida por NA em pineais em cultura.
- O bloqueio da via NF-κB inibe o aumento induzido por IFN-γ sobre a expressão de Aanat e Hiomt em pineais em cultura estimuladas com NA.
- O presente estudo revela o papel estimulador da via STAT1 com provável sinergismo com a via NF-κB sobre a produção hormonal da pineal na presença da citocina IFN-γ. Estes dados ampliam e trazem novos *insights* relacionados com a capacidade funcional de integrações de sinais desta glândula em situações de higidez e durante a ativação de respostas de defesa.

VIII. RESUMO

A produção noturna de melatonina pela glândula pineal é fundamental no controle do sistema oscilatório endógeno de mamíferos. Sua síntese é iniciada pela ativação de receptores adrenérgicos em resposta à liberação noturna de noradrenalina (NA) por terminais simpáticos. A ativação adrenérgica induz, em roedores, a transcrição do gene e a ativação da enzima arilalquil-N-acetiltransferase (AA-NAT) que converte a serotonina em N-acetilserotonina (NAS). A NAS é então convertida em melatonina pela ação da enzima hidroxiindol-Ometiltransferase (HIOMT). Além das funções cronobiológicas, a pineal apresenta comunicação bidirecional com o sistema imunológico, descrita pelo conceito do eixo imunepineal. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que mediadores imunológicos, como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas e o fator de necrose tumoral (TNF), inibem a síntese de melatonina pela pineal por um mecanismo dependente da ativação do fator nuclear de transcrição kappa B (NF-kB). Por outro lado, fatores que inibem esta via (glicocorticoides) aumentam a produção de melatonina pela glândula pineal. Outros mediadores imunológicos que sinalizam por vias distintas à do NF-kB também são capazes de atingir e modular a produção de melatonina. A citocina inteferon-gama (IFN- γ) classicamente sinaliza pela via do STAT1 (do inglês Signal Transducer and Activator of Transcription) e é capaz de aumentar a produção de melatonina em pineais. Contudo, não existem relatos do papel desta via de sinalização sobre a síntese hormonal da glândula pineal. Sabendo-se que o IFN- γ também é capaz de sinalizar pela ativação do NF- κ B, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar e avaliar o papel destas duas vias de sinalização ativadas pelo IFN-γ sobre as produções de NAS e melatonina, induzidas por NA, em pineais em cultura. Nossos dados mostram que o aumento da síntese de NAS e melatonina induzida pelo IFN- γ está associado ao aumento da expressão dos genes Aanat e Hiomt. A incubação das glândulas com IFN-y aumenta a translocação nuclear de STAT1 e de dímeros de NF-kB ativadores da transcrição gênica. Além disso, a incubação de pineais com IFN-y aumenta a transcrição de 27 genes relacionados com a via das STATs. IFN-y tende a aumentar a ligação da STAT1 com uma região do promotor do gene Aanat e a utilização de uma droga que potencia a ativação da STAT1 também aumenta a produção de NAS e melatonina. Por fim, o bloqueio da via do NFκB inibe o aumento na produção de NAS e melatonina e da expressão de Aanat e Hiomt induzido pelo IFN- γ . Nossos dados demonstram, pela primeira vez, a importância da via da STAT1 em associação com a via NF-κB sobre a produção hormonal da glândula pineal.

