Cláudia Emanuele Carvalho de Sousa

Caracterização do eixo imune-pineal: Mecanismo de
ação do controle da função pineal pela citocina pró-
inflamatória TNF

*Characterization of immune-pineal axis: Mechanism of
action of the control of pineal function by pro-inflammatory cytokine
TNF*

São Paulo

2011

Cláudia Emanuele Carvalho de Sousa

Caracterização do eixo imune-pineal: Mecanismo de
ação do controle da função pineal pela citocina pró-
inflamatória TNF

*Characterization of immune-pineal axis: Mechanism of
action of the control of pineal function by pro-inflammatory cytokine
TNF*

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

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Carvalho-Sousa, Cláudia Emanuele

Caracterização do eixo- imune-pineal : mecanismo de ação do controle da função pineal pela citocina pró-inflamatória TNF.

120 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. 2011.

1. Glândula Pineal. 2. NFkB. 3. TNF. I. Pelkemann, Regina Markus. II. Título. III.
Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora

Índice

I. Introdução	8
1. Glândula Pineal	8
1.1. Histórico da glândula pineal.....	8
1.2. Aspectos Morfofuncionais - Anatomia, Histologia, Inervação e Vascularização	10
1.3. Produção de melatonina pela glândula pineal.....	14
1.4. Da secreção aos mecanismos de ação da melatonina	20
2. Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	21
2.1. Caracterização do TNF	21
2.2. Sinalização do TNF	23
3. Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NFKB)	27
3.1. Ativação do NFKB	29
4. Eixo-Imune-Pineal	33
4.1. Melatonina e defesa.....	33
4.2. O tempo na resposta imune: relação entre melatonina e adaptação.....	35
4.3. A construção de um novo conceito: Pineal como alvo para mediadores da resposta imune.....	37
VI. Conclusões.....	90
VII. Resumo.....	91
VIII. Abstract	92
IX. Referências Bibliográficas.....	93

Lista de abreviaturas

5-HT- serotonina	FADD - <i>Fas-associated DD protein</i>
5-HTP- 5-hidroxitriptofano	GABA- ácido gama-aminobutírico
AAAD- enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos	GCS- gânglio cervical superior
AA-NAT- enzima arilalquilamina N-acetiltransferase	GFAP- <i>glial fibrillary acidic protein</i> , marcador de astrócitos
AC- enzima adenilil ciclase	GR- receptor de glicocorticóide
AMPc- monofosfato de adenosina cíclico	HIOMT- enzima hidroxindol-O-metiltransferase
AP-1- proteína ativadora 1	IFN- γ - interferon gama
ATP- adenosina trifosfato	IKB- proteína inibitória kappa B
BCG- Bacilo Calmette-Guerin	IKK- proteína quinase de IKB
CD14- <i>cluster differentiation 14</i>	IL- interleucina
COX- ciclooxygenase	iNOS- sintase de óxido nítrico induzível
CRE- elemento responsivo a AMPc	IP3- inositol trifosfato
CREB- proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc	LPS- lipopolissacarídeo
DAB- 3, 3'' -diaminobenzidina	MAPK- <i>mitogen-activated protein kinase</i>
DAF-FM-DA- 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína	MEL- melatonina
DAPI- 4', 6- diamidino-2-fenilindol	MTT- brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio
EMSA- ensaio de eletromobilidade por retardo em gel	NA- noradrenalina
	NAS- N-acetilserotonina
	NEMO- modulador essencial de NFkB

NFKB- fator nuclear kappa B

NLS- sequência de localização nuclear

NSQ- núcleos supraquiasmáticos

PACAP- peptídeo ativador de adenilil
ciclase na pituitária

PAMP- padrões moleculares associados
à patógenos

PBS- *phosphate buffer saline*

PDTC- pirrolidinaditiocarbamato

PKA- proteína quinase dependente de
AMPc

PKC- proteína quinase dependente de
cálcio

PLC- fosfolipase C

pM, nM, μ M- picomolar, nanomolar e
micromolar, respectivamente

PVN- núcleos paraventriculares

RHD- domínio de homologia Rel

RIP1- *receptor-interacting protein 1*

SNC- sistema nervoso central

SPI- *specificity protein 1*

TACE- enzima conversora de TNF alfa

TAD- domínio de transativação

TGF- β - fator de crescimento
transformador beta

TLR4- receptor do tipo toll 4

TNF- fator de necrose tumoral

TNF-R- receptor de TNF

TPOH- triptofano hidroxilase

TRAF- *TNF receptor-associated factor*

μ m- micrômetro

Introdução

I. INTRODUÇÃO

I. GLÂNDULA PINEAL

1.1. Histórico da glândula pineal

A identificação da pineal como órgão distinto foi feita entre os séculos III e IV a.C. por Herófilo. Séculos mais tarde Claudio Galeno (130-200), médico e filósofo grego caracterizou o tecido localizado no cérebro humano como uma glândula e nomeou-a de *conarium*. Este termo em latim (cone) lembra a forma de uma pinha e mais tarde o nome desta glândula passou a ser pineal (Zrenner, 1985). Já no século XVII, René Descartes (1596-1650), conhecido por numerosas contribuições matemáticas e filosóficas, escreveu tratados sobre a concepção do homem e suas duas naturezas: o corpo e a alma. Sua preocupação baseava-se em como essas duas partes interagiam, ou mesmo se conectavam. Nessa visão, a pineal aparecia como o elo de ligação física entre o corpo e a alma. Descartes foi o primeiro a especular que a pineal seria a sede da alma e regularia o fluxo de espíritos nos animais, controlando funções como os movimentos corporais, memória e imaginação. O órgão também foi chamado de corpo cervical ou epífise cerebral, este último nome se refere à localização da pineal acima do cérebro em contraposição à hipófise que está localizada na sela túrcica, abaixo do cérebro. Assim como para outros órgãos e estruturas anatômicas a cunhagem do nome da glândula refletiu o estado do conhecimento e do desenvolvimento tecnológico da época.

Os estudos científicos da glândula pineal tiveram poucos progressos até a segunda metade do século XIX. No final desse século a anatomia, histologia, embriologia e inervação da glândula foram extensivamente elucidadas por autores como Ahlborn, Rabl-Ruckhardt, Graaf, Korschelt e Spencer que, em conjunto, mostraram

semelhanças entre a pineal de mamíferos e a epífise de vertebrados inferiores. Posteriormente, Studnicka (1905) estabeleceu que a glândula pineal era filogeneticamente derivada de órgãos fotorreceptores, permanecendo, no entanto, sua função desconhecida (para revisão, Simonneaux & Ribelayga, 2003).

A primeira função fisiológica atribuída à pineal foi sugerida pela análise de um caso clínico propondo a relação entre um tumor na pineal e o aparecimento da puberdade precoce. Essa observação foi feita pelo médico Otto Heubner que relacionou a alteração gonadal com o tumor da pineal. Vários estudos se seguiram na tentativa de entender a ação dos hormônios da pineal sobre a fisiologia reprodutiva. Muitos desses trabalhos avaliaram o efeito dos extratos da pineal sobre o trato reprodutor (Simonnet *et al.*, 1951; Moszkowska, 1951; Kitay & Altschule, 1954). A associação da pineal com o sistema reprodutor ficou estabelecida desde então e passou a ser estudada por diferentes pesquisadores.

No final da década de 1950, um grupo de pesquisadores conseguiu isolar e caracterizar a partir de extratos de pineal bovina a indolamina N-acetil-5-metoxitriptamina (Lerner *et al.*, 1959), denominada melatonina por sua habilidade de promover a agregação de melanóforos da pele de anfíbios (Lerner *et al.*, 1958). Na década de 1960 é estabelecida a relação entre a luz ambiental e a atividade metabólica da glândula pineal (Wurtman *et al.*, 1963; 1967, Quay, 1967), sendo evidenciado o ritmo diário de serotonina (Quay, 1963) e da melatonina em pineais de ratos (Quay, 1964). Destaca-se a partir dessa concepção o entendimento de que o fotoperíodo seria um fator determinante na adaptação de várias espécies, regulando a fisiologia e o comportamento reprodutivo. Nesse sentido, observou-se que a pineal é responsável pela resposta endócrina às adaptações sazonais (Hoffman & Reiter, 1965a,b). A chegada de dias curtos ou longos significa respostas diferentes dependendo das espécies estudadas.

Em resumo, pode-se perceber que a busca sobre o conhecimento da glândula pineal é antiga. A caracterização de sua origem e estrutura e, por fim, o entendimento do controle de sua função por fatores externos representam contribuições notáveis e universais sobre a pineal no século XX. Outros aspectos de sua fisiologia e outras ações de seu hormônio melatonina também tiveram destaque e desde então constituem diversas linhas de pesquisa dos dias atuais.

1.2. Aspectos Morfofuncionais - Anatomia, Histologia, Inervação e Vascularização

1.2.1. Estrutura e composição celular

Existe uma grande variação morfológica da glândula pineal ao longo da escala filogenética tanto intra quanto interespecífica. Anatomicamente, é considerada parte do epitélamo, situada dorsalmente à região caudal do diencéfalo. Na maioria dos mamíferos a glândula pineal se localiza na porção dorsal do tronco cerebral conectada por um pedúnculo às comissuras habenular e posterior (Møller, 1992; Vollrath, 1981). Em humanos, a pineal desenvolve-se a partir de uma evaginação do teto do terceiro ventrículo (Oksche, 1965) que inicia-se no segundo mês de gestação e sua localização é mantida na vida adulta. Em roedores, a pineal migra dorso-caudalmente durante a ontogênese e se localiza centralmente no topo do cérebro entre os hemisférios cerebrais e o cerebelo (Vollrath, 1981; Heidbüchel & Vollrath, 1983; 1999; Møller & Baeres, 2002).

O parênquima da pineal de mamíferos consiste em cordões de células separadas por capilares com grande espaço perivascular. Em espécies de maior porte, o parênquima é dividido em lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo frouxo derivado da pia-máter. O tipo celular mais abundante na pineal de mamíferos é o pinealócito, mas também são encontradas células da glia (Korf, 2000; Möeller & Baeres,

2002). Em mamíferos, apesar dos pinealócitos serem células tipicamente endócrinas, ainda expressam proteínas características de células fotorreceptoras, tais como opsinas (Korf *et al.* 1985; Huang *et al.*, 1992), recoverina (Korf *et al.*, 1992), e antígeno S (Korf *et al.*, 1985, 1990). Em vertebrados não mamíferos, os pinealócitos além de produzirem o hormônio do escuro, melatonina, também são células fotorreceptoras (Ekstro & Meissl, 2002).

A presença da glia na pineal já foi considerada questionável e o termo célula intersticial foi utilizado para sua denominação (Wolfe, 1965). Além disso, as células intersticiais foram tidas como pinealócitos tipo II (Calvo & Boya, 1983). O desenvolvimento de marcadores químicos específicos para células gliais e os estudos ultra-estruturais confirmaram a presença peculiar de células gliais típicas no parênquima da pineal (Luo *et al.*, 1984). Células da região proximal do parênquima da glândula apresentam imunoreatividade positiva para proteína fibrilar associada à astrócitos (GFAP) (Møller *et al.*, 1978; López- Muñoz *et al.*, 1992; Suzuki & Kachi, 1995). Para identificação da microglia na pineal foram utilizados os mesmos marcadores de macrófagos: ED-1, OX-42 e OX-6 que, em conjunto, revelam a imunoreatividade positiva em todo parênquima (Tsai & McNulty, 1997; Jiang-Shieh *et al.*, 2003, 2005). Dessa forma, a glia apresenta localização diferencial, os astrócitos estão localizados próximos ao pedúnculo pineal, na porção proximal da glândula e a microglia está distribuída de forma difusa por todo o parênquima da glândula entre os pinealócitos.

1.2.2. Vascularização

A pineal se destaca por sua intensa vascularização, já apontada nos estudos anatômicos de Andreas Versalius (1515–1564) (para revisão, Stanley, 1994). Ela recebe suprimento sanguíneo por pequenas ramificações arteriolares provenientes das artérias

coroidais. Por sua vez, cada uma das artérias origina-se da artéria cerebral posterior (Reiter, 1981). Em ratos, a glândula também se destaca por ter um alto fluxo sanguíneo; o maior comparado às outras glândulas do organismo (Goldman & Wurtman, 1964).

