

Sanseray da Silveira Cruz Machado

Caracterização dos receptores tipo *Toll*  
em glândulas pineais de rato e sua implicação  
no entendimento do Eixo Imune-Pineal

São Paulo

2014

Sanseray da Silveira Cruz Machado

Caracterização dos receptores tipo *Toll*  
em glândulas pineais de rato e sua implicação  
no entendimento do Eixo Imune~Pineal

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

Orientadora: Regina Pekelmann Markus

São Paulo

2014

# Ficha Catalográfica

Da Silveira Cruz Machado, Sanseray

Caracterização dos receptores tipo *Toll* em glândulas

pineais de rato e sua implicação no entendimento do Eixo

Imune-Pineal. / Sanseray da Silveira Cruz Machado. ;

Orientadora Regina Pekelmann Markus. -- São Paulo, 2014.

140 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Glândula Pineal. 2. Eixo Imune-Pineal. 3. Melatonina. I.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.

Departamento de Fisiologia. II. Título.

# COMISSÃO JULGADORA

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

*À minha família*

*“Estamos meu bem por um triz  
Pro dia nascer feliz  
O mundo inteiro acordar  
E a gente dormir”*

*“Todo dia é dia  
E tudo em nome do amor  
Ah! Essa é a vida que eu quis”*

***Frejat e Cazuza***

Agradeço à minha família, o apoio e o carinho em todos os momentos.

Também expresso minha gratidão aos valiosos amigos do Laboratório de Cronofarmacologia que acompanharam cada etapa deste processo: Alex Monteiro, Camila Petrilli, Daiane Gil Franco, Eliana Pereira, Erika Cecon, Marco Antônio Lapa, Marina Marçola, Eduardo Tamura, Sandra Muxel, Cláudia Emanuele Carvalho Sousa, Gabriela Kinker, Leila Lima, Luis Teodoro, Letícia Garcia, Michele Acco, Débora dos Santos, Livia Geovane e Vanderlei Rocha, amigos exemplares com quem aprendo a cada dia.

À Profa. Luciana Pinato, pelos conselhos e sua enorme generosidade. Sua colaboração é sempre inestimável.

Ao Prof. Pedro Fernandes, pela colaboração, parceria e pela atenção a este projeto em todos os momentos.

À Profa. Zulma Ferreira, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela companhia na bancada e conselhos.

Ao suporte técnico de Eduardo Braga e Débora Aparecida Moura.

À orientadora Profa. Regina Pekelmann Markus, pela oportunidade e confiança, pela generosidade em compartilhar sua sabedoria e também pelo cuidado ao longo destes anos. Serei eternamente grato.

Aos colegas de laboratório na *University of Texas Southwestern Medical Center* ou *University of Michigan*, Roberta Cravo, Dhirender Ratra, Nicole Bellefontaine, David Garcia, Hosung Sim, Laura Burger e Beatriz Borges. Em especial a Susan Allen e Andressa Coope.

À co-orientadora Profa. Carol Elias, pela oportunidade de estágio em seu laboratório no exterior e por acreditar, financiar e permitir a execução dos projetos. Obrigado pela colaboração.

Aos colaboradores no exterior, Joel Elmquist e Suzanne Moenter.

Agradeço, por fim, o essencial apoio financeiro das agências de fomento FAPESP (10/51101-3 e 12/16536-4), CNPq e CAPES.



# Sumário

I.INTRODUÇÃO .....	16
Glândula Pineal e Melatonina.....	16
Reguladores da produção de melatonina.....	21
Eixo Imune-Pineal .....	23
Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB).....	28
Receptores do tipo Toll (Toll-Like Receptors).....	33
Considerações finais .....	37
II. OBJETIVOS.....	40
III. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
1. Animais .....	42
2. Drogas e Reagentes.....	43
3. Preparo de Drogas .....	44
4. Cultura primária de pinealócitos .....	45
5. Cultura de glândulas pineais .....	45
6. Tratamentos in vitro .....	46
7. Tratamentos in vivo .....	46
Bloqueio do receptor de glicocorticóides (GR) por mifepristona ...	46
Indução de ganho de peso por dieta hipercalórica.....	47
Tratamento dos animais com melatonina.....	47
8. Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal .....	48
9. Extração de proteína nuclear .....	50
10. Ensaio de eletromobilidade por retardo em gel (EMSA, <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ) .....	51
11. Ensaio de <i>super-shift</i> .....	53
12. Determinação de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	54

13. Determinação do conteúdo circulante de melatonina em modelos in vivo.....	54
14. Transcrição Gênica .....	55
15. Análise estatística.....	59
IV. RESULTADOS .....	62
1. Caracterização da expressão gênica circadiana de mediadores inflamatórios em glândulas pineais de rato.....	62
- Receptores do tipo Toll (TLRs).....	64
- Adaptadores e Efetores da sinalização via TLRs.....	66
- Fator de transcrição NF- $\kappa$ B.....	70
- Família MAPK .....	72
- Citocinas.....	74
- Receptores de Citocinas .....	75
2. Expressão proteica de componentes da maquinaria de sinalização via TLRs e NF- $\kappa$ B em pinealócitos de rato.....	77
3. Ativação de receptor de glicocorticóides (GR) modula a expressão de genes inflamatórios e a síntese de melatonina na glândula pineal. ....	80
4. Efeitos da ativação dos ligantes de TLR1/TLR2 (Pam3CSK4) ou TLR2 e TLR6 (zimosan) na glândula pineal de ratos .....	85
- Efeitos sobre o fator de transcrição NF- $\kappa$ B:.....	85
- Efeitos sobre a síntese de melatonina:.....	90
5. Efeitos da exposição aguda à dieta hipercalórica sobre a síntese de melatonina em ratos .....	91
I.DISSCUSSÃO .....	97
TLRs/NF- $\kappa$ B em condições de hígidez .....	98
TLRs/NF- $\kappa$ B em condições inflamatórias .....	104
VI. CONCLUSÕES .....	114
VII. RESUMO .....	116

VIII. ABSTRACT.....	117
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
XX. SÚMULA CURRICULAR.....	131
XI. ANEXO .....	140

# Lista de Abreviaturas

<b>5-HT</b>	serotonina
<b>5-HTP</b>	5-hidroxitriptofano
<b>AAAD</b>	enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos
<b>AA-NAT</b>	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
<b>AMPc</b>	monofosfato de adenosina cíclico
<b>AP-1</b>	proteína ativadora 1
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guerin
<b>CD14</b>	<i>cluster differentiation 14</i>
<b>CRE</b>	elemento responsivo a AMPc
<b>CREB</b>	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
<b>DAMP</b>	<i>danger-associated molecular pattern</i>
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>EMSA</b>	ensaio de eletromobilidade em gel
<b>GABA</b>	ácido gama-aminobutírico
<b>GCS</b>	gânglio cervical superior
<b>GFAP</b>	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , marcador de astrócitos
<b>GR</b>	receptor para glicocorticóides
<b>HFD</b>	<i>High-Fat Diet</i> , dieta hipercalórica
<b>HIOMT</b>	enzima hidroxindol-O-metiltransferase
<b>HMGB-1</b>	<i>high-mobility group Box 1</i>
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta eficiência
<b>HSP</b>	<i>heat shock protein</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon gama
<b>IKB</b>	proteína inibitória <i>kappa B</i>