IX. ABSTRACT

The nocturnal production of melatonin by the pineal gland is crucial in the control of the mammalian endogenous oscillatory system. Melatonin synthesis is initiated by the activation of adrenergic receptors in response to nocturnal release of noradrenaline (NA) by sympathetic terminals. The adrenergic activation induces, in rodents, gene transcription and activation of the arylalkyl-N-acetyltransferase enzyme (AA-NAT) that converts serotonin into Nacetilserotonin (NAS). NAS is then converted to melatonin by the action of the enzyme hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT). In addition to the chronobiological functions, the pineal has a bidirectional communication with the immune system as described by the concept of the immune-pineal axis. Our research group has demonstrated that immunological mediators as the lipopolysaccharide (LPS) of gram-negative bacteria and the tumor necrosis factor (TNF) inhibit the synthesis of melatonin by the pineal in a mechanism dependent on the activation of the nuclear transcription factor kappa B (NF-κB). Moreover, factors that inhibit NF-kB pathway (glucocorticoids) increase the production of melatonin by the pineal gland. Other immunological mediators that signalize by distinct signaling pathways are also able to target and modulate the melatonin production. The cytokine interferon-gamma (IFN-y) classically signals trough STAT1 (Signal transducer and Activator of Transcription) and is able to increase the production of melatonin by the pineal. However, there are no reports of the role of STAT1 pathway on the hormonal synthesis of the pineal gland. Considering that IFN- γ is also able to signalize through NF- κ B, the aim of this study was to characterize and evaluate the role of these two signaling pathways activated by IFN- γ on the production of NAS and melatonin induced by NA in cultured pineals. Our data show that the increase in NAS and melatonin synthesis induced by IFN- γ is associated with increased expression of the genes Aanat and Hiomt. Incubation of the glands with IFN- γ increases the nuclear translocation of STAT1 and of p50:RelA NF-kB dimers. In addition, pineal incubation with IFN- γ increases the transcription of 27 related to STAT pathway. IFN- γ tends to increase the binding of STAT1 to a promoter region and the Aanat gene and the use of a STAT1-enhancer also increased the production of NAS and melatonin. Finally, the blockade of NF-kB pathway inhibits the increase in melatonin and NAS productions and also of Aanat and Hiomt genes expression induced by IFN- γ . Our data demonstrate, for the first time, the importance of the STAT1 pathway in association with NF- κ B pathway on the hormonal production of the pineal gland.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS¹

AZEKAWA T. et al. Diurnal changes in pineal extracellular indoles of freely moving rats. **Neurosci Lett,** v. 132, p. 93–96, 1991.

BAER M. et al. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB 50. **Mol. Cell Biol**., v. 18, p. 5678–5689, 1998.

BALACHANDRAN S. et al. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. **EMBO J**., v. 17, p. 6888–6902, 1998.

BALER R., COVINGTON S., and KLEIN D.C. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. J. Biol. Chem., v. 272, p. 6979–6985, 1997.

BALER R., COVINGTON S., KLEIN D. C. Rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene: Upstream and intronic components of a bipartite promoter. **Biology of the Cell**, v. 91, p. 699-705, 1999.

BOEHM U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. Annu. Rev. Immunol., v. 15, p. 749-795, 1997.

BOLE-FEYSOT C. et al. "Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice". **Endocr. Rev.**, v. 19(3), p. 225–68, 1998.

BORJIGIN J., WANG M.M., and SNYDER S.H. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. **Nature**, (Lond), v. 378, p. 783–785, 1995.

BOYLE JR. E. M. et al. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. Ann. Thorac. Surg., v. 63, p. 277-284, 1997.

BROMBERG J. F. et al. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 93, p. 7673–7678, 1996.

CALDENHOVEN E. et al. Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 21146–21154, 1994.

CALÒ V. et al. STAT Proteins: From Normal Control of Cellular Events to Tumorigenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 197, p. 157–168, 2003.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

CARDINALI D. P., NAGLE C. A., ROSNER J. M. Gonadotrophin- and prolactininduced increase of rat pineal hydroxyindole-O-methyl-transferase: involvement of the sympathetic nervous system. **J Endocrinol.**, v. 68, n. 2, p. 341-2, 1976

CARRILLO-VICO A. et al. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. **FASEB J**., v. 17, p. 755-757, 2003.

CARRILLO-VICO A. et al. Melatonin: Buffering the Immune System. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14(4), p. 8638-8683, 2013.

CARTER D.A. A daily rhythm of activator protein-1 activity in the rat pineal is dependent upon trans-synaptic induction of JunB. **Neuroscience**, v. 62, p. 1267–1278, 1994.

CARVALHO-SOUSA C.E. et al. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. **Frontiers in Cellular Endocrinology**, v. 2, article 10, 2011.

CASSATELLA M. A. et al. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 1570–1579, 1989.

CECON E. et al. Amyloid b peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. **The FASEB Journal**, article fj.14-265678, 2015.

CECON E. et al. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFKB) in rat pineal gland. **Chronobiol Int**, v. 27, p. 52-67, 2010.

CERAMI A. Inflammatory cytokines. Clin. Immunol. Immunopathol, v. 62, p. S3-S10, 1992.

CHEN W. and BALER R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. **Mol. Brain Res.**, v. 81, p. 43–50, 2000.

CHENG Y.S., PATTERSON C.E., STAEHELI P. Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11(9), p. 4717–25, 1991.

