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

São Paulo

2015

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-O-metiltransferase (HIOMT). Além das funções cronobiológicas, a pineal apresenta comunicação bidirecional com o sistema imunológico, descrita pelo conceito do eixo imune-pineal. 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-κB). 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-κB 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-κB, 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-γ aumenta a translocação nuclear de STAT1 e de dímeros de NF-κB ativadores da transcrição gênica. Além disso, a incubação de pineais com IFN-γ aumenta a transcrição de 27 genes relacionados com a via das STATs. IFN-γ 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 NF-κB 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.

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 N-acetilserotonin (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-κB 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-γ) 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-κB, 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-κB 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-κB pathway inhibits the increase in melatonin and NAS productions and also of *Aana*t 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-κB pathway on the hormonal production of the pineal gland.

INTRODUÇÃO

IFN-γ: 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-κB 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.

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 bradicinina (TAMURA; 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-κB (CARVALHO-SOUSA et al., 2011). Além disso, sabe-se que o principal componente da membrana de bactérias gram-negativas, 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-κB (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-κB 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 (hipotálamo-pituitária-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-κB (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-κB (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 α1-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-κBp; -151/-9), contendo 1 sítio de ligação ao NF-κB, era reprimida na presença de um inibidor de NF-κB (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.

Fator de transcrição NF-κB: 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 *NfκB1*, *NfκB2*, *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-κB se encontram geralmente associados a proteínas do tipo IκB (SCHEIDEREIT, 2006). Quando a via do NF-κB é ativada, o IκB é fosforilado pelo complexo IκB quinase ativado (IKK) e posteriormente degradado por proteassomas. O dímero de NF-κB, livre, migra para o núcleo e modula a expressão gênica por meio de interações com sequências κB do DNA (para revisão, HOFFMANN; NATOLI; GHOSH, 2006).

Assim como para o NF-κB, sabe-se que a família de proteínas IKK e IκB também é diversa. O complexo IKK consiste em duas subunidades homólogas de quinases, IKKα e IKKβ,

e uma subunidade regulatória, a IKKγ (ou NEMO). A via de ativação canônica do NF-κB envolve atividade da IKKβ, cujos principais alvos são: IκBα, IκBβ e IκBε (HACKER; KARIN, 2006; SCHEIDEREIT, 2006). As vias de ativação não-canônicas envolvem diversas outras combinações, como ativação da IKKα, a qual processa a proteína p100 a subunidades p52 (SENFTLEBEN et al., 2001); ou ativação de outros componentes da família IκB envolvidas com modulação direta da expressão gênica (p100, p105, BCL-3, IκBNS e IκBζ) (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-κB envolve mecanismos de regulação negativa em diferentes níveis intracelulares. Um dos principais mecanismos de regulação da atividade do NF-κB é a ressíntese de proteínas IκB, 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 IKKα 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-κB (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-κB, especificamente das subunidades RelA e c-Rel, ativadoras de transcrição gênica (MUXEL et al., 2012).

Sabe-se que, assim como o NF-κB, 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-κB 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-γ sinaliza via STAT1 e via NF-κB na glândula pineal, promovendo um aumento da produção de NAS e melatonina induzida por noradrenalina.**