<b>IKK</b>	proteína quinase de IκB
<b>IL</b>	interleucina
<b>iNOS</b>	sintase de óxido nítrico induzível
<b>IRAK</b>	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
<b>IRF3</b>	<i>interferon regulatory factor 3</i>
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>MAL</b>	<i>MyD88-adapter-like</i>
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MEL</b>	melatonina
<b>MyD88</b>	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>NA</b>	noradrenalina
<b>NAS</b>	N-acetilserotonina
<b>NEMO</b>	modulador essencial de NF-κB
<b>NF-κB</b>	fator nuclear <i>kappa</i> B
<b>NSQ</b>	núcleos supraquiasmáticos
<b>PAMP</b>	padrões moleculares associados à patógenos
<b>PBS</b>	tampão fosfato-alcalino
<b>PKA</b>	proteína quinase dependente de AMPc
<b>PKC</b>	proteína quinase dependente de cálcio
<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>pM, nM, μM</b>	picomolar, nanomolar e micromolar, respectivamente
<b>PVN</b>	núcleos paraventriculares
<b>RHD</b>	domínio de homologia <i>Rel</i>
<b>RIP1</b>	<i>receptor-interacting protein 1</i>
<b>SARM</b>	<i>sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein</i>
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>TAD</b>	domínio de transativação

<b>TAK1</b>	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	fator de crescimento transformador beta
<b>TIR</b>	domínio <i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
<b>TIRAP</b>	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
<b>TLRs</b>	receptores do tipo <i>toll</i>
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>TNFR</b>	receptor de TNF
<b>TPOH</b>	triptofano hidroxilase
<b>TRAF</b>	<i>TNF receptor-associated factor</i>
<b>TRAM</b>	<i>TRIF-related adaptor</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i>

# Introdução

# I. INTRODUÇÃO

## ***Glândula Pineal e Melatonina***

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal sob a influência do relógio biológico central localizado nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ). Através de uma comunicação direta com a retina os NSQ regulam a produção de melatonina na glândula pineal frente às variações rítmicas do fotoperíodo, permitindo que este hormônio seja produzido e liberado apenas na fase de escuro ambiental (revisto por Simmoneaux e Ribelayga, 2003).

A presença do fotopigmento melanopsina em células ganglionares retinianas permite a percepção do sinal luminoso, que é convertido em sinal elétrico e, via trato retino-hipotalâmico, sincronização do relógio biológico central (Provencio et al., 2000). Durante a fase de claro ambiental, sinais inibitórios GABAérgicos provenientes dos NSQs para o núcleo paraventricular (PVN) induzem a inibição da via neural que se segue até a glândula pineal (Kalsbeek et al., 2000, 2006). No início e durante a fase de escuro, os NSQs sinalizam ao PVN via estimulação glutamatérgica, permitindo a subsequente ativação da via multi-sináptica via coluna intermédio-lateral da medula espinhal, de onde fibras pós-ganglionares projetam aferências simpáticas diretamente à glândula pineal (Tecemariam-Mesbah et al., 1999) liberando noradrenalina (Wurtman et al., 1967;



Drijfhout et al., 1996) e o co-transmissor purinérgico ATP (Mortani-Barbosa et al., 2000).

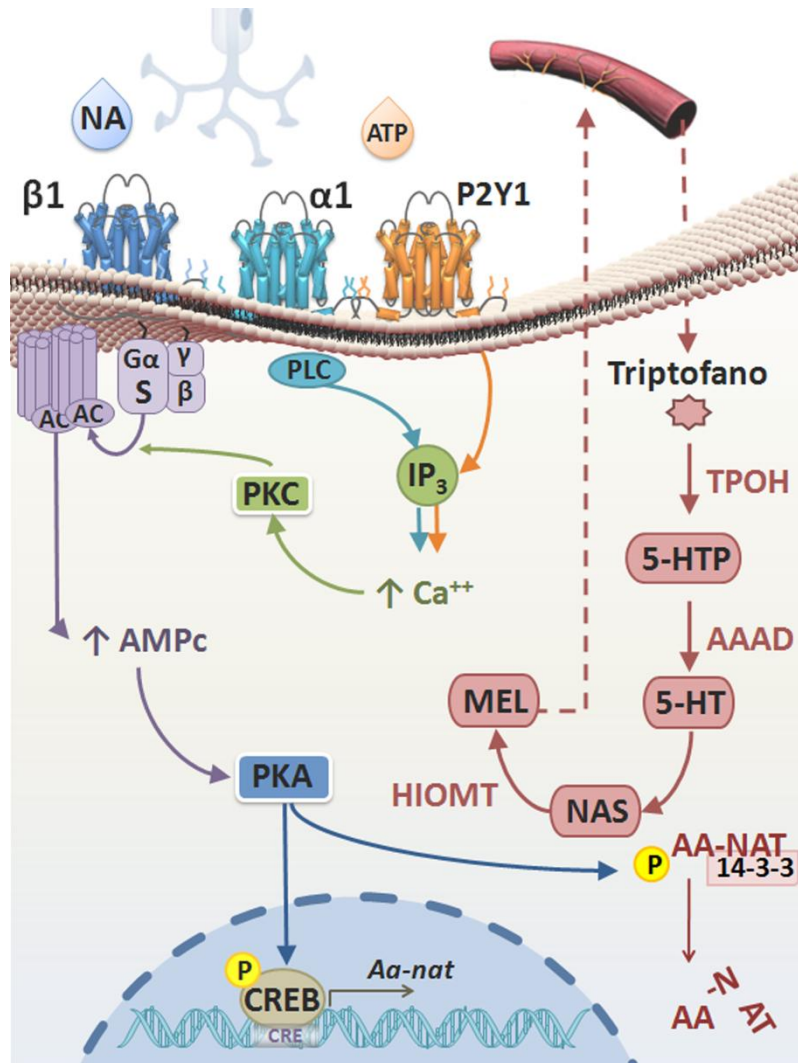
A glândula pineal é um órgão neuroendócrino único localizado no plano mediano entre as comissuras habenular e posterior em praticamente todos os mamíferos (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). No entanto, em roedores a pineal migrou no sentido dorso-caudal e está conectada ao sistema nervoso central por uma haste denominada *pineal stalk*, ou pedúnculo pineal, por onde a glândula recebe a inervação e a vascularização (Møller e Baeres, 2002; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Estudos demonstram que as características celulares da glândula pineal de humanos e roedores são semelhantes. As células produtoras de melatonina, os pinealócitos, compõem aproximadamente 80-90% da quantidade total de células da glândula e estão dispersas ao longo do parênquima da pineal em proximidade aos vasos sanguíneos (Karasek e Reiter, 1992). Células intersticiais também são encontradas no parênquima da glândula pineal em contato próximo aos pinealócitos. As principais células intersticiais presentes na pineal são: astrócitos, fibras nervosas, células endoteliais e células da microglia. Em nossa experiência, na glândula pineal de ratos, microglia e astrócitos são facilmente identificadas em ensaios de imunohistoquímica para marcação de ED-1 (CD68) ou GFAP, respectivamente (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2012), enquanto os pinealócitos podem ser identificados adequadamente quando isolados em cultura (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012; Carvalho-Sousa et al., 2011).

A biosíntese de melatonina ocorre via quatro reações enzimáticas: Inicialmente, o aminoácido triptofano é captado da circulação e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase 1. Em seguida, 5-HTP é convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) pela ação da enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos. Esta parte da cascata metabólica ocorre durante todas as 24 horas do dia. O passo chave que garante a produção de melatonina exclusivamente durante a fase de escuro envolve a presença da enzima aril-alquil-N-acetiltransferase (AANAT) que, a partir da serotonina, produz N-acetilserotonina (NAS), para ser metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) e formar melatonina (Revisto por Simmoneaux e Ribelayga, 2003). Uma vez que a melatonina não é estocada em pinealócitos, este hormônio é rapidamente liberado no líquido cefalorraquidiano e na circulação à medida que sua produção ocorre (Tricoire et al., 2003). Portanto, o conteúdo plasmático de melatonina em condições fisiológicas reflete a produção pineal, uma vez que a pinealectomia abole por completo a detecção do conteúdo noturno deste hormônio na circulação (revisto por Reiter, 1991).