CHESHIRE J. L., WILLIAMS B. R. G., and BALDWIN JR. A.S. Involvement of doublestranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor κB by tumor necrosis factor-a and g-interferon in preneuronal cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 4801-4806, 1999. CHESHIRE J. L., BALDWIN JR. A. S. Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaB beta degradation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 6746–6754, 1997.

COUTO-MORAES R., PALERMO-NETO J., MARKUS R. P. The Immune–Pineal Axis Stress as a Modulator of Pineal Gland Function. **Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y.** Acad. Sci., v. 1153, p. 193–202, 2009.

DA SILVEIRA CRUZ MACHADO et al. (submetido). Daily corticosterone rhythm regulates pineal melatonin production by synchronizing the expression of TLR/NF-κB transcriptional program.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S. et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J. Pineal Res.**, v. 49, p. 183-192, 2010.

DARNELL JR. J. E., KERR I. M., STARK G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, p. 1415–1421, 1994.

DE WIT H. et al. Interferongamma modulates the lipopolysaccharide-induced expression of AP-1 and NF-kappa B at the mRNA and protein level in human monocytes. **Exp. Hematol**., v. 24, p. 228–235, 1996.

DEB A. et al. RNA-Dependent Protein Kinase PKR Is Required for Activation of NF- κ B by IFN- γ in a STAT1-Independent Pathway. **J. Immunol**., v. 166, p. 6170-6180, 2001.

DECKER T., KOVARIK P., MEINKE A. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. **J. Interferon Cytokine Res**., v. 17, p. 121–134, 1997.

DEGUCHI T. and AXELROD J. Induction and superinduction of serotonin Nacetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in rat pineal organ. **Proc. Natl. Acad.** Sci., USA, v. 69, p. 2208–2211, 1972b.

DINARELLO C. A. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. **J. Allergy Clin. Immunol**., v. 103, p. 11–24, 1999.

DONZE O., DOSTIE J., SONENBERG N. Regulatable expression of the interferon-induced double-stranded RNA dependent protein kinase PKR induces apoptosis and fas receptor expression. **Virology**, v. 256, p. 322–329, 1999.

DRAPIER J. C., WIETZERBIN J., HIBBS JR. J. B. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, p. 1587–1592, 1988.

DRIJFHOUT W.J. et al. Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. **Neurosci Lett**, v. 202, p. 185–188, 1996b.

DURBIN J. E. et al. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. **Cell**, v. 84, p. 443–450, 1996.

EPPERT K. et al. "MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma". **Cell**, v. 86(4), p. 543–52, 1996.

FARBER J.M. HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. **Biochem Biophys Res. Commun.**, v. 192(1), p. 223–230, 1993.

FERNANDES et al. Local Corticosterone Infusion Enhances Nocturnal Pineal Melatonin Production In Vivo. **Journal of Neuroendocrinology** v. 21, p. 90–97, 2009.

FERNANDES P.A.C.M. et al., (submetido). Dual effects of catecholamines and corticosterone crosstalk upon pineal gland melatonin synthesis: insights into the neuroendocrine coordination of the defense system.

FERNANDES P.A.C.M. Regulação da produção hormonal da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório. Tese apresentada no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP, 2009.

FERNANDES P.A.C.M. et al. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. **J. Pineal Res.**, v. 41, p. 344–350, 2006.

FERREIRA Z. S. et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatoninsynthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. J. Pineal Res., v. 38, p. 182–188, 2005.

FERREIRA Z.S. et al. P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. **Pharmacology**, v. 69, p. 33-37, 2003.

FERREIRA Z.S., CIPOLLA-NETO J., and MARKUS R.P. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. **Br. J. Pharmacol**, v. 112, p. 107–110, 1994.

FINOCCHIARO et al. Serotonin and Melatonin Synthesis in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Stimulation by Interferon-7 as Part of an Immunomodulatory Pathway. JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH 8:705-716 (1988).

FREEMAN R.M., PLUTZKY J., NEEL B.G. "Identification of a human Src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew". **Proc.** Natl. Acad. Sci., USA, v. 89(23), p. 11239–43, 1992.

GAJEWSKI T. F., FITCH F. W. Anti-proliferative effect of IFNgamma in immune regulation. I. IFN-γamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4245–4252, 1988.

GANGULY S. et al. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14– 3-3-binding switch in melatonin synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 98, p. 8083–8088, 2001.