A pineal é reconhecida como um órgão circumventricular (Johnson & Gross, 1993; Duvernoy & Risold, 2007). Esses órgãos apresentam características morfológicas que os distinguem do resto do sistema nervoso (Hofer, 1958). São estruturas localizadas na linha média do cérebro circundando o terceiro e quarto ventrículo e que apresentam a barreira endotelial mais frouxa devido a ausência de junções oclusivas e a presença de capilares fenestrados (Johnson & Gross, 1993). Essas características permitem a comunicação direta entre o sangue e líquido cefalorraquidiano sendo funcionalmente semelhantes a portões através da barreira hematoencefálica, o que levou a comparação dessas estruturas a “janelas do cérebro” (Gross, 1987).

1.2.3. Inervação

O padrão de inervação da pineal está diretamente relacionado às diferenças anatômicas da pineal entre as espécies devido, principalmente, à posição da pineal em relação ao cérebro. A glândula pineal recebe uma inervação complexa com fibras nervosas de diferentes origens. A principal fonte consiste em fibras pós-ganglionares simpáticas provenientes do gânglio cervical superior que chegam até a pineal através do nervo conário (Bargmann, 1943; Kappers, 1960). Esta é a inervação mais compreendida e estudada em humanos e em outros mamíferos. A atividade destas fibras pós-ganglionares é regulada pelos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ) que, por sua vez, recebem informações diretamente de células ganglionares retinianas via trato retino-hipotalâmico (Kappers, 1960). As terminações nervosas simpáticas contêm, além do neurotransmissor noradrenalina, os neuromoduladores neuropeptídeo Y (NPY)

(Schon *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 1991; Mikkelsen & Møller, 1999) e ATP (adenosina trifosfato) (Mortani-Barbosa *et al.*, 2000). A noradrenalina tem grande importância funcional pois é o estímulo indutor da síntese de melatonina (Klein & Weller., 1970) enquanto o ATP e o NPY atuam como co-transmissores e regulam a estimulação adrenérgica. O ATP é co-liberado com a noradrenalina pelos terminais simpáticos e interage com receptores do subtipo P2Y1 (Ferreira *et al.*, 2001) potencializando a síntese de melatonina induzida por noradrenalina (Ferreira *et al.*, 2003). Já o NPY modula a transmissão noradrenérgica por mecanismos pré e pós-sinápticos. A estimulação com NPY de receptores pós-sinápticos inibe a liberação de noradrenalina (Vacas *et al.*, 1987; Simonneaux *et al.*, 1994) e a formação de AMPc (Olcese, 1991; Harada *et al.*, 1992; Simonneaux *et al.*, 1994). Por outro lado, embora haja redução de AMPc, o NPY mostrou exercer efeito positivo sobre a síntese de melatonina em glândula pineal de rato (Vacas *et al.*, 1987, Simonneaux *et al.*, 1994).

As técnicas neuroanatômicas mais modernas como o traçamento neuronal, a imuno-histoquímica e a hibridização *in situ* tiveram grande destaque no entendimento da inervação não simpática. Os primeiros estudos ultra-estruturais da pineal já sugeriam a presença de fibras extra-simpáticas pela presença de botões sinápticos contendo vesículas granulares do tipo peptidérgica e colinérgica. Outra importante evidência anatômica foi obtida pela demonstração de que após a remoção do gânglio cervical superior diversas fibras peptidérgicas permaneciam na pineal (Møller *et al.* 1996). Da mesma forma, o uso da técnica de traçamento viral confirmou a existência de conexões neurais entre algumas áreas cerebrais e a pineal em diversas espécies de roedores (Møller, 1999; Møller & Baeres, 2002).

As fibras centrais derivam de diferentes regiões encefálicas, especialmente do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) (Korf & Wagner 1980; Møller *et al.*, 1990,

Larsen *et al.*, 1991), folheto intergeniculado talâmico (IGL) (Mikkelsen & Møller, 1990; Cipolla *et al.*, 1994) e núcleo dorsal da rafe (Leander *et al.* 1998; Møller & Hay-Schmidt, 1998). Estas projeções terminam, em sua maior parte, na porção proximal da glândula através das comissuras habenular e posterior (Kappers, 1960, Møller, 1978) e do pedúnculo pineal. Também estão presentes inervações de outras áreas cerebrais e periféricas que contribuem para liberação de uma variedade de neuropeptídeos, a citar: substância P, PACAP (do inglês, *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*), CGRP (do inglês, *calcitonin gene-related peptide*), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e ácido gama-aminobutírico (GABA). Em resumo, a inervação autonômica simpática e parassimpática, bem como inervação direta proveniente do sistema nervoso central, projetam-se sobre a pineal. Destas, o efeito funcional da inervação simpática é a mais conhecida e estudada.

1.3. Produção de melatonina pela glândula pineal

1.3.1. Controle neural

As mudanças diárias nas condições de iluminação ambiental geram impactos em vários aspectos da vida. Como resposta adaptativa vários processos fisiológicos e comportamentais são rítmicos. Alguns são meramente reativos a essas condições externas e outros são antecipatórios, controlados pelo relógio biológico interno. Em mamíferos, o relógio biológico central é localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo anterior. Estes núcleos geram um ritmo endógeno circadiano com período muito próximo a 24 horas (para revisão, Reppert & Weaver, 2002). Os núcleos supraquiasmáticos têm papel essencial na variação diária da produção de melatonina,

gerando o ritmo e propagando a resposta à luz detectada pela retina (para revisão Moore, 1997; Kennaway & Wright, 2002).

A informação luminosa é percebida por meio do fotorreceptor melanopsina presente nas células ganglionares retinianas, transformada em um sinal elétrico e transmitida pelo trato retino-hipotalâmico aos NSQ (Provencio *et al.*, 2000). Estes, através de uma via polissináptica, projetam-se para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) promovendo a liberação de GABA (Kalsbeek *et al.*, 1999, 2000). Portanto, os NSQ controlam o ritmo da produção de melatonina por imposição de um sinal inibitório GABAérgico sobre o PVN durante a fase de claro, inibindo assim, a produção de melatonina pela pineal neste ponto da via (Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999). Na fase escura do dia, o PVN é ativado a partir dos NSQ por uma via glutamatérgica que promove a ativação de uma via polineural que chega à coluna intermediolateral da medula espinal. Fibras pré-ganglionares simpáticas projetam-se ao gânglio cervical superior que, por sua vez, emite neurônios pós-ganglionares simpáticos que inervam diretamente a pineal e liberam noradrenalina (Wurtman *et al.*, 1967) e ATP (Mortani-Barbosa, 2000) induzindo a síntese de melatonina (revisito por Simonneaux e Ribelayga, 2003; Perreau-Lenz *et al.*, 2003).

1.3.2. Via biossintética da melatonina

Como mencionado anteriormente, na ausência de iluminação ambiental as fibras simpáticas que inervam a pineal liberam os co-transmissores noradrenalina e ATP (Mortani-Barbosa *et al.*, 2000). A noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos interage com receptores pós-sinápticos dos tipos $\alpha 1$ e $\beta 1$ -adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos e o ATP promove a ativação de receptores P2Y1 (Ferreira *et al.*, 1994, 2001). A ativação dos adrenoceptores β é essencial para a indução da síntese de

melatonina enquanto que a estimulação de adrenoreceptores alfa, ou de receptores purinérgicos P2Y1 potencia a resposta desencadeada por ativação dos adrenoreceptores β (Mortani-Barbosa, 2000; Klein *et al.*, 1983).

A ativação dos receptores $\beta 1$ induz a ativação da proteína G estimulatória (Gs) que, por sua vez, ativa a enzima adenilil ciclase (AC) promovendo a formação do segundo mensageiro monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O aumento de AMPc ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) induzindo a transcrição do gene (roedores) e/ou potenciando a atividade (roedores, ungulados e primatas) da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Este é um dos passos chave para a síntese de melatonina pois resulta no padrão de atividade rítmica desta enzima controlado pelo ciclo claro-escuro (Klein & Weller, 1970).

Os receptores alfa adrenérgicos são acoplados à proteína Gq que, ao se ligarem a noradrenalina, ativam a enzima fosfolipase C (PLC) promovendo aumento do cálcio intracelular (Ca^{+2}) via inositol trifosfato (IP3) e, conseqüentemente, a ativação da proteína quinase dependente de cálcio (PKC) (Sugden *et al.*, 1985; Vanecek *et al.*, 1985). A co-transmissão purinérgica também atua por mecanismo semelhante ao induzir a ativação da enzima PLC e conseqüente elevação dos níveis de cálcio (Ferreira *et al.*, 2001, 2003). Dessa forma, a estimulação dos receptores $\alpha 1$ e P2Y1 convergem com a resposta β -adrenérgica por promoverem a regulação positiva da PKC sobre a adenilil ciclase e portanto potencializando a via de sinalização necessária para transcrição da AA-NAT. As cascatas de sinalização estão representadas em forma esquemática na figura 1.

A síntese de melatonina é iniciada pela captação do aminoácido triptofano da corrente sanguínea. Esse precursor é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase e é, em seguida, descarboxilado formando serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). A serotonina é acetilada pela enzima AA-NAT à N-

acetilserotonina que é, por fim, convertida em melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (Auerold & Weissbach, 1960).

1.3.3. Regulação transcricional e pós-transcricional da enzima AA-NAT

Existem diferenças pontuais na regulação da via biossintética de melatonina entre as espécies de vertebrados. Em comum, a parte final da via neural consiste na liberação circadiana de noradrenalina sobre a glândula exclusivamente à noite. A síntese de melatonina é melhor estudada em roedores onde sua regulação ocorre no nível transcricional. Nessas espécies, a resposta beta-adrenérgica na glândula promove a ativação da via de transcrição AMP cíclico- proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila o fator de transcrição CREB (do inglês, *cyclic-AMP regulating element binding*) e a enzima AA-NAT. CREB fosforilado se liga ao elemento CRE (do inglês, *cAMP-responsive element*) do DNA no promotor do gene da AA-NAT promovendo a transcrição gênica. A fosforilação da AA-NAT induz a sua interação com a chaperona 14-3-3 (Ganguly *et al.*, 2001, 2002) que a da degradação proteassomal (Gastel *et al.*, 1998; Ganguly *et al.*, 2001). Tanto o gene quanto a proteína da AA-NAT apresentam um ritmo circadiano com níveis de transcrição 100-150 vezes maior durante a noite (Borjigin *et al.*, 1995; Roseboom *et al.*, 1996; Garidou *et al.*, 2001).

Em ungulados e primatas os níveis do RNAm do gene da AA-NAT não apresentam diferenças significativas entre o dia e noite (Coon *et al.*, 1995; Schomerus *et al.*, 2000; Johnston *et al.*, 2004) indicando a expressão constitutiva deste gene e sugerindo que a regulação da atividade da AA-NAT seja pós-transcricional. Durante o dia, a proteína, assim que traduzida, é rapidamente degradada por atividade proteassomal (Korf *et al.*, 1998; Stehle *et al.*, 2001). Na fase de escuro a ativação da via

AMPC/PKA (para revisão Ganguly *et al.*, 2002), a fosforilação da AA-NAT e a consequente ligação com a chaperona 14-3-3 impedem sua degradação. Como já descrito anteriormente, a produção circadiana de melatonina é gerada pelo ritmo de atividade/transcrição da enzima AA-NAT. Já a enzima HIOMT não apresenta ritmo diário evidente sendo sua atividade regulada a longo termo (Axelrod *et al.*, 1965; Sugden & Klein, 1983,a,b; Ribelayga *et al.*, 1997) e participando da resposta sazonal da síntese de melatonina (Ribelayga *et al.*, 1999, 2000).