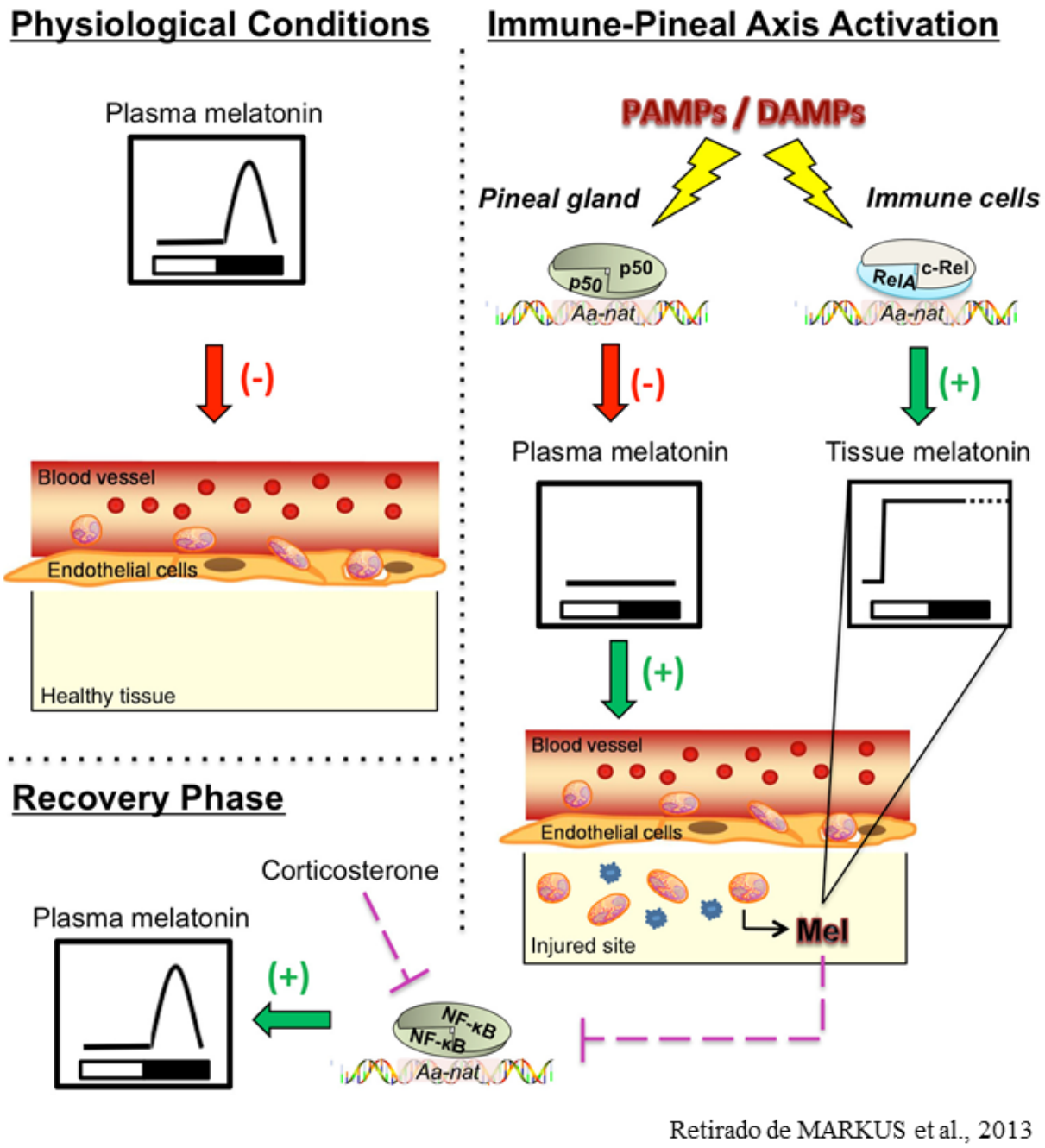

Figura 1 - Eixo imune-pineal. A glândula pineal, além de ser um importante fototransdutor neuroendócrino em mamíferos, também participa ativamente da montagem e resolução de respostas inflamatórias. No início de um processo inflamatório, DAMPS e PAMPS, como o TNF e o LPS, ativam a via do NF-κB na glândula 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.

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS[1]

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.

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

CARDINALI D. P., NAGLE C. A., ROSNER J. M. Gonadotrophin- and prolactin-induced 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 double-stranded 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-κB 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 cyclin-dependent 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-γamma is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat1 alpha (p91) that can be activated by both IFN-γamma 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/retina-specific 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 platelet-derived 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 Stat1α. **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-κB 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-γamma 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 3,5-monophosphate 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-RNA-activated 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.