GANGULY S., COON S.L., and KLEIN D.C. Control of melatonin synthesis in the Mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. **Cell Tissue Res.**, v. 309, p. 127–137, 2002.

GAO J. et al. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. J. Biol. Chem., v. 272, p. 1226–1230, 1997.

GARIDOU M.L. et al. In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. **Neuroscience**, v. 105 p. 721, 2001.

GAUER, F.; CRAFT C. M. Circadian regulation of hydroxyindole-*O*methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. **Brain Res**, v.737, p. 99–109, 1996.

GELLER D.A. et al. "Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes". **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 90(8), p. 3491–5, 1993.

GHOSH S. & HAYDEN M.S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. Nat. Rev. Immunol., v. 11, p. 837-848, 2008.

GILMORE T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, p. 6680–6684, 2006.

GOLDSTEIN D. et al. Effect of interferon- γ on the endocrine system: Results from a phase 1 Study. **Cancer Res.**, v. 47, p. 6396-6401, 1987.

GONZALEZ G. A. et al. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. **Nature**, v. 337, p. 749-752 (23 February 1989).

GOODMAN R.H. and SMOLIK S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes Dev., v. 14, p. 1553-1577, 2000.

GROLLMAN E.F. et al. Relationships of the structure and function of the interferon receptor to hormone receptors and establishment of the antiviral state. **Cancer Res.**, v. 38, p. 4172-4185, 1978.

HACKER H. & KARIN M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. Sci. STKE, v. 357, p. re13, 2006.

HAN J., ULEVITCH R. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. Nat. Immunol., v. 12, p. 1198–1205, 2005.

HARPER J.W. et al. "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclindependent kinases". **Cell**, v. 75(4), p. 805–16, 1993.

HAYDEN M. S., WEST A. P. & GHOSH S. NF-κB and the immune response. **Oncogene**, v. 25, p. 6758–6780, 2006.

HEISSMEYER V. et al. "NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes". **EMBO J.**, v. 18(17), p. 4766–78, 1999.

HELD T. K. et al. Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 206–212, 1999.

HENNINGSSON F. et al. "IgE-mediated enhancement of CD4+ T cell responses in mice requires antigen presentation by CD11c+ cells and not by B cells". **PloS One,** v. 6(7), p. e21760, 2011.

HERBST R.S. "Review of epidermal growth factor receptor biology". Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., v. 59(2 Suppl), p. 21–6, 2004.

HIROI M., OHMORI Y. The Transcriptional Coactivator CREB-binding Protein Cooperates with STAT1 and NF-_B for Synergistic Transcriptional Activation of the CXC Ligand 9/Monokine Induced by Interferon- γ Gene. J. BIOL. CHEM., v. 278, p. 651–660, 2003.

HIROI M., OHMORI Y. Transcriptional Synergism between NF-κB and STAT1. J. Oral Biosci., v. 47(3), p. 230-242, 2005.

HOFFMANN A., NATOLI G. & GHOSH G. Transcriptional regulation via the NF-κB signaling module. **Oncogene**, v. 25, p. 6706–6716, 2006.

HOODLESS P.A. et al. "MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways". **Cell**, v. 85(4), p. 489–500, 1996.

HOU J. et al. "Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2". **Immunity**, v. 2(4), p. 321–9, 1995.

HOVANESSIAN A. G. The Double Stranded RNA-Activated Protein Kinase Induced by Interferon: dsRNA-PK. Journal of Interferon Research., v. 9(6), p. 641-647, 1989.

HUANG Y. et al. Complement factor B gene regulation: synergistic effects of TNF-alpha and IFN-γamma in macrophages. J. Immunol., v. 169, p. 2627–2635, 2002.

HUXFORD T., MALEK S., GHOSH G. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., v. 64, p. 533–540, 1999.

ISAACS A., LINDERMANN J. Virus interference. I. The interferon. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 147, p. 258–267, 1957.

JAHNKE A., JOHNSON J. P. Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF-alpha and IFN- γ amma is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat1 alpha (p91) that can be activated by both IFN- γ amma and IFN-alpha. **FEBS Lett**., v. 354, p. 220–226, 1994.

KAPPERS J.A. The development, topographical relations and innervation of the epihysis cerebri in the albino rat. **Z Zellforsch**, v. 52, p. 163–215, 1960.

KAUR S. et al. Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 105(12), p. 4808-13, 2008.

KERR I. M., STARK G. R. The control of interferon-inducible gene expression. **FEBS Lett**., v. 285, p. 194–198, 1991.