FIGURA 1. Vias de sinalização da biossíntese de melatonina na pineal de ratos. No escuro as fibras pós-ganglionares simpáticas liberam noradrenalina (NA) ativando os receptores β e α -adrenérgicos. A ativação dos receptores β_1 promove a ativação da adenilil ciclase (AC) que resulta no aumento dos níveis de AMPc, ativação da proteína PKA e fosforilação o fator de transcrição CREB, que induz a transcrição da AA-NAT (indicado nas setas verdes). A ativação dos receptores α_1 pela noradrenalina e P2Y₁ pelo co-transmissor ATP induz cascatas de sinalização que convergem com a resposta β -adrenérgica (setas vermelhas). Estas vias levam ao aumento dos níveis de cálcio e a consequente ativação da PKC que, por sua vez, potencia a atividade da enzima AC. A PKA também fosforila a enzima AA-NAT após sua tradução, permitindo sua ligação à chaperona 14-3-3 e sua estabilização e ativação. AA-NAT é o fator chave para síntese de melatonina, pois a via só prossegue após a sua tradução, como esquematizado na parte direita da figura.

1.4. Da secreção aos mecanismos de ação da melatonina

A melatonina é uma molécula altamente lipofílica. Ao invés de ser armazenada na pineal após sua síntese, ela é liberada nos capilares se ligando à albumina (Cardinali *et al.*, 1972). A melatonina secretada tem meia vida curta na circulação de aproximadamente 30 minutos, dependendo da espécie examinada (Cardinali *et al.*, 1972; Waldhauser *et al.*, 1984). A melatonina é metabolizada primariamente no fígado onde sofre uma reação de duas etapas, primeiro é hidroxilada, seguida da conjugação com sulfato ou glucoronato pelo citocromo p450 formando 6-sulfatoximelatonina (para revisão, Tan *et al.*, 2007). Estudos recentes apontam que esse metabólito também pode ser formado em outros locais além do fígado como o córtex cerebral, os rins e o coração de ratos (Lahiri *et al.*, 2004). O perfil desse metabólito na urina e no plasma reflete tanto aspectos quantitativos como qualitativos da secreção de melatonina e serve para análise do ritmo endógeno de melatonina (Arendt, 1986; Bojkowski, 1987).

Por ser uma molécula lipofílica a melatonina pode atravessar passivamente a membrana celular e dessa forma, além de atuar sobre receptores, pode regular diretamente reações/funções no interior das células independentemente da interação com receptores. Por outro lado, diversas ações da melatonina são mediadas por receptores de membrana MT1 e MT2 (Reppert *et al.*, 1994, 1995; Dubocovich, 1988; 1997). Esses receptores pertencem a família de receptores acoplados a proteína G, que contém sete domínios transmembrânicos e são responsáveis principalmente pelos efeitos cronobiológicos sobre o NSQ. Neste caso, o receptor MT2 atua induzindo o deslocamento de fase enquanto o receptor MT1 age inibindo a atividade de disparo neuronal. Esses efeitos são mediados por concentrações equivalentes as encontradas no plasma (pM a nM) durante a noite (para revisão, Dubocovich *et al.*, 2010).

Um terceiro receptor, inicialmente descrito como MT3 (Dubocovich, 1988) foi caracterizado posteriormente como sendo a enzima quinona redutase II (Nosjean *et al.*, 2000). Esse receptor ainda não foi clonado e por isso e de acordo o comitê de nomenclatura IUPHAR é grafado em itálico (Dubocovich *et al.*, 2000). A quinona redutase participa da proteção contra o estresse oxidativo evitando reações de transferência de elétrons de quinonas (Foster *et al.*, 2000). A melatonina também se liga com menor afinidade à calmodulina (Benitez-King, 2006) assim como a receptores nucleares da família do ácido retinóico ROR α , ROR α 2 e RZRb (Wiesenberg *et al.*, 1995; Carlberg, 2000). Parte das ações antioxidantes da melatonina são mediadas por mecanismos dependentes de receptor, mas também incluem ações que não dependem dessa interação constituindo da ligação direta a radicais livres e reações de transferência de elétrons na cadeia respiratória (Poeggeler *et al.*, 2002).

2. FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

2.1. Caracterização do TNF

O TNF também descrito como caquexina foi identificado em 1975 como a proteína induzida por uma endotoxina e que causava a necrose hemorrágica de sarcomas transplantados em camundongos o que resultou na denominação de “fator de necrose tumoral” (Carswell *et al.*, 1975). Este termo já foi utilizado para denominar duas proteínas diferentes, TNF- α e TNF- β , mas considerando suas especificidades, em 1998 chegou-se ao consenso que TNF- α e TNF- β seriam substituídos por TNF e linfotoxina α (LTF α), respectivamente (Tracey, 2008). No presente texto utilizaremos a nomenclatura acordada em 1998.

Após sua descoberta o grande interesse sobre o TNF foi baseado na expectativa de seu potencial como uma droga anti-cancer. Mais tarde ficou evidente que o TNF é uma citocina altamente pleiotrópica mediando diversas atividades biológicas. Foi originalmente identificado como o mediador humoral da resposta endotóxica sistêmica que causava febre, hipotensão e choque (Cerami & Beutler, 1988, Tracey *et al.*, 1988). Os estudos desde então revelaram também que o TNF é um dos mediadores inflamatórios mais proeminentes para o início das reações inflamatórias do sistema imune inato, incluindo a indução da produção de outras citocinas, a ativação ou expressão de moléculas de adesão e multiplicação celular (Wajant., 2003). A importância do papel do TNF durante o processo inflamatório pode ser demonstrada pela perspectiva encontrada nas terapias anti-TNF que baseiam-se na utilização de anticorpos anti-TNF ou administração de receptores solúveis de TNF no controle da artrite reumatóide e em outras condições inflamatórias (Mpofu *et al.*, 2005; Tracey, 2008).

O TNF é produzido primariamente como uma proteína de 26 kDa conhecida como pró-TNF (Kriegler *et al.*, 1988), que é expressa na membrana plasmática onde pode ser clivada no seu domínio extracelular pela metaloproteinase TACE (do inglês, *TNF alpha converting enzyme*) (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997) resultando na forma solúvel de TNF (17 kDa). Tanto a forma associada à membrana como a forma solúvel de TNF são ativas apenas na conformação trimérica e possuem distintas atividades biológicas. Diversos tipos celulares linfóides ou não podem produzir TNF, incluindo macrófagos, células T, mastócitos, granulócitos, natural killer (NK), fibroblastos, neurônios, queratinócitos e células musculares (revisto por Bradley, 2008). Inclusive a própria pineal produz TNF em resposta a estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010).

O TNF não é detectável em indivíduos saudáveis, mas os níveis séricos e teciduais são elevados em condições inflamatórias e infecciosas, e se correlacionam com a severidade das infecções (Nurnberger *et al.*, 1995; Waage *et al.*, 1997; Robak *et al.*, 1998).

2.2. Sinalização do TNF

Os efeitos do TNF são mediados por dois tipos de receptores, designados como receptor de TNF tipo 1 (TNF-R1) (descrito também como TNFRSF1A, p55/60, CD120a) e receptor de TNF tipo 2 (TNF-R2) (descrito também como TNFRSF1B p75/80, CD120b) (Ledgerwood, 1999). Enquanto os dois receptores compartilham similaridades no domínio extracelular que consiste em repetições de cisteína (Beutler & van Huffel, 1994), TNF-R1 e TNF-R2 diferem no domínio intracelular, na afinidade a ligantes, no perfil de expressão celular, na cascata de sinalização e consequentemente na sua função. As duas formas de TNF, tanto membranas (TNFm) quanto a solúvel (TNFs), podem se ligar aos dois tipos de receptores, no entanto, algumas ligações podem ser mais favorecidas que outras. O TNFs se liga preferencialmente ao TNF-R1 (constante de dissociação [Kd]~20 pM) do que ao TNFR2 (Kd~400 pM). (Greel *et al.*, 1998). O TNF-R1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos enquanto a expressão do TNF-R2 é restrita, tipicamente encontrada nas células do sistema imune. Por isso, na maior parte das células, o TNF-R1 é o principal mediador da sinalização do TNF (Thoma *et al.*, 1990)

Alguns dos membros da família do TNF são conhecidos por sua capacidade de induzir a morte celular por ativar a via de sinalização apoptótica. Esses receptores, incluindo o TNF-R1, têm em comum o chamado domínio de morte (do inglês *death domain*) (DD), presente na porção intracelular da molécula (Tartaglia *et al.*, 1993a; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998) e essencial para induzir a apoptose. Em receptores não

estimulados, o domínio citoplasmático é pré-associado à proteína inibitória SODD (do inglês, *silencer of death domains*) com o domínio de morte. Essa proteína evita a sinalização constitutiva do TNF-R1. A ligação do TNF ao domínio extracelular do receptor induz a dissociação da proteína inibitória SODD com o DD que fica livre para ligar-se à proteína adaptadora TRADD (Chen *et al.*, 2002). Esse novo complexo protéico serve de plataforma para ligação de diferentes proteínas que contém o DD. A via de sinalização a ser disparada pela interação entre TNF e TNF-R1 depende de qual proteína se acoplará à TRADD (do inglês, *TNFRSF1A-Associated via death domain*). TRADD inicia a sinalização recrutando duas proteínas adicionais RIP-1 (do inglês, *receptor interacting protein-1*), uma serina/treonina quinase que se liga ao TRADD por seu próprio domínio de morte (Hsu *et al.*, 1996) permitindo a ligação ao TRAF2 (do inglês, *TNFR-associated factor 2*) que não possui DD (Takeuchi *et al.*, 1996). O complexo TRADD-RIP1-TRAF2 é internalizado (Jones *et al.*, 1999) e liberado do TNF-R1. A formação desse complexo resulta na ativação de diferentes quinases: NIK (do inglês, *NFkB inducing kinase*), IKK α e β (do inglês, IKK kinase α e β) (Mercurio & Manning, 1999) ou MAP quinases (Eder, 1997), ERK, JNK e p38 quinase (Liu *et al.*, 1996; Kelliher *et al.*, 1998). A ativação dessas quinases promove tanto a sobrevivência celular quanto a geração de sinais pró-inflamatórios através da ativação dos fatores de transcrição, fator nuclear kappa B (NFkB) e AP-1 (do inglês, *activator protein 1*). O TNF-R1, como já abordado anteriormente, pode ainda sinalizar por vias que levam a morte celular. Essas vias envolvem a ligação da proteína FADD (do inglês, *Fas-associated DD protein*) ao TRADD e o recrutamento subsequente da pro-caspase 8 que inicia a apoptose através da clivagem e ativação da pro-caspase 3. O recrutamento e a ativação da pro-caspase 8 pode ser inibido por cFLIP (do inglês, *Cellular caspase-8*

(FLICE)-like inhibitory protein) induzido pela via NF κ B, inibindo a via apoptótica. Esta sinalização pode ser resumida no esquema representado na figura 2.

As vias de sinalização ativadas pelo TNF-R2 são menos definidas do que aquelas envolvidas na sinalização do TNF-R1. Sem ter o domínio de morte a interação mais relevante após a ativação do TNF-R2 é o recrutamento de TRAF2 que promove a ativação da via do NF κ B. A ativação do TNF-R2 resulta na expressão de citocinas e também de proteínas intracelulares regulatórias com potencial anti-apoptótico, tais como TRAF1, TRAF2 e proteínas inibidoras de apoptose c-IAP1 e c-IAP2, (Wang *et al.*, 1998) além de também poder ocorrer a ativação das MAP quinases p38 e JNK (Winston *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996, Kelliher *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003).

A utilização de diferentes mecanismos de sinalização pelos receptores de TNF condiz com a habilidade de cada receptor em sinalizar uma resposta biológica distinta. A ligação do TNF-R1 é necessária e suficiente para induzir tanto efeitos citotóxicos como respostas pró-inflamatórias, enquanto que o TNF-R2 ativa vias inflamatórias e de sobrevivência celular (Rothe *et al.*, 1994, 1995). Em algumas circunstâncias as vias podem convergir, o TNF-R2 pode promover a sinalização do TNF-R1 por aumentar a associação do TNFs com o TNF-R1 através de um mecanismo de passagem de ligante que ocorre, principalmente, em baixas concentrações (Slowik *et al.*, 1993); nestes casos o TNF-R2 captura o TNFs passando-o ao TNF-R1 (Tartaglia *et al.*, 1993b).