Em relação à cascata de sinalização que induz a síntese de melatonina, é bem caracterizado que a noradrenalina ativa receptores transmembrânicos do tipo  $\beta 1$ -adrenérgicos (Revisto por Simmoneaux and Ribelayga, 2003). Estes receptores são expressos na membrana de pinealócitos em alta densidade (Harmouch et al., 1994) e também possuem variação rítmica ao longo do fotoperíodo, com maior expressão durante a fase de escuro ambiental (Pangerl et al., 1990). Após a ativação destes receptores, a cascata de sinalização é iniciada devido ao aumento

intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) que promove a ativação da proteína quinase A (PKA) que possui duas funções: a primeira, de fosforilar o fator de transcrição CREB (do inglês, *cAMP response element binding protein*) o qual se transloca ao núcleo e regula a transcrição gênica no promotor da enzima AANAT. Após sua tradução em proteína, a enzima AANAT é então fosforilada pela PKA impedindo sua degradação por proteossoma, tornando-a ativa para atuar na conversão de serotonina em N-acetilserotonina (Coon et al., 2002). Neste ponto é importante salientar que este mecanismo é conservado em mamíferos e a principal diferença na via de síntese de melatonina é que, em humanos, a enzima AANAT é transcrita constitutivamente e o aumento noturno da atividade da PKA, induzido pela noradrenalina, promove a disponibilidade proteica desta enzima (Ganguly et al., 2002). Já em roedores de hábito noturno, a ação da PKA é fundamental para a disponibilidade do RNAm e da proteína da enzima AANAT (Simonneaux e Ribelayga, 2003).



**Figura 1: Via de síntese de melatonina:** A noradrenalina (NA) liberada na fase de escuro pelas fibras pós-ganglionares simpáticas interage com receptores de sete domínios transmembrânicos do tipo  $\beta$ 1-adrenérgicos. Estes receptores são acoplados à proteína Gs e ativam a adenilil ciclase (AC) promovendo aumento do segundo mensageiro AMPc que, por sua vez, ativa a quinase PKA. A PKA atua fosforilando o fator CREB, permitindo a transcrição da enzima AANAT. A PKA ainda fosforila a AANAT permitindo sua ligação à chaperona 14-3-3, o que a protege de degradação. NA atuando em receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, ou ATP atuando em receptores purinérgicos P2Y1 potencializam a transcrição da AA-NAT via PKC ativada pelo aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . A cascata de síntese se inicia com o metabolismo de triptofano para formar 5-HT que é substrato para ação direta da enzima AANAT para formar NAS, que por sua vez é metilada em melatonina pela enzima HIOMT. A melatonina é liberada na circulação e no líquido cefalorraquidiano rapidamente, à medida que é sintetizada (Baseado em Ganguly et al., 2002; Simonneaux e Ribelayga, 2003).

## ***Reguladores da produção de melatonina***

Até o momento apresentamos que a alternância no fotoperíodo é o principal regulador da produção de melatonina na glândula pineal. De fato, nas últimas décadas a caracterização dos mecanismos que regulam a síntese deste hormônio na pineal em condições fisiológicas foi alvo de intensa pesquisa e está bem caracterizada (Zawilska et al., 2009). A melatonina é produzida de forma rítmica pela glândula pineal e pela retina (Baba et al., 2009). Ainda, mesmo em condições independentes de decorrências cronobiológicas, as principais enzimas para a síntese desta indolamina (AANAT e HIOMT) já foram descritas em diversos tecidos, como sistema digestivo (Raikhlin, et al., 1976; Konturek, et al., 2007; Bertrand, et al., 2010), na glândula harderiana (Coto-Montes, et al., 1996), no epitélio respiratório (Kvetnoy, 1999), timo, baço e rins (Gomez-Corvera, et al., 2009; Sanchez-Hidalgo, et al., 2009), na medula óssea (Gomez-Corvera, et al., 2009), placenta (Sagrillo-Fagundes, et al., 2014), gônadas (Tijmes, et al., 1996; Itoh, et al., 1997; Itoh, et al., 1999), pele (Fischer, et al., 2006), células do sistema imunológico, como macrófagos (Martins, et al., 2004; Muxel et al., 2012), mastócitos (Maldonado, et al., 2010) e também por células do sistema nervoso central como neurônios, microglia e astrócitos (Stefulj, et al., 2001; Pinato et al., 2013). Neste ponto é importante salientar que não faz parte do escopo desta tese aprofundar nos mecanismos que regulam a síntese extra-pineal de melatonina. No entanto, algumas considerações merecem espaço. A pinealectomia é capaz de reduzir por completo os níveis circulantes de melatonina (revisito por Reiter, 1991). Embora o conteúdo de

melatonina em vários tecidos já tenha sido determinado em diferentes condições experimentais, poucos estudos conseguiram determinar se a produção extra-pineal de melatonina contribui para os níveis circulantes. Neste sentido, a produção tônica de melatonina em outros tecidos (na faixa de concentração de  $\mu\text{M}$  a  $\text{mM}$ ) é descrita por atuar como efector no controle local de processos relacionados à defesa tecidual (Markus et al., 2007, 2013). As vias que regulam esta produção também estão bem caracterizadas, bem como a relevância da produção desta indolamina localmente como um sinalizador e regulador em respostas inflamatórias (Carrillo-Vico, et al., 2004; Martins, et al., 2004; Pontes, et al., 2006; Tan, et al., 2007; Maldonado, et al., 2010; Muxel, et al., 2012; Carrillo-Vico, et al., 2013; Pires-Lapa, et al., 2013; Pinato et al., 2013).

O estado de higidez do organismo também é um fator que regula a quantidade de melatonina circulante, pois influencia a síntese de melatonina pela glândula pineal. É bem caracterizado que a produção noturna de melatonina é reduzida em diversas condições fisiopatológicas como: depressão (Soria et al., 2010), transtornos de espectro autista (Toma et al., 2007; Melke et al., 2008), déficit de atenção e hiperatividade (Toma et al., 2007; Melke et al., 2008; Jonsson et al., 2010), transtorno bipolar (Galecki et al., 2010; Chaste et al., 2011; Etain et al., 2012), infecção local ou sistêmica (Mundigler et al., 2002; Olofsson et al., 2004; Perras et al., 2006), mastite (Pontes et al., 2006, 2007), doença de Alzheimer (Liu et al., 1999; Mishima et al., 1999). Grande parte destes estudos não estabeleceu os mecanismos que regulam a síntese de melatonina nestas condições. No

entanto, é consonante a ideia de que a regulação na transcrição, conteúdo ou atividade da enzima AANAT é ingrediente importante deste processo.

Nas últimas duas décadas, houve um avanço importante no entendimento de mecanismos que regulam a produção deste hormônio por mediadores endógenos do organismo e, atualmente, é aceito que a glândula pineal é capaz de perceber sinais provenientes do sistema imunológico (Skwarlo-Sonta et al., 1996, 2003; Tsai et al., 2001). Nossos trabalhos contribuíram para essa literatura e agregaram a possibilidade de que durante processos inflamatórios, a comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o estado de atividade do sistema imunológico permita a regulação no conteúdo circulante de melatonina e o ajuste das respostas de defesa.

### ***Eixo Imune-Pineal***

O Eixo Imune-Pineal consolida o conceito de uma comunicação recíproca entre a atividade do sistema imunológico e a regulação da produção de melatonina em suas diferentes fontes, pineal ou extra-pineal (Markus et al., 2007, 2013). As primeiras observações para esta concepção foram obtidas em modelo de inflamação crônica em camundongos induzida por injeção de BCG (Bacilo Calmette-Guerin) na pata. Foi determinado que o tamanho do inchaço na pata apresentava ritmo circadiano, maior na fase de claro comparado a fase de escuro (Lopes et al. 1997). A participação da glândula pineal neste processo foi confirmada por procedimentos que bloqueiam o conteúdo de melatonina circulante: a remoção cirúrgica da

pineal ou a remoção cirúrgica dos terminais simpáticos que inervam a glândula aboliram o ritmo no tamanho da pata (Lopes et al., 1997). Este trabalho também foi importante para sugerir que a glândula adrenal participa da regulação da função pineal, uma vez que a adrenalectomia também abolia o ritmo da lesão na pata dos camundongos por reduzir a produção de melatonina, detectada através da excreção noturna do metabólito 6-sulfatoximelatonina (Lopes et al., 2001). Posteriormente, foi determinado que a glândula pineal expressa receptores para glicocorticóides (GR) e que corticosterona potencia a produção de melatonina em modelos *in vitro* (Ferreira et al., 2005) e *in vivo* (Fernandes et al., 2009).