KLEIN D.C. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland, in Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. **Ciba Foundation Symposium 117**, (Everett D and Clark D eds), Pitman, London, p. 38–56, 1985.

KUMAR A. et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 91, p. 6288–6292, 1994.

LAWRENCE T. et al. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. **Nature**, v. 434, p. 1138–1143, 2005.

LEDEBUR H. C., PARKS T. P. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 933–943, 1995.

LI X. et al. A pineal regulatory element (PIRE) mediates transactivation by the pineal/retinaspecific transcription factor CRX. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** USA, v. 95, p. 1876–1881, 1998.

LICHTMAN A.H., ABBAS A.K. Cellular and molecular immunology. **Philadelphia:** Saunders. p. 324–325, 2003.
LIEBERMAN A. P., PITHA P. M., SHIN H. S. M. L. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, USA, v. 86, p. 6348-6352, 1989.

LIU T. & BORJIGIN J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. **Journal of Pineal Research.**, v. 39, p. 91–96, 2005.

LOOK D. C., PELLETIER M. R., HOLTZMAN M. J. Selective interaction of a subset of interferon-gamma response element-binding proteins with the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene promoter controls the pattern of expression on epithelial cells. J. Biol. Chem., v. 269, p. 8952–8958, 1994.

LOPES C. et al. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. J. Pined Res., v. 23, p. 72-78, 1997.

LOTUFO C.M.C. et al. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 258–263, 2006.

LOTUFO C.M.C. et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leucocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 430, p. 351-357, 2001.

MARÇOLA A.S. et al. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. **J. Pineal Res.**, v. 54(2), p. 162-169, 2012.

MARKUS R. P., CECON E., PIRES-LAPA M. A. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κB (NF- κB) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. Int. **J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 10979-10997, 2013.

MARKUS R.P. et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, p. 126-133, 2007.

MATSUMOTO M. et al. Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. **Biol. Chem.**, v. 380, p. 699–703, 1999.

MATSUMOTO T. et al. "Differential interaction of CrkII adaptor protein with plateletderived growth factor alpha- and beta-receptors is determined by its internal tyrosine phosphorylation". **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 270(1), p. 28–33, 2000.

MIGUEZ J.M., SIMONNEAUX V., and PE´VET P. Role of intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. **J. Pineal Res**., v. 23, p. 63–71, 1997.

MIN W., POBER J.S. and JOHNSON D.R. Kinetically coordinated induction of TAP1 and HLA class I y IFN- γ : the rapid induction of TAP1 by IFN- γ is mediated by Stat1 α . J. Immunol., v. 156, p. 3174-3183, 1996.

MOORE R.Y. Neural control of the pineal gland. Behav Brain Res., v. 73, p. 125–130,1996.

MOSSER D.M., ZHANG X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol. Rev.**, v. 226(1), p. 205–18, 2008.

MUNDER M. et al. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 2103–2108, 1998.

MUXEL S.M. et al. Aa-nat promoter kappa B elements induce melatonin synthesis and phagocytosis in macrophages. (personal communication), 2012.

NAJJAR I., FAGARD R. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. **Biochimie**, v. 92, p. 425-444, 2010.

NEISH A.S. et al. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF- κ B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 2558-2569, 1995.

NOVICK D., COHEN B., RUBINSTEIN M. "The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning". **Cell**, v. 77(3), p. 391–400, 1994.

O'DONNELL L.C., DRUHAN L.J., AVALOS B.R. "Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich alpha2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation". **J. Leukoc. Biol.**, v. 72(3), p. 478–85, 2002.

OHMORI Y., HAMILTON T. A. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN- γ amma and TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 154, p. 5235–5244, 1995.

PANGERL B., PANGERL A., and REITER R.J. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. **J. Neural Transm.**, v. 81, p. 17–29, 1990.

PARFITT A., WELLER J.L., KLEIN D.C. Beta-adrenergic blockers decrease adrenergically stimulated n-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. **Neuropharmacology**, v. 15, p. 353–358, 1976.

PESTKA S. et al. Interferons and their actions. Annu. Rev. Biochem., v. 56, p. 727-777, 1987.

PHELPS C.B. et al. Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 29840–29846, 2000a.

PHELPS C.B. et al. Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers. **. Biol. Chem.**, v. 275, p. 24392-24399, 2000b.