FIGURA 2. Representação esquemática dos componentes da via de sinalização do TNF. O TNF possui dois tipos de receptores, TNF-R1 e TNF-R2 e no esquema são representadas as vias de ativação desencadeadas por cada um. A ligação do TNF ao TNF-R1 resulta no recrutamento de TRAF2, RIP1 e FADD através da proteína adaptadora TRADD. FADD recruta e ativa a caspase 8, levando à apoptose. TRAF2 e RIP1 levam à ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NFκB através da ativação das proteínas quinases JNK, p38 e IKK. A ligação do TNF ao TNF-R2 ativa o recrutamento de TRAF1, 2 e 3 que, através da ligação a proteína RIP-1, pode tanto levar a cascata da ativação do NFκB, via IKKs, ou do fator de transcrição AP-1, por meio das MAPKs (Baseado em Baud & Karin, 2001; Wajant, 2003).

Muitas linhagens celulares co-expressam os dois receptores, embora o TNF-R2 esteja preferencialmente expresso em células hematopoiéticas. Esses receptores apresentam um padrão de expressão mais limitado *in vivo*, sendo regulado pelas condições fisiopatológicas do tecido. Em condições de injúria ou isquemia por exemplo, a expressão desses receptores pode mudar de intensidade e localização variando conforme o tecido. Esse tipo de variação resulta de mudanças no nível da síntese desses receptores bem como na liberação desses receptores da membrana. Alguns estímulos que incluem o próprio TNF aumentam a expressão do TNF-R2 através de ativação transcricional enquanto que o TNF-R1 sofre comumente uma regulação negativa (Winzen *et al.*, 1992; Kalthoff *et al.*, 1993).

3. FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NFKB)

O NFKB foi inicialmente descrito como fator regulador do gene que transcrevia a cadeia leve kappa da imunoglobulina de linfócitos B (Sen & Baltimore, 1986) o que resultou no termo fator nuclear kappa B. Desde essa descoberta houve grande interesse em entender os estímulos que o ativavam, os diversos genes e as funções biológicas que esse fator regula. A função mais relevante do NFKB foi demonstrada no sistema imune onde a expressão dos genes regulados por ele é essencial para as respostas da imunidade inata e adquirida (Li *et al.*, 2002; Bonizzi & Karin, 2004).

Originalmente descoberto no núcleo de linfócitos (Sen & Baltimore, 1986), o fator nuclear kappa B é expresso de maneira ubíqua em todos os tipos celulares. A família de fatores de transcrição NFKB inclui um grupo de proteínas conservadas desde a *Drosófila* até o homem e que possuem em comum uma sequência de 300 aminoácidos denominada domínio de homologia Rel (RHD, do inglês, *Rel homology domain*) (Hoffmann *et al.*, 1999). Esse domínio que nomeia o grupo, também conhecido como

família Rel, contem regiões funcionais cruciais localizadas na porção N-terminal da proteína, responsável pela ligação ao DNA, dimerização, interação com as proteínas inibitórias IKBs (também conhecidas como NFKBI) e direcionamento nuclear.

A família Rel consiste em cinco genes *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Rela*, *C-rel* e *Relb* os quais codificam sete proteínas: p105, p50 (ou NFKB1), p100, p52 (ou NFKB2), p65 (ou RelA), c-Rel e RelB. p50 é gerada através da clivagem de p105, e a p52 a partir da proteína p100. Essas proteínas são funcionais como dímeros e podem se apresentar como homodímeros ou heterodímeros produzindo 15 possíveis combinações de dímeros. Neste trabalho será utilizado a nova nomenclatura para a família NFKB assim como para as proteínas regulatórias, de acordo com HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (disponível em <http://www.genenames.org>).

As subunidades do NFKB ainda apresentam diferenças importantes em sua expressão, regulação e funcionalidade. As proteínas RelA, c-Rel e RelB possuem o domínio de transativação C-terminal (TAD, do inglês, *transcription activation domain*) necessário para transcrição gênica sendo, portanto, consideradas as subunidades ativadoras de expressão gênica. Já as subunidades p52 e p50 não tem o domínio TAD e por isso são por definição repressoras da transcrição gênica. Por isso, a ligação dos homodímeros dessas subunidades, a exemplo de p50/p50, ao sítios kappa B leva a repressão da expressão gênica. Essas subunidades dependem da interação com outros fatores para regular positivamente a transcrição (Hayden & Ghosh, 2008). Por isso, heterodímeros de p50 ou p52 com as demais subunidades onde o TAD é presente atuam como ativadoras da expressão gênica. A expressão dessas moléculas também varia em relação ao tipo celular. As subunidades RelA e p50 estão presentes praticamente em todos tipos celulares estudados, enquanto c-Rel, RelB e p52 tem expressão restrita a células hematopoiéticas (revisto por Liou & Hsia, 2003).

RelB preferencialmente forma heterodímeros com p100 assim que é processada em p52 (Dobrzanski *et al.*, 1995) enquanto que RelA e c-Rel formam predominantemente heretodímeros com p50 (Karin & Ben-Neriah, 2000). Diferentemente dos outros membros RelB possui um domínio chamado zíper de leucina (LZ) na porção N-terminal que tem função transcricional importante. Esse domínio também confere especificidade adicional a RelB, incluindo sua heteromerização com p52. Existem também modificações pós-transcricionais em partes diferentes das subunidades de NFκB que incluem fosforilações e acetilações que modulam a ligação do DNA e atividade transcricional (Perkins, 2006).

3.1. Ativação do NFκB

Em células não-estimuladas os dímeros do NFκB são retidos no citoplasma em virtude de sua associação com a família de proteínas inibitórias IκB (Karin & Neriah, 2000). A interação com as proteínas IκB mascara a sequência de localização nuclear (NLS, do inglês, *nuclear localization sequence*) do NFκB impedindo sua translocação ao núcleo (Hayden & Ghosh, 2004). A família IκB consiste em nove membros IκBα, IκBβ, BCL-3, IκBε e IκBγ além das proteínas precursoras p100 e p105 que possuem em comum repetições múltiplas de anquirinas que medeiam a ligação com os dímeros do NFκB (Hatada *et al.*, 1992).

Os IκBs têm estrutura similar mas possuem diferenças em relação a sua preferência de ligação e sua regulação transcricional pelos membros do NFκB. O heterodímero clássico RelA/p50 é majoritariamente regulado pelo IκBα. Já o IκBε regula preferencialmente os dímeros RelA/RelA e c-Rel/RelA (para revisão, Whiteside & Israel, 1997). O papel do IκBβ é menos conhecido mas também se associa a RelA/p50. Além de diferentes perfis de ligação aos dímeros, as três formas principais de IκB tem

diferentes cinéticas (Hoffmann *et al.*, 2002). A proteína IKB α , por exemplo, é degradada mais rapidamente em resposta a estímulos como o próprio TNF ou sua síntese.

Muitos dos sinais extracelulares que resultam na ativação da via de transcrição NF κ B disparam vias de transdução de sinal que culminam na ativação de um mesmo alvo molecular. Essas vias se iniciam principalmente a partir da ativação de receptores como o TNF-R1, cada qual com seus mecanismos intrínsecos de regulação, mas convergindo para fosforilação das quinases IKKs (do inglês, iKB kinase). Consequentemente, esse é um passo importante de regulação para determinar a resposta de ativação do NF κ B a vários estímulos. As IKKS consistem de um complexo trimérico de quinases que compreende as subunidades catalíticas IKK α , IKK β e a subunidade IKK γ , também conhecida como NEMO (do inglês, *NF κ B essential modulator*), que tem papel estrutural e regulatório. As proteínas das famílias NF κ B e IKB e o complexo de IKKs estão representadas na figura 3.

Família Rel

Família IKB

Complexo IKK

FIGURA 3. Os membros das famílias NFκB, IKB e IKK. A) Membros da família NFκB: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NFκB1) e p52/p100 (NFκB2). As subunidades p50 e p52 (não mostrada) são derivadas do precursor mais proteínas P105 e P100, respectivamente. Todos os membros da família NFκB contêm um domínio N-terminal Rel homologia (RHD) que medeia a ligação do DNA e a dimerização e contém o domínio de localização nuclear. As proteínas RelA, RelB e c-Rel, contêm na porção C-terminal o domínio de ativação transcricional (TAD). B) As proteínas inibitórias IKBs consistem em IKBα, IKBβ, IKBε e BCL-3 mais as proteínas da família NFκB, p105 e p100, que possuem o domínio de repetição de anquirinas (ANK) na porção C-terminal. C) As três subunidades do complexo IKKs são mostradas: as subunidades catalíticas IKKα e IKKβ e a subunidade reguladora NEMO, também conhecido como IKKγ. DD, região de homologia com um domínio de morte; HLH, hélice-alça-hélice; LZ, domínio de zíper de leucina; NDB, NEMO-binding domain obrigatórios; PEST, domínio rico em prolina.

O TNF, a IL-1 β e o LPS disparam a via de sinalização do NF κ B chamada clássica ou canônica que culmina com a translocação nuclear do dímero RelA/p50. O acoplamento do receptor com seus ligantes resulta na ativação do complexo de IKKs que fosforila o IKB α nas serinas 32 e 36 promovendo sua poliubiquitinação. Quando ubiquitinado o IKB α é degradado pelo proteassoma 26S expondo, portanto, o sítio NSL de RelA e induzindo a translocação nuclear do dímero RelA/p50 (para revisão, Rothwarf & Karin 1999; Ghosh & Karin, 2002). O complexo IKK também fosforila os TADs de RelA e c-Rel podendo aumentar a sua atividade transcricional (Perkins, 2006). Na via clássica IKK β é a subunidade catalítica responsável pela atividade de IKK na maioria dos tipos celulares. A deleção de IKK α em células que expressam IKK β não afeta a atividade clássica de IKK (Hu *et al.*, 1999). A via alternativa depende somente da subunidade IKK α a qual fosforila p100 induzindo o processamento de p52 e subsequente ativação de RelB/p52. Essa via é ativada em resposta a uma parte dos ligantes da família TNF incluindo CD40l, LT $\alpha\beta$, BAFF, RANKL e TWAK, e sua regulação se difere da via clássica.

A rápida ativação do NF κ B é essencial para uma resposta imune eficiente, mas essa resposta não pode perdurar e precisa ser finalizada no tempo apropriado para evitar o dano tecidual ou maiores complicações. O processo inflamatório descontrolado é indesejado, além de aumentar o risco de câncer e doenças auto-imunes. O controle da ativação do NF κ B é feito por dois mecanismos principais. Um deles constitui de uma alça de retroalimentação negativa que envolve a síntese de novas proteínas iKBs. Assim que os dímeros de NF κ B translocam ao núcleo um dos genes alvo é o gene *Ikb α* que codifica o IKB α (Sun *et al.*, 1993). Os novos IKB α sintetizados são direcionados ao núcleo como monômeros e se associam aos dímeros p50/RelA levando à sua inativação e exportação para o citoplasma. Outro mecanismo que contribui para a finalização da

resposta do NFkB é a degradação das subunidades de NFkB ligadas ao DNA pelo proteassoma (para revisão, Vallabhapurapu & Karin, 2009).

4. EIXO-IMUNE-PINEAL

4.1. Melatonina e defesa

A melatonina, originalmente descrita como hormônio da glândula pineal, também é produzida por outras estruturas. Esta molécula, altamente conservada ao longo da escala filogenética, atuava inicialmente como antioxidante e bloqueadora de processos enzimáticos relacionados com o estresse oxidativo sendo a função de defesa a principal ação da melatonina em organismos mais primitivos (Hardeland & Fuhrberg, 1996, Reiter *et al.*, 2000). Em vertebrados, a melatonina acumula funções de defesa com função cronobiótica, isto é, marcadora do escuro (Hardeland & Fuhrberg, 2006; Tan *et al.*, 2010).