Concentrações de melatonina, ou seu precursor N-acetilcerotonina, compatíveis com as encontradas no plasma durante a fase de escuro limitam o rolamento e a aderência de leucócitos à camada endotelial e, conseqüentemente, a montagem da resposta inflamatória local (Lotufo et al., 2001). Os resultados obtidos neste trabalho permitiram sugerir que a glândula pineal, além de reconhecer glicocorticóides, deveria ser sinalizada por moléculas que participam da montagem da resposta inflamatória, de modo a permitir a redução do conteúdo circulante de melatonina e a migração de células imunes para o local do processo inflamatório. Neste contexto, havendo a necessidade de se montar respostas inflamatórias, o adequado seria que a glândula pineal discernisse entre fatores que sinalizam estados de higidez ou inflamatórios. Havendo o reconhecimento de agentes inflamatórios, uma regulação nos níveis circulantes de melatonina independente do fotoperíodo seria adequada para influenciar a montagem e a resposta inflamatória.



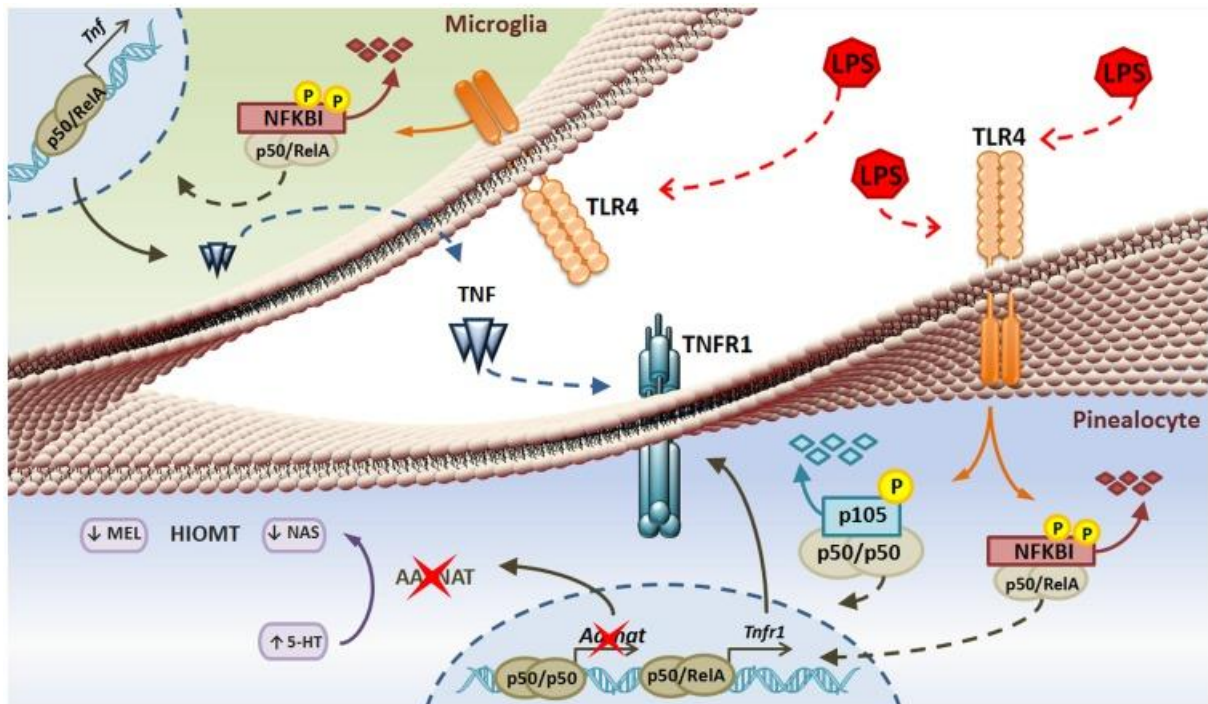
Estudos em humanos demonstraram que puérperas com mastite possuem baixo conteúdo de melatonina quando apresentam altos níveis da citocina fator de necrose tumoral (TNF) no colostro. Em contrapartida, puérperas saudáveis que não apresentavam TNF tinham o ritmo circadiano característico deste hormônio (Pontes et al., 2006, 2007). Outro estudo em humanos avaliou os níveis de melatonina em mulheres que participaram de processo cirúrgico para a remoção do útero, histerectomia: novamente foi possível observar alto conteúdo de TNF na noite da intervenção cirúrgica e baixo conteúdo noturno de melatonina (de Oliveira Tatsch-Dias et al., 2013). Estudos em ratos também foram utilizados para ampliar o entendimento de como a glândula pineal é regulada por esta citocina. Em experimentos *in vitro*, foi demonstrado que TNF bloqueia a produção de N-acetilserotonina induzida por noradrenalina em pineais cultivadas devido a supressão da transcrição do gene da enzima AANAT (Fernandes et al., 2006).

Estudos de outros autores também descrevem outras citocinas como moduladoras da função pineal. Em estudos *in vitro*, foi observado que interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) tem efeito dual sobre a produção de melatonina, potenciando ou inibindo sua síntese na dependência das concentrações de IFN- $\gamma$  utilizadas (Withyachumnarnkul et al., 1990; 1991). Foi evidenciado ainda que o RNAm de interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ , do inglês, *transforming growth factor beta*) são transcritos constitutivamente na glândula pineal de ratos, com maior conteúdo durante a fase de claro (Tsai e McNulty, 1999; Tsai et al., 2001a). Estes autores também observaram que estas citocinas modulam a produção

de 5-HT na glândula pineal por atuação direta sobre os pinealócitos (Tsai et al., 2001b).

Em minha dissertação de mestrado, a exemplo do trabalho referido anteriormente, observamos uma interação celular entre a microglia e os pinealócitos na glândula pineal (Figura 2). Inicialmente foi demonstrado que pinealócitos, astrócitos e microglia expressam o receptor do tipo *toll* 4 (TLR4, do inglês, *Toll-Like Receptor 4*). A ativação deste receptor por seu ligante lipopolissacarídeo (LPS) promove ativação do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) em glândulas pineais *in vitro* (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Esta via de sinalização foi determinada por atuar na forma de homodímero p50/p50 ou heterodímero p50/RelA (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Nas células da microglia, o heterodímero p50/RelA induz a produção da citocina TNF (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2012). Em pinealócitos, este heterodímero aumenta a expressão do receptor para esta citocina (TNFR1). Ainda, evidenciamos que a ativação do receptor TLR4 boqueia a síntese de melatonina e de seu precursor N-acetilserotonina induzidos por noradrenalina *in vitro* via homodímeros p50/p50 (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Em estudo *in vivo*, Jiang-Shieh e colaboradores (2005) demonstraram os efeitos do LPS administrado via intravenosa sobre a glândula pineal. Estes autores observaram que esta endotoxina atravessa a camada endotelial da glândula, se acumula em todas as células e promove ativação das células gliais. Utilizamos dois modelos *in vivo* de inflamação sistêmica por injeção intravenosa ou intracerebroventricular de LPS. Nestas condições também observamos que a ativação do TLR4 reduz a síntese e o conteúdo circulante de melatonina (Tamura et al., 2010; Pinato et al., 2013).

Portanto, pudemos estabelecer alguns mecanismos que permitem entender como a glândula pineal responde a componente de bactérias gram-negativas e citocinas.