PINE R. Convergence of TNFalpha and IFNgamma signaling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/kappaB promoter element. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 4346–4354, 1997.

PIRES-LAPA et al. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. **J. Pineal Res.**, v. 55(3), p. 240-246, 2013.

PONTES G. N. et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **J. Pineal Res.**, v. 41, p. 136–141, 2006.

PONTES G. N. et al. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-a increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonina production. J. Pineal Res., v. 43, p. 365–371, 2007.

PROVENCIO I. et al. A novel human opsin in the inner retina. **J. Neurosc.**, v. 20, p. 600-605, 2000.

RAMANA C. V. et al. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. **Oncogene**, v. 19, p. 2619–2627, 2000.

RAMANA C. V. et al. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA, v. 98, p. 6674–6679, 2001.

RIBELAYGA et al. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. **Endocrinology**, v. 140, p. 1375–1384, 1999b.

RICH B.E., KUPPER T.S. Interleukin 20. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, v. 5(3), p. 243–250, 2006.

RODRIGUEZ I.R. et al. Structural analysis of the human hydroxyindole-O-methyltransferase gene. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 31969-31977, 1994.

ROMERO J.A. and AXELROD J. Pineal beta-adrenergic: diurnal variation in sensitivity. Science, Wash DC, v. 184, p. 1091-1092, 1974.

ROSEBOOM P.H. et al. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 137, p. 3033-3044, 1996.

SALAZAR-MATHER T. P., HAMILTON T. A., BIRON C. A. A chemokineto-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 985–993, 2000.

SCHEIDEREIT C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. **Oncogene**, v. 25, p. 6685–6705, 2006.

SCHRODER K. et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75(2), p. 163-189, 2004.

SENFTLEBEN U. et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. **Science**, v. 293, p. 1495–1499, 2001.

SILVA C.L.M. et al. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 151(2), p. 195-205, 2007.

SIMONNEAUX V. & RIBELAYGA C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol Rev**, v. 55, p. 325-395, 2003.

SIMS S. H. et al. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. **Mol. Cell. Biol**., v. 13, p. 690–702, 1993.

STEHLE J.H. et al. Circadian regulation of CREM: adrenergic signals direct rhythmic expression of a transcriptional repressor in the pineal gland. **Nature**, (Lond), v. 265, p. 314–320, 1993.

STRADA S.J. et al. Effect of norepinephrine on the concentration of adenosine 3,5-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. **Endocrinology**, v. 90, p. 1470–1475, 1972.

SUBRAMANIAM P. S., TORRES B. A., JOHNSON H. M. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. **Cytokine**, v. 15, p. 175–187, 2001.

SUGDEN D. and KLEIN D.C. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. **J. Neurochem**, v. 50, p. 149–155, 1988.

TAMURA E. K. et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endotelial cells. **J. Pineal Res.**, v. 46, p. 268–274, 2009.

TAMURA E. K., SILVA C. L. M., MARKUS R. P. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. J. Pineal Res., v. 41(3), p. 267-274, 2006.

TANIGUCHI T., TAKAOKA A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p. 111–116, 2002.

TRICOIRE H. et al. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. **Endocrinology**, v. 143, p. 84–90, 2002.

TUNDUP S., SRIVASTAVA L., HARN D.A. "Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans". **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1253, p. E1–E13, 2012.

VANECEK J. et al. Atypical synergistic 1- and -adrenergic regulation of adenosine 3,5monophosphate and guanosine 3,5- monophosphate in rat pinealocytes. **Endocrinology**, v. 116, p. 2167-2173, 1985.

VENKATARAMAN V., DUDA T., and SHARMA R.K. The 2D/A-adrenergic receptor linked membrane guanylate cyclase: a new signal transduction system in the pineal gland. **FEBS Lett,** v. 427, p. 69–73, 1998.

WHEELER D.L., IIDA M., DUNN E.F. "The role of Src in solid tumors". **Oncologist,** v. 14(7), p. 667–78, 2009.

WISDOM R., JOHNSON R.S., MOORE C. "c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms". **EMBO J.**, v. 18(1), p. 188–97, 1999.

WITHYACHUMNARNKUL B. et al. Changes in indole Metabolism in Organ Cultures Rat Pineal Glands Induced by Interferon- γ . Journal of Pineal Research, v. 8, p. 313-322, 1990.

WITTHUHN B.A., et al. "Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signaling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells". **Nature,** v. 6485, p. 153–157, 1994.