Ao longo das últimas duas décadas um grupo substancial de pesquisadores tem demonstrado o papel regulatório da melatonina sobre as funções de defesa (Nelson & Demas, 1997; Gilad *et al.*, 1998; Maestroni, 1998; Hotta *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001; Andrew & Hotchkiss, 2002; Guerrero & Reiter, 2002; Carrillo-Vico *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2008). Os estudos iniciais sobre sua ação imunomodulatória baseavam-se na retirada da glândula pineal e na observação de diversos parâmetros imunológicos, incluindo principalmente os órgãos linfóides. A supressão da imunidade, atrofia do timo e a redução de células imunes no baço após a pinealectomia representam evidências marcantes do papel regulador exercido pela melatonina no sistema imune (Csaba & Barath, 1975; Maestroni *et al.*, 1986; Brainard *et al.*, 1988; Jankovic *et al.*, 1994).

Um importante aspecto dos efeitos da melatonina é que estes são observados em uma ampla faixa de concentrações. Esta variabilidade implica que suas ações sejam ligadas, ou não, à ritmicidade circadiana. A melatonina pode ser produzida em outros locais além da pineal, tendo sido descrita no trato gastrointestinal (Bubenik, 2002), na retina (Zmijewski *et al.*, 2009), células epidérmicas (Slominski *et al.*, 1996, 2002) e células imunocompetentes (Carrilo-Vico *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2006, 2007). Nestas condições a melatonina é produzida em altas concentrações, na faixa de μM – mM , enquanto a concentração plasmática noturna está na faixa de pM – nM . A produção extrapineal pode ocorrer de maneira rítmica como acontece na retina ou constitutiva como acontece no trato gastrointestinal, mas, em nenhum desses locais, a melatonina secretada parece contribuir para variação rítmica do hormônio na circulação, sendo este padrão dependente exclusivamente da produção pineal. Estudos mostram que tanto os níveis de melatonina noturnos como a produzida localmente produzem efeitos regulatórios sobre o sistema de defesa.

Os efeitos citoprotetores da melatonina são mediados por sua capacidade de atuar como anti-oxidante (Reiter *et al.*, 2002, Bilici *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2004) e por inibir vias de sinalização que desencadeiam respostas inflamatórias (Gilad *et al.*, 1998; Maestroni, 1998; Lissoni, 1999; Reiter *et al.*, 2000; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003, Markus *et al.*, 2010). Esses efeitos são obtidos em altas concentrações de melatonina e incluem suas ações diretas como “scavenger” de radicais livres (Poeggeler *et al.*, 2002) ou como indutora do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (para revisão Luchetti *et al.*, 2010).

Outra abordagem dos efeitos da melatonina está em sua ação sobre a resposta imune inata, exibindo padrões diferentes de regulação. Em altas concentrações, a melatonina possui efeitos imuno-estimulatórios. Ela promove aumento da transcrição

do gene de diversas citocinas pro-inflamatórias em células mononucleares (Garcia-Maurino *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001; Carrillo-Vico *et al.*, 2003), aumento da atividade fagocítica dessas mesmas células (Pontes *et al.*, 2006) e da apresentação de antígenos (Pioli *et al.*, 1993), além do aumento da proliferação de linfócitos T e atividade de células linfóides. Todos esses efeitos são relevantes para a montagem da resposta inflamatória, por isso nestas condições a melatonina tem propriedades pró-inflamatórias. Por outro lado, em concentrações compatíveis com as encontradas na circulação a melatonina tem efeitos contrários, de inibição da resposta inflamatória. A concentração plasmática de melatonina reduz de forma significativa a adesão e rolamento de células imunocompetentes à camada endotelial e o aumento da permeabilidade vascular induzidos por agentes pró-inflamatórios em ratos (Lotufo *et al.*, 2001, 2006). Suas ações devem ser entendidas de acordo com o contexto fisiológico e fisiopatológico, por isso restringir seu caráter ao efeito pró ou anti-inflamatório pode ser equivocado. As suas propriedades bem marcadas como sua ação citoprotetora e imunomodulatória podem predizer a sua aplicação e investigação em diversas condições e doenças.

4.2. O tempo na resposta imune: relação entre melatonina e adaptação.

Os mecanismos biológicos evoluíram de forma a permitir a antecipação das mudanças ambientais associadas ao tempo. Essas adaptações são cruciais para sobrevivência, principalmente para espécies que convivem com mudanças drásticas no ambiente. Essas espécies se deparam com desafios de disponibilidade de alimento e baixas temperaturas que fazem do inverno, um período particularmente difícil para se reproduzir e sobreviver. Nesse sentido, os indivíduos deveriam também prever condições imunologicamente desafiantes.

Diferentemente de algumas funções fisiológicas, a função imune foi tida por muitos anos como relativamente constante ao longo das estações (Sheldon & Verhulst, 1996), inclusive as flutuações no número de morte e doenças ao longo do tempo foram mais atribuídas a virulências dos agentes causadores do que necessariamente a mudanças na própria imunidade (Nelson *et al.*, 2002). A manutenção da função imune é considerada energeticamente elevada, as cascatas de atividade mitótica, a montagem do processo inflamatório, a febre e a produção de fatores imunorregulatórios requerem energia substancial (Demas *et al.*, 1997). Diante disso, todos esses processos devem ser altamente regulados para que a imunidade não perca efetividade diante de situações desfavoráveis como nas mudanças sazonais do ambiente. Considerando que certas atividades como a reprodução podem ser reduzidas durante períodos desfavoráveis, outras como a função imune não pode ser reduzida sem graves comprometimentos para a sobrevivência (Nelson *et al.*, 2002).

Picos sazonais no tamanho dos órgãos linfáticos geralmente ocorrem no final do outono ou no início do inverno e mínimos sazonais são observados antes do início da reprodução. Dados de campo sugerem que a função imunológica e processos de doença são reforçados durante o inverno (Nelson & Demas, 1997; Hotchkiss & Nelson, 2002). Nos seres humanos também foram descritas mudanças sazonais na função imune. Citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN γ) e INF α e IL6 estão aumentadas durante o inverno em comparação com o verão (Katila *et al.*, 1993; Maes *et al.*, 1994).

As mudanças sazonais na função imune são determinadas pelo fotoperíodo e mediadas pela duração da secreção de melatonina (Nelson & Demas, 1995, 1996; Nelson & Drazen, 2000; Prendergast *et al.*, 2004). De forma geral, o reforço da função imune provê a antecipação do organismo frente aos estressores recorrentes que comprometem a imunidade (Nelson *et al.*, 2002). Em conjunto, todas as mudanças exercidas pela

melatonina no sistema imune são significativas para uma resposta imune integrada e relevante para sobrevivência. Sobre a mesma lógica, o sistema imune pode atuar diretamente sobre a função pineal. Essas ações refletem-se em ajustes sobre a melatonina circulante de modo a permitir a regulação da função imune (Nelson & Drazen, 1999; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003).

Em modelo de inflamação crônica através da injeção de Bacilo Calmette-Guerin (BCG) em patas de camundongo foi observado um ritmo diário da lesão granulomatosa induzida. O edema da pata era menor à noite e maior durante o dia. Nesse caso a extirpação da pineal aboliu o ritmo do edema que era restaurado após a administração de melatonina durante a fase escura (Lopes *et al.*, 1997). Pode-se entender que a natureza da resposta imune é também modificada por uma variação diária das concentrações de melatonina. Entende-se que o tempo também é determinante sobre a função imune em uma escala muito menor, ou seja, o ciclo dia/noite também implica em alterações no perfil de resposta inflamatória.

4.3. A construção de um novo conceito: Pineal como alvo para mediadores da resposta imune

Em mamíferos, a glândula pineal é responsável pela transdução do fotoperíodo ambiental em sinalização hormonal. O escuro captado pela retina e processado pelo sistema nervoso é traduzido através da produção e liberação do hormônio melatonina. Portanto, esta indolamina é também conhecida como o hormônio do escuro (Reiter, 1993).

Os dados da literatura demonstram que melatonina é uma molécula diretamente relacionada à resposta imune. Os estudos caracterizaram seu papel regulatório em diferentes células imunes e a sua relação com a adaptação sazonal e processos de defesa (para revisão, Guerrero & Reiter, 2002). Sobre a mesma lógica o sistema imune pode

atuar diretamente sobre a função pineal. Essas ações refletiram-se em ajustes sobre a melatonina circulante de modo a permitir a regulação da função imune (Nelson & Drazen, 1999; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003). Nesse sentido, a própria pineal passa a ser também alvo de mediadores imunológicos. Consistindo nessa concepção diversos estudos mostraram que citocinas e outros sinalizadores da inflamação afetam a função pineal (Mucha *et al.* 1994; Withyachumnarnkul *et al.*, 1990a, 1990b; Zylinska *et al.*, 1995, Tsai *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005; Jiang-Shieh *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; 2009; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010). Essas relações apontam para a existência de uma comunicação bidirecional entre o sistema imune e a glândula (Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003; Markus *et al.*, 2007,). A proposta do Eixo-Imune-Pineal tem como pressuposto essa interação e traz o conceito de que a comunicação recíproca entre a glândula pineal e o sistema imune é essencial para a montagem da resposta inflamatória. As diversas abordagens que contribuíram para construção dessa proposta serão apresentadas a seguir. O presente trabalho tem como precursor resultados que constituem parte dessa concepção e deram suporte para sua elaboração.

No estudo conduzido por Lopes e colaboradores (1997), além da observação de que a lesão induzida por BCG na pata de camundongos apresentava ritmo diário e este era alterado após pinealectomia e restaurado com melatonina exógena, foi mostrado ainda que o ritmo da excreção do metabólito da melatonina, a 6-sulfatoximelatonina, era perdido após remoção da adrenal (Lopes *et al.*, 2001). Esses dados sugeriam pela primeira vez a participação da adrenal no controle da função pineal. Foi demonstrada a importância dos glicocorticóides na manutenção do ritmo diário da lesão provavelmente pela indução do pico noturno de melatonina nessas condições. Essa interação foi confirmada posteriormente quando demonstrou-se que a corticosterona

potencia a síntese de melatonina *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2005) e *in vivo* (Fernandes *et al.*, 2009).

Diversos mediadores da resposta imune também demonstraram exercer efeitos sobre a função pineal. Foi mostrado que a citocina interleucina 1 beta (IL-1 β) é expressa constitutivamente na glândula pineal e aumentada após tratamento com noradrenalina, IFN γ e LPS (Tsai & McNulty, 1999). Estudo do mesmo grupo também mostrou que o RNAm da IL-6 e do fator de crescimento beta (TGF- β) são transcritos na glândula pineal e regulados positivamente pela noradrenalina (Tsai *et al.*, 2001a). O efeito dessas citocinas sobre a atividade da glândula foi avaliado através da análise do conteúdo ou síntese de precursores e da própria melatonina. Foi observado que o IFN γ pode induzir tanto o aumento como a redução da melatonina em pineais cultivadas dependendo das concentrações de IFN γ e do nível de estimulação adrenérgica utilizada (Withyachumnarnkul *et al.* 1990b). Os fatores estimulares de colônias granulocitárias (GM-CSF e G-CSF) e citocinas secretadas por células imunocompetentes ativadas potenciam a produção de melatonina *in vivo* e *in vitro* na pineal de rato (Zylińska *et al.*, 1995). Também foi avaliado a participação da microglia na resposta da pineal à essas citocinas. IL-1 β , TNF e INF γ modulam o conteúdo de 5-HT em culturas de glândulas pineais de rato (Tsai *et al.*, 2001b).