**Figura 2:** Na glândula pineal de ratos, a ativação do receptor TLR4 pelo LPS é sinalizado via fosforilação e degradação de proteínas inibitórias que reprimem o NF- $\kappa$ B no citoplasma (NFKB1), permitindo a translocação nuclear deste fator de transcrição sob a forma de dímeros p50/p50 e p50/RelA. Na microglia, a ativação do NF- $\kappa$ B induz a produção da citocina TNF. Em pinealócitos, o heterodímero p50/RelA aumenta a expressão do receptor TNFR1, cujo pico na expressão coincide com a máxima produção de TNF pela microglia. O homodímero p50/p50, por sua vez, bloqueia a transcrição do gene da enzima AANAT, o que eleva os níveis de serotonina, enquanto promove a redução do conteúdo de N-Acetilserotonina e melatonina na glândula pineal.

A descrição de que glândulas pineais de rato expressam o receptor TLR4 abriu perspectivas para estudar se “padrões moleculares associados a sinais de perigo” (DAMPs, do inglês, *Danger-Associated Molecular Pattern*) também regulam a produção de melatonina. Nos últimos anos, vem sendo ampliada a lista de moléculas que são produzidas pelo próprio organismo e que iniciam ou perpetuam respostas imunológicas via a ativação dos TLRs (Trotta et al., 2014). Como exemplo, podemos citar a ativação de receptores TLR4 pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (Fassbender et al., 2003). O trabalho realizado por Cecon (2014) determinou que o peptídeo  $\beta$ -amilóide ativa receptores TLR4 expressos na glândula pineal, induzindo cascatas de sinalização intracelular que resultam na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e na produção de citocinas como: IL-2, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF e iNOS, bem como a própria regulação na expressão do receptor TLR4. Ainda, o peptídeo  $\beta$ -amilóide inibe a síntese de melatonina via regulação negativa da expressão da enzima AANAT. A seguir, apresentamos a via de sinalização do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e os principais trabalhos que demonstram a ativação desta via como regulador da produção de melatonina.

### ***Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)***

O fator de transcrição nuclear *kappa B* (NF- $\kappa$ B, do inglês, *Nuclear Factor kappa B*) é central para as respostas imunológicas (Bonizzi e Karin, 2004; Ghosh e Hayden, 2008) e também participa da regulação de processos fisiológicos (Kaltschmidt e Kaltschmidt 2000; revisto por Kumar et al., 2004;

revisão por Kaltschmidt et al., 2005; Wong e Tergaonkar, 2009), processos de proliferação celular (Bhakar et al., 2002; Bonizzi e Karin, 2004; Graham e Gibson, 2005), morte celular (Ruland e Mak, 2003; Sun e Ley, 2008), neuroproteção e neurodegeneração (Grilli et al., 1996; O'Neill e Kaltschmidt, 1997; Bhakar et al., 2002; Fridmacher et al., 2003).

A família de proteínas NF- $\kappa$ B interage entre si para formar homo ou heterodímeros, que são mantidos no citoplasma da célula associados a uma proteína inibitória (*I $\kappa$ B*). Na presença de um sinal, as proteínas inibitórias são fosforiladas, ubiquitinadas e degradadas para liberar os dímeros de NF- $\kappa$ B. Livres, este fator de transcrição se transloca ao núcleo regulando diversos programas transcricionais (O'Neill e Kaltschmidt, 1997). Em mamíferos, a família NF- $\kappa$ B é composta por 5 proteínas caracterizadas pelo domínio de homologia *REL*, responsável pela dimerização das subunidades e ligação destas proteínas a sequências consenso no DNA. A subunidade RelA (também conhecida como p65), RelB e c-Rel apresentam o domínio de transativação (TAD) na porção C-terminal e, portanto, podem induzir transcrição gênica. Já as subunidades p50 (codificada pelo gene *Nfkb1*) e p52 (codificado pelo gene *Nfkb2*) não apresentam este domínio e, portanto, atuam como repressores da transcrição gênica caso não estiverem associados a uma subunidade que contenha o domínio de transativação (Ghosh e Hayden, 2008).

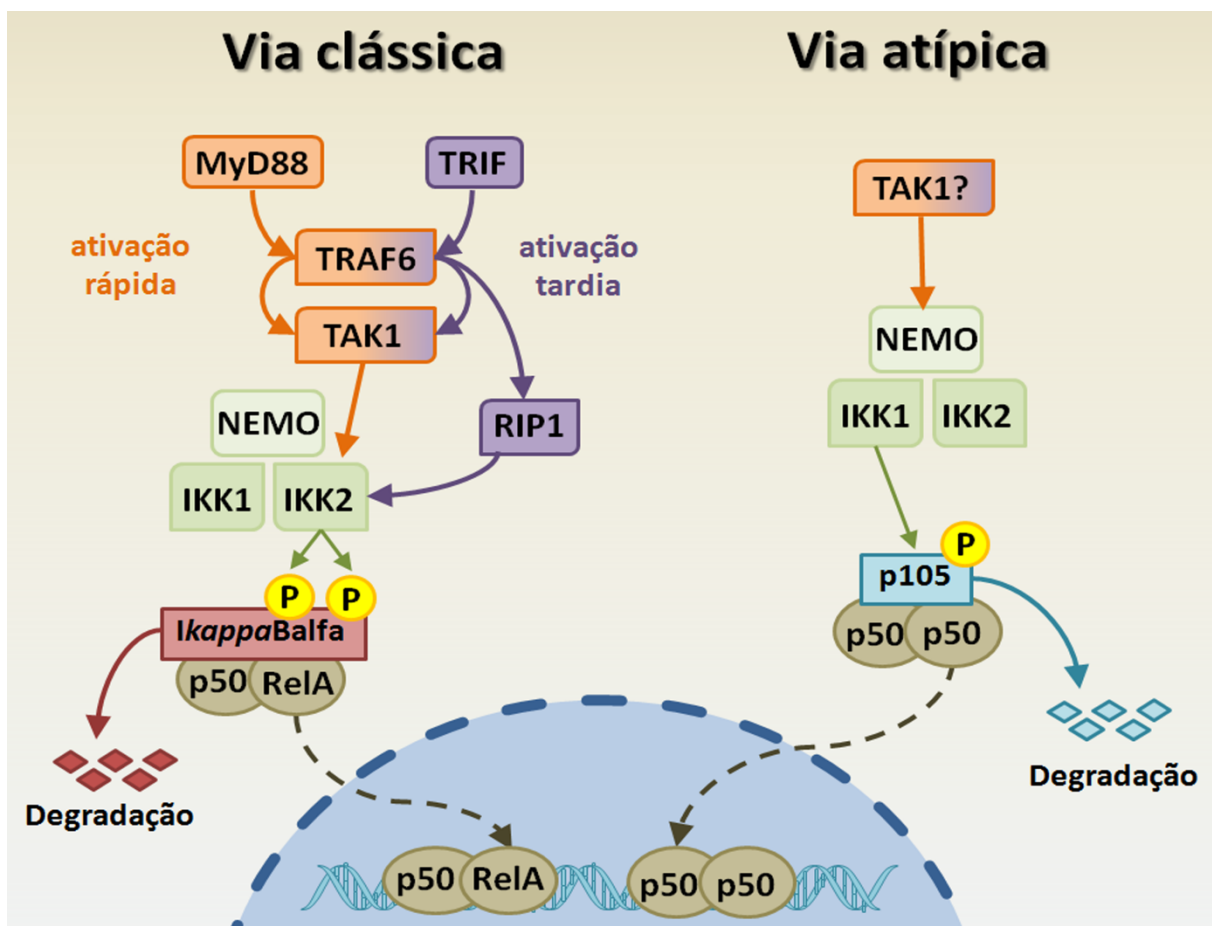
O fator de transcrição NF- $\kappa$ B tem se mostrado um mediador molecular importante para a alternância entre as fontes produtoras de melatonina (Markus et al., 2013). Em glândulas pineais de animais hípidos, o