WONG A. H. et al. Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. **EMBO J.**, v. 16, p. 1291–1304, 1997.

XIE Q. W., KASHIWABARA Y., NATHAN C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 4705–4708, 1994.

YAGI R., ZHU J., PAUL W.E. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. **Int Immunol**., v. 23(7), p. 415-20, 2011.

YOUNG H. A. Regulation of interferon-gamma gene expression. J. Interferon Cytokine Res., v. 16, p. 563–568, 1996.

ZAMANIAN-DARYOUSH M. et al. NF-kappaB activation by double-stranded-RNAactivated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 1278–1290, 2000.

ZHONG H., MURPHY T. J., MINNEMAN K. P. Activation of Signal Transducers and Activators of Transcription by α1A-Adrenergic Receptor Stimulation in PC12 Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 57(5), p. 961-967, 2000.

BIOGRAFIA

Formação acadêmica

 2012 - atual Mestrado em Ciências Biológicas Universidade de São Paulo, USP, SP
Título: Caracterização dos efeitos moleculares do IFN-γ sobre a produção de melatonina por glândulas pineais de ratos. Laboratório de Neuroimunoendocrinologia.

2007 - 2012 Graduação em Ciências Biológicas Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Bacharelado e Licenciatura

Prêmios e títulos

2011	Menção	Honrosa,	FeSBE	-	Federação	de	Sociedades	de	Biologia
	Experimental.								

2011 Menção Honrosa, Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.

Participação em eventos e apresentação de trabalhos

1. Organização do evento (monitoria): <u>V Encontro Nacional de Ensino de Biologia</u> (<u>ENEBIO</u>), 8-11 de setembro de 2014. **Local**: IB-USP, São Paulo, SP.

2. Coordenação do módulo "Bases Cronobiológicas da Fisiologia" e apresentação oral no <u>X</u> Curso de Inverno do IB-USP: Tópicos em Fisiologia comparativa, 2014.

Título da apresentação: O Relógio Biológico de mamíferos: desvendando as bases fisiológicas e moleculares dos ritmos circadianos. Local: IB-USP, São Paulo, SP.

3. Apresentação de pôster em <u>FASEB Science Research Conference - Melatonin Biology:</u> <u>Actions & Therapeutics, 2013.</u>

Título: *IFN-y increases melatonin production induced by norepinephrine and activates NF-κB and STAT3 pathways in rat pineal glands.* **Local:** Niagara Falls, NY – EUA

4. Apresentação oral "1 minute talk" em FASEB Science Research Conference - Melatonin

Biology: Actions & Therapeutics, 2013.

Título: *IFN-y increases melatonin production induced by norepinephrine and activates NF-κB and STAT3 pathways in rat pineal glands.* **Local:** Niagara Falls, NY – EUA

5. Aplicação de dinâmicas no projeto de extensão <u>Bio na Rua, CABIO - USP, 2012.</u> **Tema: Sexualidade humana Local:** Jardim São Remo, São Paulo – SP

6. Apresentação oral no <u>IX Curso de Inverno do IB-USP: Tópicos em Fisiologia</u> <u>Comparativa, 2013.</u>

Título: Os Relógios Biológicos. Local: IB-USP, São Paulo – SP

7. Apresentação oral no <u>IX Curso de Inverno do IB-USP: Tópicos em Fisiologia</u> <u>Comparativa, 2012.</u>

Título: Os Relógios Biológicos. Local: IB-USP, São Paulo – SP

8. Apresentação de Pôster na FeSBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011.

Título: Interferon-gamma decreases pineal NFKB nuclear translocation and potentiates melatonin production.

Local: Rio de Janeiro, RJ.

9. Apresentação de Pôster no <u>Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011.</u> **Título:** *Interferon-gamma decreases pineal NFKB nuclear translocation and potentiates melatonin production.*

Local: Centro de Convenções de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto – SP.

 Apresentação oral no <u>VI Curso de Inverno do ICB-USP para professores da rede pública:</u> <u>Fisiologia da Reprodução Humana do Comportamento ao Desenvolvimento, 2009.</u> **Título: Dinâmicas em sala de aula. Local:** ICB-USP, São Paulo - SP

Artigo publicado no período

BARBOSA-LIMA, L. E., GUERRERO-VARGAS, N. N. O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. Revista da Biologia, v. 12, n. 2, p. 1–7, 2014.