Os efeitos inibitórios da melatonina noturna sobre a migração de leucócitos à camada endotelial (Lotufo *et al.*, 2001, 2006) implicariam que, durante a noite, a montagem da resposta seria retardada por ação desse hormônio. Para haver o recrutamento celular adequado, independente da hora do dia, os níveis de melatonina circulantes devem ser reduzidos. Essa hipótese foi confirmada pela demonstração de que agentes envolvidos na fase de montagem da resposta promovem efeitos negativos sobre a produção de melatonina. O TNF inibe transientemente a transcrição do gene

que codifica a enzima AA-NAT e também a produção do precursor da melatonina, a N-acetilserotonina, em glândulas pineais de ratos em cultura (Fernandes *et al.*, 2006). O estudo *in vivo* com um modelo de inflamação em humanos também mostrou a mesma relação. Mulheres com mastite, um processo inflamatório não-infeccioso, apresentam altos níveis de TNF e têm supressão do ritmo de melatonina (Pontes *et al.*, 2006). No mesmo contexto de uma resposta pró-inflamatória, a injeção de LPS promove a redução dos níveis plasmáticos de melatonina em ratos (Tamura *et al.*, 2010) e inibição da produção de N-acetilserotonina e melatonina induzida por noradrenalina em pineais em cultura (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010). Observou-se ainda que em quadros de infecção generalizada, caracterizada por altos níveis de TNF, há supressão do ritmo de melatonina (Mundigler *et al.*, 2002).

A caracterização dos mecanismos envolvidos na regulação da função pineal por diversos fatores inflamatórios permitiu sugerir que o fator NFkB está diretamente envolvido nas respostas observadas. Esse fator é constitutivamente expresso na glândula pineal e apresenta ritmo diário, com máximo acúmulo nuclear no final da fase de claro e rápida redução após o apagar das luzes (Cecon *et al.*, 2010). A ativação da via NFkB por fatores pró-inflamatórios como o TNF e LPS bloqueia (Fernandes *et al.*, 2006, da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010), enquanto que a inibição dessa via por corticosterona potencia a síntese de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais em cultura (Ferreira *et al.*, 2005). A pineal também mostrou ser instrumentalizada para responder à esses fatores. Já foram detectados em pinealócitos receptores para LPS, TLR4 e CD14 (da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010) e para glicocorticóides (GR) (Ferreira *et al.*, 2005).

Os achados sobre a função pineal e processos de injúria indicam a comunicação bidirecional do sistema imune com a glândula pineal. Essa concepção antes era proposta

do ponto de vista que presumia a existência de um mecanismo de retroalimentação para regulação da melatonina circulante, considerando-se seu papel imunomodulatório (Nelson & Drazen, 1999; Tsai *et al.*, 2001b; Skwarlo-sonta *et al.*, 2003). A proposta do **Eixo-Imune-Pineal** considera a existência de mecanismos comuns de regulação da produção de melatonina frente a condições desafiantes e relevante para uma resposta inflamatória. No estado de higidez do organismo a melatonina é sintetizada ritmicamente pela pineal. Diante de uma situação adversa como uma injúria, a pineal é sinalizada a interromper a produção de melatonina para permitir a montagem da resposta inflamatória. Por outro lado, na periferia, células imunocompetentes seriam estimuladas e passariam a produzir grandes quantidades de melatonina que atuaria de maneira parácrina, exercendo seu efeito antioxidante e anti-inflamatório, contribuindo para finalização da resposta. Essa situação aconteceria de maneira transiente, de modo a admitir que o animal resolva uma infecção ou lesão tecidual de maneira eficiente, quando esses níveis assim seriam restaurados. O catabolismo dos mediadores e aumento de glicocorticóides circulantes após a fase de resolução contribuiriam positivamente para o retorno da síntese de melatonina pela glândula pineal (Markus *et al.*, 2007).

FIGURA 4. O Eixo-imune-pineal: Em sujeitos saudáveis o NSQ controla a produção de melatonina transduzindo a informação ambiental luminosa no pico noturno de melatonina em concentrações que reduz a transmigração de leucócitos para os tecidos. Em uma situação de injúria, moléculas produzidas no início da inflamação são percebidas pela glândula pineal sinalizando a supressão da síntese de melatonina. A ausência do pico noturno de melatonina permite a migração adequada de leucócitos e portanto uma montagem eficiente da resposta. Os leucócitos já nos locais de injúria passam a produzir melatonina de forma parácrina de maneira a resolver o processo inflamatório.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

1. Glândulas pineais de rato expressam de maneira constitutiva o receptor TNF-R1. Este receptor é expresso nos três principais tipos celulares da pineal, em pinealócitos, e nas células gliais, astrócitos e microglia.

2. A expressão do receptor TNF-R1 no parênquima da glândula pineal varia ao longo dia, sendo maior no ZT 10.

3. Pinealócitos expressam o receptor TNF-R1. Na presença de TNF a expressão do TNF-R1 é reduzida após 60 minutos de incubação.

4. Os dímeros do NFkB p50/p50 e p50/RelA são constantemente ativados em pineais em cultura (retiradas no ZT 10). A estimulação com TNF promove o aumento da translocação dos mesmos.

5. A proteína inibitória IKBa é expressa em pinealócitos em cultura. A presença do TNF promove a redução da expressão dessa proteína, sugerindo sua degradação. Portanto podemos concluir que o NFkB é ativado por TNF em pinealócitos em cultura.

6. O TNF induz a expressão da enzima iNOS em pinealócitos isolados. Vimos que essa indução é dependente da ativação do fator NFkB e leva a produção de NO.

VII. RESUMO

O TNF atua diretamente sobre a pineal inibindo a via biossintética da melatonina. De forma semelhante o LPS, potente ativador da resposta imune inata, tem efeito inibitório sobre a produção de melatonina e seu precursor. A supressão da síntese noturna de melatonina é admitida de forma a permitir a montagem da resposta inflamatória, tanto durante o dia como à noite. Dados do grupo tem demonstrado que o NFkB é um fator constitutivamente expresso na glândula pineal e que o ritmo diário de translocação pode ser determinante para o início da síntese de melatonina. A inibição de sua ativação potencia a síntese de melatonina enquanto que fatores que classicamente promovem a sua ativação inibem esta produção. Nesta dissertação, verificamos as moléculas envolvidas no reconhecimento e na de sinalização desta citocina na pineal. Demonstramos que a pineal está apta a responder ao TNF, células gliais da pineal e as células secretoras, os pinealócitos, expressam constitutivamente o receptor TNF-R1. O TNF promove a translocação nuclear dos dímeros p50/p50 e p50/RelA do NFkB em glândulas pineais em cultura. Confirmamos a ativação desta via em pinealócitos pela análise da proteína inibitória IKB α . Vimos que a ativação desse fator é essencial para expressão da iNOS e a produção de NO induzida por TNF em pinealócitos isolados. Além disso, mostramos que o TNF promove a redução da expressão do receptor TNF-R1 na membrana de pinealócitos. Em resumo, mostramos neste trabalho que a pineal está instrumentalizada a responder ao TNF, e que os pinealócitos são alvos diretos para o seu reconhecimento. Confirmamos a relevância do fator NFkB na resposta da pineal em situações de injúria, ampliando o conceito de que a pineal está apta a detectar moléculas do processo inflamatório.

VIII. ABSTRACT

TNF acts directly on the pineal gland by inhibiting the biosynthesis of melatonin. Similarly, LPS, a potent activator of the innate immune response has an inhibitory effect on the production of melatonin and its precursor. The suppression of nocturnal melatonin synthesis is admitted to allow the full mounting of the inflammatory response both during the day and night. Data from our laboratory have shown that the NF κ B is constitutively expressed in the pineal gland and that the daily rate of translocation can be determinant for the onset of melatonin synthesis. Inhibition of their activation potentiates melatonin synthesis whereas factors that promote its activation classically inhibit this production. In this dissertation we find the molecules involved in recognition and signaling of this cytokine in the pineal. We demonstrated that the pineal is responsive to TNF, the pineal glial cells and secretory cells, the pinealocytes, constitutively express the TNF-R1. TNF promotes nuclear translocation of p50/RelA and p50/p50 NF κ B dimers in the pineal glands in culture. We confirmed the activation of this pathway in pinealocytes by analyzing the inhibitory protein I κ B α . We have seen that the activation of this factor is essential for iNOS expression and NO production induced by TNF in isolated pinealocytes. Furthermore we show that TNF promotes the reduction of the expression of TNF-R1 receptor on the membrane of pinealocytes. In summary, we show here that the pineal is instrumented to respond to TNF and that the pinealocytes are direct targets for its recognition. We confirm the relevance of NF κ B in the pineal response in situations of injury extending the concept that the pineal is able to detect molecules in the inflammatory process and respond accordingly.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDT, J. (1995). Melatonin and the Mammalian Pineal Gland Chapman and Hall, London.
- AXELROD, J. & WEISSBACH, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* **131**: 1312.
- AXELROD, J. *et al.* (1965). Control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J Biol Chem.* **240**: 949–954.
- BARGMANN, W. (1943). Die Epiphysis cerebri. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, vol. 6:4 (ed. W. von Mollendorff), pp. 309–502. Berlin: Springer.
- BENITEZ-KING, G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* **40**: 1–9.
- BEUTLER, B. & VAN HUFFEL, C. (1994). Unravelling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* **264**: 667 – 668.
- BILICI, D. *et al.* (2002). Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol. Res.* **46**: 133–139.
- BLACK, R.A. (2002). Tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1**: 1 – 5.
- BLACK, R.A. *et al.* (1997). A metallo-proteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**: 729 – 733
- BOJKOWSKI, C.J. *et al.* (1987). Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. *Clin Chem.* **33**(8): 1343-8.
- BONIZZI, G. & KARIN, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**(6): 280-8.
- BORJIGIN, J. *et al.* (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* **378**: 783–785.
- BRADLEY, J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathology*: 149-160.
- BRAINARD, G.C. *et al.* (1988). Neuroendocrine regulation of immune parameters. Photoperiod control of the spleen in Syrian hamster. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **540**: 704-706.

- BRENNAN, F.M., *et al.* (1989). Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*. **2**:244-247.
- BUBENIK, G.A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*. **47**: 2336-2348.
- CALVO, J. & BOYA (1983). Postnatal development of cell types in the rat pineal gland. *J.Anat*. **137**: 185-191.
- CARDINALI, D.P. *et al.* (1972). Binding of melatonin to human and rat plasma proteins, *Endocrinology* **91**: 1213-1218.
- CARLBERG, C. (2000) Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci*. **917**: 387-396.
- CARLOTTI, F. *et al.* (2000). Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem*. **275**: 41028-41034.
- CARRILO-VICO, A. *et al.* (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine and/ or paracrine substance. *FASEB J*. **18**: 537-539.
- CARRILO-VICO, A. *et al.* (2005). Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 992-1000.
- CARSWELL, A. *et al.* (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3666-3670.
- CECON, E. *et al.*, (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*. **27**: 52-67.
- CERAMI, A. & BEUTLER, B. (1988). The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today*. **9(1)**: 28-31.
- CHEN, *et al.*, (2002). NF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. **296(5573)**: 1634-5.
- CIPOLLA-NETO, J. *et al.*, (1994). The Effects of Intergeniculate Leaflet Lesion on The Metabolism of the Rat Pineal Gland. *Adv Pineal Res*. **8**: 95-10.
- COON, S.L. *et al.* (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science*. **270**: 1681-1683.
- COUTO-MORAES, R. *et al.*, (2009). The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann N Y Acad Sci*. **1153**: 193-202.

- CSABA, G. & BARATH, P. (1975). Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol. Exp.* **9**: 59-67.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. *et al.* (2010). TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res.* **49**: 183-192.
- DEMAS, G.E. *et al.* (1997). Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol.* **273**: 1631-1637.
- DOBZANSKI, P. *et al.* (1995). Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* **10**: 1003-7.
- DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. *et al.* (2004). Light/dark patterns of interleukin-6 in relation to the pineal hormone melatonin in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* **26**(2): 89-93.
- DUBOCOVICH, M.L. *et al.* (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mella and Mellb recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. Naunyn-Schmiedeberg's. *Archives of Pharmacology*. **355** (3): 365-375
- DUBOCOVICH, M.L. *et al.* (2000). Melatonin receptors. In The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, 2nd edn. (IUPHAR, ed.), pp. 271-277. IUPHAR Media, London.
- DUBOCOVICH, M.L. *et al.* (2010). International Union of Basic and clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol. Rev.* (in press).
- DUVERNOY, H.M. & RISOLD, P.Y. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev.* **56**: 119-147.
- EDER, J. (1997). Tumor necrosis factor and Il-1 signaling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol. Sci.* **18**: 319-322.
- EKSTRÖM, P. & HILMAR, M. (2003). Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **358** (1438): 1679-700.
- FERNANDES, P.A. *et al.* (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol.* **21**: 90-97.
- FERNANDES, P.A. *et al.* (2006). Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a "feedback" of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res.* **41**: 344-250.
- FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2001). Characterization of P2Y(1)-like receptors in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol.* **415**: 51-156.