homodímero p50/p50 de NF- $\kappa$ B está constitutivamente ativado e o seu conteúdo nuclear aumenta gradativamente ao longo da fase de claro, atingindo sua máxima expressão no final desta fase. Em seguida ao apagar das luzes, o conteúdo nuclear de NF- $\kappa$ B na glândula pineal é reduzido rapidamente (Cecon et al., 2010). Este foi o primeiro estudo a caracterizar a expressão rítmica do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em pineais de rato e a sugerir que a interação deste ritmo com a produção endógena de glicocorticóides poderiam ser mecanismos relevantes para a regulação da síntese de melatonina em condições de hígidez. O aumento do conteúdo nuclear deste fator de transcrição em pineais de rato já foi demonstrado por ser dependente de luz, uma vez que a manutenção dos animais em escuro constante impede o aumento característico que ocorre na fase de claro, em um ciclo claro/escuro (Cecon et al., 2010). Além disso, a transição entre a fase de repouso para a fase de atividade promove uma redução rápida do conteúdo de NF- $\kappa$ B em pineais e está relacionado ao aumento no conteúdo plasmático de corticosterona (Cecon et al., 2010). A ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B também é o principal mecanismo pelo qual mediadores inflamatórios regulam a síntese de melatonina na glândula pineal. Sua ativação por TNF, peptídeo  $\beta$ -amilóide ou LPS bloqueia a síntese (Fernandes et al., 2006, Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012; Carvalho-Sousa et al., 2011; Cecon, 2014), enquanto a inibição desta via por corticosterona potencia a produção de melatonina (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2009). Na pineal, além dos homodímeros constitutivos p50/p50 que atuam na repressão do gene AANAT (Fernandes et al., 2006; Cecon et al., 2010; Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010), LPS e TNF induzem a ativação de outro

dímero, p50/RelA. Este heterodímero apresenta regulação transcricional positiva, induzindo a expressão de TNF, iNOS e TNFR1 (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012; Carvalho-Sousa et al., 2011). Por outro lado, em sítios extra-pineal, o NF- $\kappa$ B é responsável por induzir a produção de melatonina em células ativadas, tanto por macrófagos, quanto por astrócitos, microglia ou células granulares do cerebelo (Muxel et al., 2012; Pinato et al., 2013, Pires-Lapa et al., 2013; Franco e Markus, 2014). Em macrófagos, as subunidades RelA e c-Rel são induzidas por zimosan ou LPS e induzem a produção de melatonina via controle transcricional positivo no promotor do gene AANAT (Muxel et al., 2012).

Sob o ponto de vista de regulação de programas transcricionais, a presença de cada subunidade ou dímero de NF- $\kappa$ B formado pode variar dependendo do tipo celular. As subunidades RelA e p50 estão presentes em praticamente todos os tecidos (Vallabhapurapu e Karin, 2009) enquanto c-Rel, RelB e p52 estão presentes principalmente em células hematopoiéticas (revisto por Liou e Hsia, 2003). Apesar de não ser regra, a literatura descreve que RelB forma, preferencialmente, heterodímero com p100 (Dobrzanski et al., 1995; Yilmaz et al., 2003). Por outro lado, as subunidades RelA e c-Rel preferencialmente formam heterodímeros com p50 (Karin e Ben-Neriah, 2000; revisto por Sun e Ley, 2008). O heterodímero p100/RelB compõe a via de sinalização alternativa da ativação do NF- $\kappa$ B e envolve o processamento de p100 em sua forma clivada p52. Os heterodímeros p50/RelA e p50/c-Rel compõem a via de sinalização clássica (ou canônica) do NF- $\kappa$ B (Karin e Ben-Neriah, 2000). Sob este ponto de vista, novas perspectivas surgiram para o

estudo da participação de outras subunidades de NF- $\kappa$ B na glândula pineal, além das já descritas em estudos anteriores, uma vez que alguns dímeros reprimem ou induzem a síntese de melatonina dependendo do contexto celular (Figura 3). Nesta tese, achamos relevante caracterizar a presença de todas as subunidades desta família de proteínas na glândula pineal/pinealócitos e também avaliar diferentes ativadores de TLRs sobre a produção de melatonina.



**Figura 3: Exemplos da sinalização do NF- $\kappa$ B via clássica ou atípica ativadas pela ativação de TLRs:** Na via clássica, o NF- $\kappa$ B pode ser ativado de forma rápida (ao utilizar adaptadores dependentes de MyD88) ou tardiamente (ao utilizar adaptadores dependentes de TRIF), ambas mediadas por TRAF6 e TAK1. O adaptador RIP1 por sua vez está envolvido apenas na via de ativação



dependente de TRIF. Estas vias convergem para ativação do complexo de IKKs, com a participação de IKK2 fosforilando a *I $\kappa$ B*-alfa nas serinas 32 e 36, a qual será degradada por proteassomas liberando o heterodímero p50/RelA para translocar ao núcleo e modular genes alvo. A via atípica de NF- $\kappa$ B envolve a ativação do complexo de IKKs, com a participação de IKK1 fosforilando p105. Após degradação por proteassomas, p105 libera o homodímero p50/p50 e sua translocação nuclear (Baseado em Beinke e Ley, 2004; Sun e Ley, 2008).

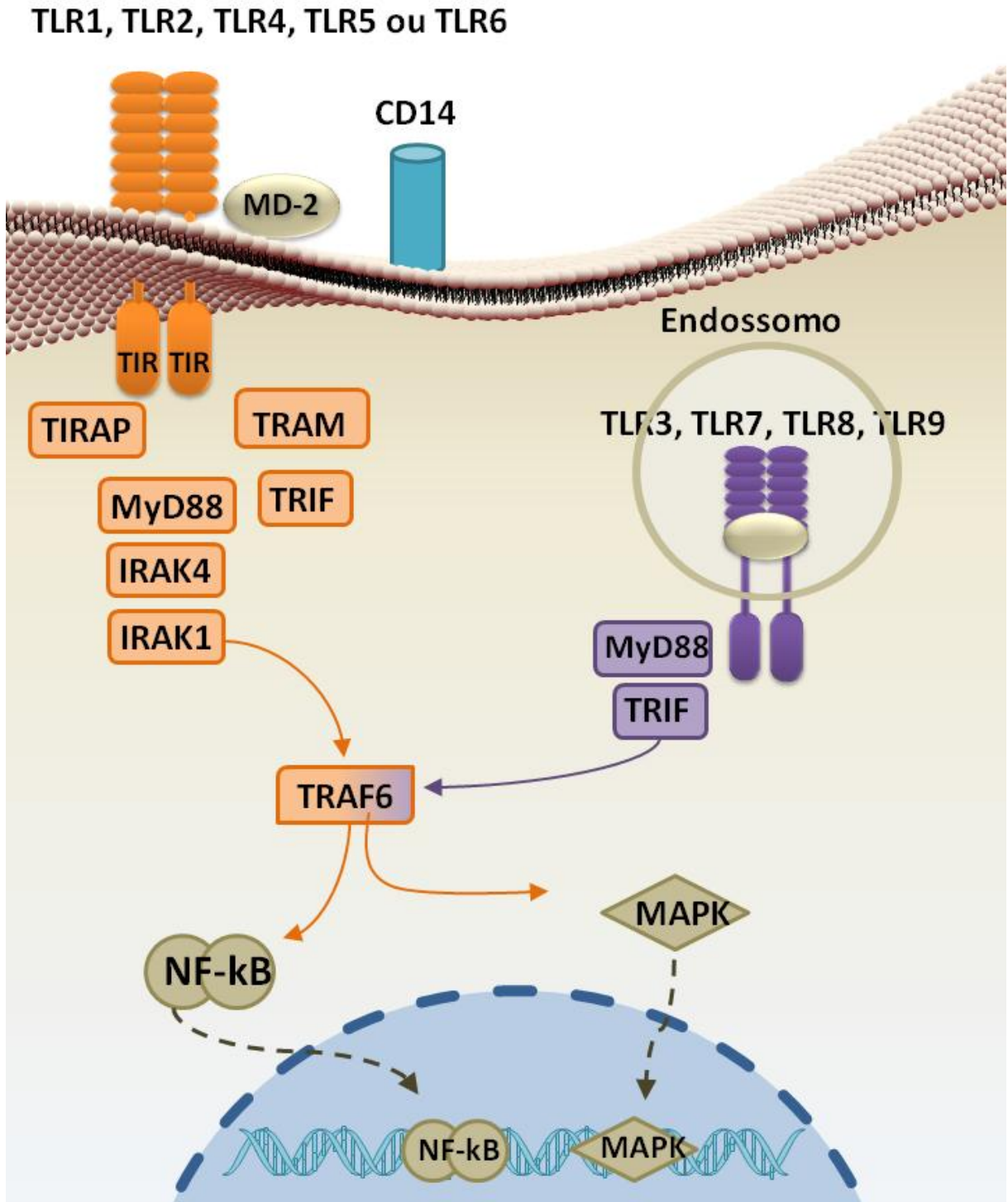
### ***Receptores do tipo Toll (Toll-Like Receptors)***

Os receptores do tipo *Toll* pertencem a uma família de receptores conservados evolutivamente, expressos em diversas células do organismo e que atuam reconhecendo diretamente danos teciduais e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) derivados de vírus, bactérias, fungos e protozoários (Kawai e Akira, 2007). Estes componentes patogênicos incluem o LPS de bactéria gram-negativa (ligante de TLR4), peptidoglicanos de bactérias gram-positivas (ligante de TLR2), flagelina de bactérias (ligante de TLR5), nucleotídeos de DNA não metilados (CpG DNA, ligante de TLR9), RNA viral de fita simples (ligante de TLR7), RNA viral fita-dupla (ligante de TLR3) (Kumar et al., 2009), entre outros.

Em mamíferos, 13 membros de receptores da família TLR foram identificados (Beutler, 2009; Kumar et al., 2009). Sabe-se ainda que estes receptores são expressos em compartimentos celulares distintos: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, e TLR6 são expressos na membrana celular, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em vesículas intracelulares que

podem estar localizadas em endossomos ou no retículo endoplasmático (Saitoh e Miyake, 2009). Esta família de receptores pode formar homo- ou heterodímeros entre si, sendo os mais comumente encontrados: TLR1/TLR2, TLR2/TLR6 e TLR6/TLR6 (Beutler, 2009).

Os TLRs já foram descritos em diversas células do organismo, incluindo as do sistema nervoso central (Zhang e Schleusener, 2006; Aravalli et al., 2007; Carpentier et al., 2008; Marsh e Stenzel-Poore, 2008). Cada vez mais são atribuídas funções para estes receptores no SNC, como seu efeito modulatório do quadro fisiopatológico de doenças neurodegenerativas (Fassbender et al., 2003) ou como alvos terapêuticos na modulação da regeneração neuronal após acidente vascular cerebral (Marsh e Stenzel-Poore, 2008; Marsh et al., 2009). É interessante notar, que os TLRs dividem mecanismos semelhantes no reconhecimento de patógenos, mas podem recrutar vias intracelulares diferentes (Guan et al., 2010). Atualmente, são conhecidas cinco proteínas adaptadoras citoplasmáticas que apresentam domínio para interagir com estes receptores (Figura 4): MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (do inglês, *TIR domain-containing adaptor protein*, também conhecida como Mal, ou *MyD88-adaptor-like*), TRIF (do inglês, *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ), TRAM (do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*) e SARM (do inglês, *Sterile a and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*). Comparado aos outros receptores da família *toll-like*, o TLR4 é o único que utiliza todas estas proteínas adaptadoras (revisto por O'Neill e Bowie, 2007; revisto por Lu et al., 2008).



**Figura 4: Sinalização via TLRs:** O reconhecimento de ligantes dos TLRs pode envolver proteínas de membrana: CD14 atua como proteína de trânsito do LPS ao receptor TLR4. A participação da proteína MD-2 também pode regular a afinidade ligante-receptor. A ativação da cascata de sinalização intracelular envolve inicialmente o recrutamento de proteínas adaptadoras que interagem com o domínio citoplasmático TIR dos TLRs. A via do fator de transcrição NF-κB

pode ser ativada via adaptadores da via MyD88 ou TRIF. A expressão de TLRs também pode ocorrer em endossomos, como TLR3, TLR7, TLR8 ou TLR9 (Baseado em Kawai e Akira, 2007; Lu et al., 2008; McGettrick e O'Neill, 2010).

Evidências recentes sugerem que diferentes dímeros de NF- $\kappa$ B podem ser ativados via diferentes ligantes de receptores do tipo *Toll*. Por exemplo, a indução da subunidade RelB pela ativação de heterodímeros TLR1/TLR2 (Su et al., 2009), ou a ativação de c-Rel pelos receptores TLR2/TLR6 na forma de heterodímeros ou TLR3 e TLR9 sob a forma de monômeros (Carmody et al., 2007). Nos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado que diferentes doenças são desencadeadas e mantidas por ligantes endógenos destes receptores. Tenho a oportunidade de introduzir o modelo de obesidade, doença que cursa com alterações no estado metabólico e com presença de um estado inflamatório de baixa intensidade (Xu et al., 2003, Elks e Francis, 2010). Na obesidade, ácidos graxos livres, fetuína A e citocinas circulantes atuam como DAMPs, ativando quinases responsáveis pela translocação nuclear de NF- $\kappa$ B (Pal et al., 2012). Os ácidos graxos livres induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em diversos tecidos via receptores TLRs, de forma semelhante ao LPS derivado de bactérias gram-negativas (Shi et al., 2006; Kim, 2006; Kim et al., 2007; Fessler et al., 2009; Schaeffler et al., 2009). A deleção do TLR4 reduz o quadro inflamatório, restaura a resistência a leptina e insulina observada na obesidade, e melhora o quadro fisiopatológico (Milanski et al., 2009). Somado a isso, camundongos *knockout* para TLR4 são protegidos da resistência a insulina induzida por dieta hipercalórica (Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007). Na

obesidade, já foi observado que a síntese e secreção rítmica de melatonina está inibida (Ostrowska et al., 1996, 2001; Cano et al., 2008) e que a migração de células imunocompetentes para tecidos alvo cursa em paralelo à progressão da obesidade (revisto por Harford et al., 2011). Nesta tese, realizamos experimentos para avaliar se mediadores inflamatórios produzidos em modelo de obesidade também ativam o eixo imune-pineal. Dessa forma, o uso dos conhecimentos gerados a partir de estudos de como a glândula pineal é modulada por patógenos poderá ser relevante para um melhor entendimento e controle da obesidade, problema que tem sido tratado como epidêmico em diversos países, inclusive no Brasil.

### ***Considerações finais***

Nesta tese, realizamos experimentos para ampliar o entendimento de **como** a glândula pineal percebe e regula a produção rítmica de melatonina em condições de hígidez ou inflamatórias. O fato do NF- $\kappa$ B apresentar ritmicidade endógena na pineal de ratos, aliado ao conceito da comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e esta glândula, levaram-nos à formulação da hipótese de que um programa transcricional equiparia a glândula para a percepção de variações no estado de hígidez do organismo. Numa primeira etapa caracterizamos a expressão circadiana da via de transdução dos TLRs/NF- $\kappa$ B na pineal de ratos. Considerando a expressão rítmica dos genes avaliados e o antagonismo mútuo existente entre GR e NF- $\kappa$ B (McKay e Cidlowski, 1998, 2000; Widén et al., 2003), numa segunda etapa avaliamos o papel do ritmo de glicocorticóides endógenos sobre a

transcrição gênica e a síntese de melatonina em condições fisiológicas. Uma vez que a síntese de melatonina pode ser regulada por diferentes mediadores inflamatórios, utilizamos Pam3CSK4 ou zimosan para ampliar o entendimento da variedade de patógenos que poderiam ser reconhecidos pela pineal. Além disso, estudamos se a ativação de diferentes receptores do tipo *Toll* induz a translocação nuclear de subunidades de NF- $\kappa$ B ainda não observadas. Por fim, consideramos o modelo de inflamação sistêmica induzida por dieta hipercalórica para avaliar se a produção de melatonina é regulada por nestas condições, cogitando que a redução da síntese de melatonina na obesidade ocorra devido uma ação direta de mediadores inflamatórios circulantes sobre a glândula pineal.