- FERREIRA, Z.S. *et al.* (1994). Presence of P2-purinoreceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol.* **112**: 107-110.
- FERREIRA, Z.S. *et al.* (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* **38**: 182-188.
- FERREIRA, Z.S. *et al.* (2003). P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocytes-induced extracellular acidification via calcium-dependent mechanism. *Pharmacology.* **69**: 33-37.
- FOSTER, C.E. *et al.* (2000) Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. *Free Radic Biol Med* **29**: 241-245.
- GANGULY, S. *et al.* (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 8083-8088.
- GANGULY, S. *et al.* (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* **309**: 127-137.
- GARCIA, C.R.S. *et al.* (2001). Tertian and Quartan Fevers: Temporal Regulation in Malarial Infection. *J Biol Rhy.* **16**: 436-443.
- GARCIA-MAURINO, S. *et al.* (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4⁺ cells: A possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* **159**: 574-581.
- GARIDOU, M.L. *et al.* (2001). In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neurosci* **105**(3): 721-9.
- GASTEL, J.A. *et al.* (1998). Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science.* **279**: 1358-1360.
- GHOSH, S. & KARIN. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**: 81-96.
- GHOSH, S. & HAYDEN MS. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* **8**: 837-848.
- GILAD, E. *et al.* (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.* **12**: 685-693.

- GOLDMAN, H. & WURTMAN, R.J., (1964). Flow of blood to the pineal body of the rat, *Nature* **203**: 27–88.
- GREEL, M. *et al.* The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 570–575, 1998.
- GROSS, P.M. & WEINDI, A. (1987) Peering through the windows of the brain. *J Cereb. Blood Flow Metabol.* **7**: 662-671
- GUERRERO, J.M. & REITER, R.J. (2002). Melatonin-immune system relationships, *Curr. Top. Med. Chem.* **2** :167–17.
- HARADA, Y. *et al.* (1992). Neuropeptide Y inhibits beta-adrenergic agonist- and vasoactive intestinal peptide-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes through pertussis toxin-sensitive G protein *J Neurochem.* **59**(6): 2178-83
- HARDELAND, R. & FUHRBERG, B. (1996). Ubiquitous melatonin – presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **2**: 25–45.
- HARDELAND, R. *et al.* (2006). “Melatonin.” *Inter J Biochem & Cell Biol* **38**(3): 313-6.
- HARDELAND, R. (2005). Antioxidative protection by melatonin- Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocr.* **27**: 119–130.
- HAYDEN, M.S & GHOSH, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**: 344–362.
- HAYDEN, M.S. & GHOSH, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* **18**: 2195–2224
- HEHLGANS, T. & MÄNNEL, D.N. (2002). The TNF – TNF Receptor System. *Biol. Chem.* **383**: 1581 - 1585.
- HEIDBÜCHEL, U. & VOLLRATH, L. (1983). Pineal complex of rats: Effects of superficial pinealectomy on the deep pineal. *Acta Anat.* **117**: 165- 169.
- HOFER, H. (1958). Zur morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirnes der Säugetiere. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 202–251.
- HOFFMANN, A. *et al.* (2002). The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science.* **298**: 1241–45
- HOFFMANN, A. & BALTIMORE, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev.* **210**: 171-186.
- HOTCHKISS, A.K & NELSON, R.J. (2002). Melatonin and Immune Function: Hype or Hypothesis? *Crit Rev. in Immunol.* **22**(5&6): 351-371

- HOTTA, C.T. *et al.* (2003). Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res* **36**(11): 1583-7.
- HSU, H. *et al.* (1995). The TNF receptor 1- associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell* **81**: 495-504.
- HSU, H *et al.* (1996). TNF- dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signalling complex. *Immunity*. **4**: 387-396.
- HU, H. *et al.* (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* **284**: 316-20
- JACOBS, R.A. *et al.* (1999). Pineal nitric oxide synthase, but not heme oxygenase, mRNA is suppressed by continuous exposure to light. *Brain Res Mol Brain Res*. **70**(2): 264-72.
- JANKOVIC, B.D. *et al.* (1994). Pineal gland and immune system. Immune functions in the chick embryo pinealectomised at 86 h of incubation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **719**: 398-409.
- JIANG-SHIEH, Y.F. *et al.* (2003). Regional heterogeneity in immunoreactive macrophages/microglia in the rat pineal gland. *J Pineal Res*. **35**: 45-53.
- JIANG-SHIEH, Y.F. *et al.* (2005). Responses of microglia in vitro to the gram-positive bacterial component, lipoteichoic acid. *J Neurosci Res*. **82**(4): 515-24.
- JIANG-SHIEH, Y.F. *et al.* (2005). Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. *J Pineal Res* **38**: 17-26.
- JOHNSON, A.K. & GROSS, P.M. (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEBJ*. **7**: 678-86.
- JOHNSTON, J.D. *et al.* (2004). Rhythmic melatonin secretion does not correlate with the expression of arylalkylamine N-acetyltransferase, inducible cyclic AMP early repressor, period 1 or cryptochrome1 mRNA in the sheep pineal. *Neurosci*. **124**: 789-795.
- JONES, S.J. *et al.* (1999). TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J Immunol* **162**(2): 1042-1048.
- KALSBECK, A. *et al.* (1999). GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neurosci*. **91**(2): 453-61.

- KALSBECK, A. *et al.* (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci.* **12**(9): 3146-54.
- KALTHOFF, H. *et al.* 1993. Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem* **268**(4):2762
- KAPPERS, J.A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z. Zellforsch.* **52**: 163-215.
- KARIN, M. & BEN-NERIAH, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621-63.
- KATILA, H. *et al.* (1993). Is there a seasonal variation in the interferon producing capacity of healthy subjects? *J Interferon Res.* **13**: 233-234.
- KELLIHER, MA. *et al.* (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* **8**: 297 - 303.
- KENNAWAY, D.J & WRIGHT, H. (2002). Melatonin and circadian rhythms. *Curr Topi Medic Chem.* **2**(2): 199-209.
- KITAY, J.I. & ALTSCHULE, M.D. (1954). Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. *Endocrinol.* **65**: 782-784.
- KLEIN, D.C. & WELLER, J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* **169**: 1093-1095.
- KLEIN, D.C. *et al.* (1983). Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 599-603.
- KNIGHT, D. *et al.* (1993). Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol.* **30**: 1443-1453.
- KORF, H.W. & WAGNER, U. (1980). Evidence for a nervous connection between the brain and the pineal organ in the guinea pig. *Cell Tissue Res* **209**: 505-510.
- KORF, H.W. *et al.* (1998). The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **146**: 1-100.
- KORF, H.W. *et al.* (1985a). Opsin-like immunoreaction in the retinae and pineal organs of four mammalian species. *Cell Tissue Res* **242**: 645-648.

- KORF, HW. *et al.* (1985b) Immunocytochemical demonstration of retinal S-antigen in the pineal organ of four mammalian species. *Cell Tissue Res.* 239: 81–85.
- KORF, H.W. *et al.* (1992). Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res* 595: 57–66.
- KRIEGLER, M. *et al.* (1988). A novel TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* 53: 45–53.
- LAFLAMME, N. & RIVEST, S. (2001). Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* 15: 155–63.
- LAHIRI, D.K. *et al.* (2004). Age-related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. *J Pineal Res.* 36: 217–223
- LARSEN, P.J. *et al.*, (1991). Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat. A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J Comp Neurol.* 306: 462–479.
- LAWRENCE, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (6): a001651.
- LEANDER, P. *et al.* (1998). Neuronal projections from the median and dorsal raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). A combined in vivo tracing and immunohistochemical neurotransmitter study. *J Comp Neurol.* 399: 73–93.
- LEDGERWOOD, A. (1999). Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest* 79(9): 1041–1050.
- LEE, T.H. *et al.* (2003). The death domain kinase RIP1 is essential for tumor necrosis factor alpha signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Bi.* 23: 8377–8385.
- LERNER, A.B. *et al.* (1959). Structure of melatonin. *J Am Chem Soc.* 81: 6084–6085.
- LERNER, A.B. *et al.* (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 80: 2587.
- LI, Q. *et al.* (2002). NF-kB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 725–734.

- LIU, H.C. & HSIA, C.Y. (2003). Distinctions between c-Rel and other NF- κ B proteins in immunity and disease. *Bioessays*. **25**: 767-780.
- LIPNIACK, T. *et al.* (2004). Mathematical model of NF-kappaB regulatory module." *J Theor Biol*. **228**(2): 195-215.
- LISSONI, P. (1999). The pineal gland as a central regulator of cytokine network. *Neuro Endocrinol Lett*. **20**(6): 343-349.
- LIU, F. *et al.* (2001). Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. *J. Neural. Transm.* **108**: 397-405.
- LOPES, C. *et al.* (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*. **23**: 72-78.
- LOPES, C. *et al.* (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res*. **50**: 6-11.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F. *et al.* (1992). Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in rat pineal stalk astrocytes. *Histol. Histopathol*. **7**: 643-6.
- LOTUFO, C.M.C. *et al.* (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leucocyte rolling and adhesion to microcirculation. *Eur J Pharmacol*. **430**: 351-357.
- LOTUFO, C.M.C. *et al.* (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B₄. *Eur J Pharmacol*. **534**: 258-263.
- LUCHETTI, F. *et al.* (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 3603-3624.
- LUO, Z.R. *et al.* (1984). Ultrastructural characterization of glial cells in the rat pineal gland with special reference to the pineal stalk. *Anat Rec*. **210**: 663-674.
- MAES, M. *et al.* (1994). Seasonal variation in peripheral blood leukocyte subsets and in serum interleukin-6, and soluble interleukin 2 and 6 receptor concentrations in normal volunteers. *Experientia* **50**: 821-829.
- MAESTRONI, G.J.M. *et al.* (1998). The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol. B*, **43**(3): 186-92.
- MARKUS, R.P. *et al.* (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*. **14**: 126-133.
- MARKUS, R.P. *et al.* (2010). Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacol Ther*. **126**: 251-262.

- MARONDE, E. *et al.* (1995). The effect of NO-donors in bovine and rat pineal cells: stimulation of cGMP and cGMP-independent inhibition of melatonin synthesis. *J Neuroendocrinol.* **7**(3): 207-14.
- MCCOY, M.K. & TANCEY, M.G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinfl.* **5**: 45.
- MERCURIO, F. & MANNING, A.M. (1999). Multiple signals converging on NF- κ B. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 226 – 232.
- MIKKELSEN, J.D & MØLLER, M. (1990). A direct neural projection from the intergeniculate leaflet of the lateral geniculate nucleus to the deep pineal gland of the rat, demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res.* **520**: 342–346.
- MØLLER, M. (1992). Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* **21**: 188-204.
- MØLLER, M. (1997). Peptidergic cells in the mammalian pineal gland. Morphological indications for a paracrine regulation of the pinealocyte. *Biol Cell* **89**:561–567.
- MØLLER, M. (1999). Introduction to mammalian pineal innervation. *Microsc Res Tech* **46**: 235–238.
- MØLLER, M. & BAERES, F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* **309**: 139-150.
- MØLLER, M. & HAY-SCHMIDT, A. (1998). Direct neuronal projection from the dorsal raphe nucleus to the pineal complex of the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin in vivo neuronal tracing study. *J Pineal Res.* **25**: 19–23.
- MØLLER, M. *et al.* (1978). Immunohistochemical demonstration of S100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain. Res.* **140**: 1-13.
- MØLLER, M. *et al.* (1990). Evidence for a direct neuronal projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the pineal complex of the rat: an anterograde study by use of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Adv Pineal Res.* **4**: 1-8.
- MØLLER, M. *et al.* (1996). The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland: neuropeptides. *Neurochem Int.* **28**: 23-33.
- MOORE, R.Y. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med.* **48**: 253– 266.
- MORTANI-BARBOSA, E.J. *et al.* (2000). Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol.* **401**: 59-62.

- MOSS, M.L. *et al.* (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* **385**: 733 – 736.
- MOSZKOWSKA, O. (1951). Effect of epiphyseal extracts on young adult female guinea pigs. *Seances Soc Biol Fil.* **145**(11-12): 845-7.
- MUCHA, E. *et al.* (1994). Effect of interleukin-1 on in vivo melatonin secretion by the pineal gland in rats. In: *Advances in Pineal Research*. G.J.M. Maestroni, A. Conti, and R.J. Reiter, eds. John Libbey&Co. London, pp. 177–181.
- MUNDIGLER, A. *et al.* (2002). Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* **30**: 536-540.
- NELSON, R.J. & DEMAS, G.E. (1996). Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol* **71**: 511– 548.
- NELSON, R.J., DEMAS, G.E.; KLEIN, S.L. (1998). Photoperiod mediation of seasonal breeding and immune function in rodents: A multifactorial approach. *Amer. Zool.* **38**: 226-237.
- NELSON, R.J. & DRAZEN, D.L. (1999). Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reprod Nutr Dev.* **39**(3): 383-98.
- NELSON, R.J. & DRAZEN, D.L. (2000) Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann NY Acad Sci.* **917**:404-415.
- NELSON, R.J. *et al.* (2002). *Seasonal Patterns of Stress, Immune Function, and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press,
- NEUMANN, M. & NAUMANN, M. (2007). Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J.* **21**(11): 2642-54.
- NOSJEAN, O. *et al.* (2000). Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* **275**: 31311–31317.
- NURNBERGER, W. *et al.* (1995). Definition of a new score for severity of generalized Neisseria meningitidis infection. *Eur J Pediatr.* **154**(11): 896–900.
- OKSCHE, A. (1965) Survey of the development and comparative morphology of the pineal organ. *Prog. Brain Res.* **10**: 3-29.
- OLCESE, J. (1991). Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J Neurochem.* **57**(3): 943-7.
- PERKINS, N.D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor κ B pathway. *Oncogene.* **25**: 6717–30.

- PERREAU-LENZ, S. *et al.* (2003). Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Euro Jour of Neurosci.* **17**: 221-228.
- PIOLI, C. *et al.* (1993). Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non-specific signals for T-cell proliferation. *Int. J. Immunopharmac.* **15**: 463-468.
- POEGGELER, B. *et al.* (2002). Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* **33**: 20-30.
- PONTES, G.N. *et al.* (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res.* **41**: 136-141.
- PONTES, G.N. *et al.* (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* **43**: 365-371.
- PRENDERGAST, B.J. *et al.* (2004). Photo-period controls the induction, retention, and retrieval of antigen-specific immunological memory. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **286**: 54-60.
- PROVENCIO, I. *et al.* (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* **20**: 600-605.
- QUAY, W.B. (1963). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol.* **14**: 473-479.
- QUAY, W.B. (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med.* **115**: 710-713.
- REITER, R.J. (1973). Comparative physiology: pineal gland. *Annu Rev Physiol.* **35**: 305-328.
- REITER, R.J. (1981). The mammalian pineal gland: structure and function, *Am. J. Anat.* **162**: 287-313.
- REITER, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* **12**: 151-180.
- REITER, R.J. *et al.* (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **917**: 376-386.

- REITER, R.J. *et al.* (2007). Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J Physiol Pharmacol.* **58**: 5-22.
- REITER, R.J. *et al.* (2008). Melatonin in relation to the "strong" and "weak" versions of the free radical theory of aging. *Adv Med Sci.* **53**: 119-129.
- REITER, R.J. *et al.* (2009). Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther.* **8**: 354-360.
- REITER, R.J. *et al.* (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod.* **81**: 445-456.
- REPPERT, S.M. *et al.* (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* **13**: 1177-1185.
- REPPERT, S.M. *et al.* (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 8734- 8738.
- REPPERT, S.M. & WEAVER, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nat.* **418**: 935-941.
- RIBELAYGA, C. *et al.* (1997). Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* **777**: 247-250.
- RIBELAYGA, C. *et al.* (1998). Ontogenesis of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and activity in the rat pineal gland. *Brain Res Dev Brain Res.* **110**:235-239.
- RIBELAYGA, C. *et al.* (1999) Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its consequence on melatonin synthesis. *J Biol Rhyth.* **14**: 105-115.
- RIBELAYGA, C. *et al.* (2000). HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **278**: 1339-1345.
- ROBAK, T., GLADALSKA, A., STEPIEN, H. (1998). The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw.* **9(2)**: 145-154.

- ROSEBOOM, P.H. *et al.* (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinol.* **137**: 3033-3045.
- ROTHER, M. *et al.* (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**: 1243-1252.
- ROTHER, M. *et al.* (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**: 681-692.
- ROTHWART, D.M. & KARIN, M. (1999). The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE*. **1999**(5)
- SCHOMERUS, C. *et al.* (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem.* **75**: 2123-2132.
- SCHON, F. *et al.* (1985) Neuropeptide Y innervation of the rodent pineal gland and cerebral blood vessel. *Neurosci Letters*. **57**: 65-71.
- SCHRÖDER, H. & MALHOTRA, S.K. (1987). Characterization of rodent pineal astrocytes by immunofluorescence microscopy using a monoclonal antibody (J1-31). *Cell Tissue Res.* **248**(3): 607-10
- SCHULTZE-OSTHOFF, K. *et al.* (1998). Apoptosis signalling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **25**: 439-459.
- SEN, R. & BALTIMORE, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-928.
- SHELDON, B.C. & VERHULST, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Tree* **11**: 317-321.
- SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* **55**: 325-395.
- SIMONNEAUX, V. *et al.* (1994). Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J Neurochem.* **62**: 2464-71.
- SIMONNET, V. *et al.* (1951). Effect of pineal gland on the ovary of the young rat. *Ann Endocrinol.* **12**(2): 202-5.
- SKWARLO-SONTA, K. *et al.* (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol.* **81**: 342-349

- SLOMINSKI, A. *et al.* (2002). Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEBJ*. **16**: 896-898.
- SLOMINSKI, A. *et al.* (1996). Metabolism of serotonin to N-acetylserotoninmelatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem*. **271**: 12281-12286.
- SLOWIK, M.R. *et al.* (1993). Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *AmJ Pathol* **143**(6): 1724-1730.
- SRINIVASAN, J. *et al.* (2008). Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmuno* **15**(2): 93-101.
- STEHLE, J.H. *et al.* (2001). Analysis of cell signaling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcription in neural/endocrine cells. *Eur J Neurosci*. **14**: 1-9.
- STUDNICKA, F.K. (1905). Parietalorgane. In Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen anatomie der wirbeltiere, part 5 (ed. A. Oppel). Jena, Germany: Gustav Fischer.
- SUGDEN, D. & KLEIN, D.C (1983a). Beta-adrenergic receptor control of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. *Endocrinol* **113**: 348-353.
- SUGDEN, D. & KLEIN, D.C (1983b). Adrenergic stimulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. *Brain Res* **265**: 348-351.
- SUGDEN, D. & KLEIN, D.C. (1985). Development of the rat pineal alpha 1-adrenoceptor. *Brain Res*. **325**(1-2): 345-8.
- SUGDEN, L.A. *et al.* (1985). Alpha-adrenergic potentiation of beta-adrenergic stimulation of rat pineal N-acetyltransferase. Studies using cirazoline and fluorine analogs of norepinephrine. *Biochem Pharmacol*. **33**(24): 3947-50.
- SUGDEN, L.A. *et al.* (1987). Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J Biol Chem*. **262**: 741-745.
- SUN, S.C. *et al.* (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**: 1912-15.
- SUZUKI, T. & KACHI, T. (1995). Immunohistochemical studies on supporting cells in the adrenal medulla and pineal gland of adult rat, especially on S-100 protein, glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Kaibogaku Zasshi*. **70**: 130-9.

- TAKEUCHI, M. *et al.* (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor- κ B activation and association with tumor necrosis factor signalling proteins. *J Biol Chem.* **271**: 19935–19942.
- TAN, D.X. *et al.* (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **85**(3): 607-23
- TAN, D.X. *et al.* (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* **42**: 28-42.
- TARTAGLIA, L.A. *et al.* (1993a). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**: 845–853
- TARTAGLIA, L.A. *et al.* (1993b). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signalling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* **268**(25): 18542–18548
- TECLEMARIAM-MESBAH, R. *et al.* (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol.* **406**: 171-182.
- THOMA, B. *et al.* (1990). Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *The Journal of experimental medicine.* **172**: 1019-23.
- TRACEY, D. *et al.* (1988). Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. *J Infect Dis.* **157**(3): 413-20.
- TRACEY, D. *et al.* (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* **117**: 244-279.
- TSAI, S.Y. & MCNULTY, J.A. (1997). Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. *Glia.* **20**: 243-253.
- TSAI, S.Y. & MCNULTY, J.A. (1999). Interleukin-1 β expression in the pineal gland of the rat. *J Pineal Res.* **27**: 42-48.
- TSAI, S.Y. *et al.* (2001b). Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* **303**: 423-431.
- TSAI, S.Y. *et al.* (2001a). TGF- β 1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1 β . *Histol Histopathol.* **16**: 1135-1141.

- VACAS, M.I. *et al.* (1987). In vitro effect of neuropeptide Y on melatonin and norepinephrine release in rat pineal gland. *Cell Mol Neurobiol.* **7**(3): 309-15.
- VALLABHAPURAPU, S. & KARIN, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* **27**: 693-733.
- VANECEK, J. *et al.* (1985). Atypical synergistic α - and β -adrenergic regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinol.* **116**: 2167-2173.
- VOLLRATH, L. (1981). The pineal organ. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Vol VI/7. Oksche A. and Vollrath L. (eds). Springer. Berlin, Heidelberg, New York. pp 1-665
- WAAGE, A., HALSTENSEN, A., ESPEVIK, T. (1987). Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet.* **1**(8529): 355-357.
- WAJANT, H. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**: 45-65.
- WALDHAUSER, F. *et al.* (1984). Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinol.* **39**: 307-313
- WANG, C.Y. *et al.* (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* **281**(5383): 1680-3.
- WERNER, S.L. *et al.* (2008). Encoding NF-kappaB temporal control in response to TNF: distinct roles for the negative regulators I κ B α and A20. *Genes & Dev.* **22**(15): 2093-101.
- WHITESIDE, S.T. & ISRAEL, A. (1997). I κ B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* **8**: 75-82
- WIESENBERG, I. *et al.* (1995). Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* **23**: 327-333.
- WINSTON, B.W. *et al.* (1995). Tumor necrosis factor α rapidly activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade in a MAPK kinase kinase-dependent, c-Raf-1-independent fashion in mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1614-1618.
- WINZEN, R. *et al.* (1992). Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells. *J Immunol.* **148**(11): 3454-3460

- WITHYACHUMNARNKUL, B., *et al.* (1990a). Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J. Pineal. Res.* **8**: 313–322.
- WITHYACHUMNARNKUL, B. *et al.* (1990b). Interferon gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J. Interferon Res.* **10**: 403–411.
- WOLFE, D.E. (1965). The epiphyseal cell: An electron-microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. *Prog. Brain Res.* **10**: 332–386.
- WURTMAN, R.J. *et al.* (1963). Photic And Neural Control Rhythm Gland Of In The Pineal Gland: Control By Light. *Science*. **157**: 487–492
- WURTMAN, R.J. *et al.* (1967). Photic and neural control of the 24-hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* **157**: 487–492.
- ZHANG, S. *et al.* (1991). Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res.* **265**(1): 63–71.
- ZHANG, S. *et al.* (2004). Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **501**: 25–30.
- ZMIJEWSKI, M.A. *et al.* (2009). The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol.* **307**: 211–216
- ZRENNER, C. Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: a history, in: R.J. Reiter (Ed.), *Pineal Res Rev III*, Alan R. Liss, New York, 1985, pp. 1–40.
- ZYLIŃSKA, K. *et al.* (1995). Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J Neuroimmunol.* **56**: 187–190