# Objetivos

## II. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente tese foi caracterizar vias de transdução dos receptores do tipo *toll* em glândulas pineais de rato em condições de hígidez ou quando estes receptores são ativados por mediadores inflamatórios. A estratégia envolveu os seguintes passos:

1. Determinação da expressão de 84 genes relacionados à sinalização via TLRs e NF- $\kappa$ B e validação de algumas proteínas presentes na glândula pineal.
2. Avaliação da modulação da expressão destes 84 genes acima referidos e da produção noturna de melatonina pelo receptor de glicocorticóide (GR).
3. Caracterização do padrão de translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e da produção de melatonina em glândulas pineais de rato incubadas com Pam3CKS4 (agonista TLR1/TLR2) e zimosan (agonista TLR2/TLR6).
4. Caracterização da influência de uma inflamação sistêmica de baixa intensidade induzida por dieta hipercalórica sobre a produção de melatonina *in vivo*;
5. avaliação do efeito de melatonina exógena sobre o ganho de pesos corporal induzido por dieta hipercalórica.



# **Material e Métodos**

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Animais

Nos experimentos apresentados nesta tese foram utilizados ratos machos adultos (8 a 10 semanas de idade) de linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) criados no biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A exceção foram os experimentos de cultura de glândulas pineais em que utilizamos fêmeas pré-púberes (5 a 6 semanas de idade). Em nossa experiência, tanto o conteúdo de melatonina induzido por noradrenalina, quanto o conteúdo de TNF induzido por LPS não são diferentes quando se comparado animais machos adultos ou fêmeas pré-púberes (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, mantidos em sala com temperatura e umidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. O ciclo claro/escuro empregado foi o de 12/12 h (luzes acesas às 07h00 e apagadas às 19h00), sendo o horário de acender das luzes considerado como *Zeitgeber Time zero* (ZT 0).

Para a obtenção das glândulas pineais, os animais foram eutanasiados por decapitação. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa com animais, cujo protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências (protocolo 115/2010, anexo 1) e realizados de acordo com as normas regulatórias do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## 2. Drogas e Reagentes

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

- Calbiochem (Darmstadt, Alemanha): NP-40;
- GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Reino Unido): coluna microspin Sefadex G-25.
- Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): penicilina; estreptomicina; glutamina;
- Invitrogen Life Technology (USA): ditioneitol (DTT); fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluoróforo FITC; T4 polinucleotídeo quinase.
- Merck (Brasil): acetato de sódio; ácido cítrico; ácido clorídrico; ácido perclórico; álcool etílico; EDTA (do inglês, *ethylenediaminetetracetic acid disodium salt*); metanol; metabisulfito de sódio;
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Califórnia, EUA): anticorpos para as proteínas da via NF- $\kappa$ B para *super-shift* p-50 (sc-114X); RelA (sc-109X); p52 (sc-298X); c-Rel (sc-70X); RelB (sc-226X); BCL-3 (sc-185X).
- Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA): 5-hidroxitriptamina; N-acetilserotonina; melatonina; noradrenalina [(-) *arterenol hydrochloride*]; HEPES; meio de cultura BGJb; bisacrilamida (N, N'-methylenebisacrylamide); mifepristona.
- Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy Tides Adenosine 5'-triphosphate, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P].

- Promega (Madison, MA, EUA): Oligonucleotídeo consenso para NF- $\kappa$ B (5'-AGTTG AGGGGACTTTCCCAGGC-3');

### **3. Preparo de Drogas**

Os padrões de N-Acetilserotonina e melatonina para cromatografia foram preparados em solução estoque na concentração de 1 mM em 0,1M de ácido clorídrico acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% EDTA dissódico. Os estoques permaneceram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso e por período inferior a 60 dias. No momento do uso, os padrões foram diluídos em ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA dissódico.

As soluções estoque de noradrenalina foram preparadas em ácido clorídrico 0,01 M, diluídas no momento do uso em solução aquosa de ácido ascórbico (50 mg/L).

Zimosan e Pam3CSK4 foram preparados na concentração de 1 mg/mL em solução aquosa. Os estoques permaneceram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso e por período inferior a 60 dias. No momento do uso, as drogas foram diluídas em meio de cultura BGJb.

Mifepristona foi preparada no momento do uso e diluída em veículo que consistiu em solução salina isotônica acrescida de 2 mg de carboximetilcelulose, tween 20 (20% v/v) e etanol 5% (Cavalcanti et al., 2007).

As demais drogas listadas anteriormente foram, quando necessário, diluídas em água deionizada purificada por sistema Milli-Q (Millipore®, Billerica, MA, EUA).

#### **4. Cultura primária de pinealócitos**

A cultura de pinealócitos foi realizada conforme método proposto por Ferreira et al., (2003). Após a obtenção, as pineais foram cortadas em pequenas partes e seguiu-se dissociação enzimática com tripsina (0,25%, 37° C, 15 min), seguida por dispersão mecânica realizada na presença de 0,3% de inibidor de tripsina em solução contendo (mmol/L): NaCl 120, KCl 5, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, glicose 12 e 0,1% w/v albumina bovina. Após centrifugação (1000 g, 15 min) as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%, inativado por calor), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). A viabilidade celular e o número total de células foram estimados pela exclusão por azul de Trypan. A taxa de sobrevivência celular em cada procedimento foi 95% ou maior. Lâminas de 8 poços (Lab-Tek *chamber slide*, Nalge Nunc International, Nova York, EUA) foram tratadas com poli-L-lisina por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBS as células foram plaqueadas (0,5 x 10<sup>5</sup>/poço) e mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 18 h. Finalizada esta etapa, as células foram processadas para ensaio de imunocitoquímica.

#### **5. Cultura de glândulas pineais**

As pineais foram cultivadas de acordo com método proposto por Parfitt et al., (1976) e modificado por Ferreira et al., (1994). Detalhadamente, glândulas pineais de rato recém retiradas foram cultivadas em placas de 24 poços, sendo 1 glândula por poço em 200 µL de meio de cultura BGJb (pH 7,4), acrescido de glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas em estufa com temperatura a 37° C em atmosfera

com saturação de carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). O tratamento foi empregado após 48 h de cultivo. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 24 h e, no momento anterior ao tratamento com as drogas testadas.

## **6. Tratamentos *in vitro***

Os procedimentos foram realizados sempre após a última troca do meio de cultura, aguardando-se um período de pelo menos 30 minutos para estabilização da cultura. O tratamento com Pam3CSK4 ou zimosan foi realizado com a diluição da droga em meio de cultura BGJb e a incubação foi realizada nos períodos de tempo descritos em cada figura apresentada a seguir.

Para avaliar a via de síntese de melatonina, a enzima AA-NAT foi ativada com noradrenalina (10 nM) por 5 h após o tratamento com Pam3CSK4 ou zimosan. Ao final dos tratamentos, glândulas e meios de cultivo foram estocados a -80°C e -20°C, respectivamente, por no máximo 30 dias ou até a análise.

## **7. Tratamentos *in vivo***

### ***Bloqueio do receptor de glicocorticóides (GR) por mifepristona***

Para avaliar o papel do receptor GR sobre a transcrição gênica ou o conteúdo circulante de melatonina utilizamos mifepristona na dose de 10 mg/kg, injetada por via intraperitoneal 18 horas e 1 hora antes do pico de

corticosterona anterior a eutanásia dos animais. O grupo controle recebeu duas injeções (nos mesmos horários) do veículo de mifepristona.

### ***Indução de ganho de peso por dieta hipercalórica***

Para avaliar os efeitos da dieta hipercalórica sobre a síntese de melatonina mantivemos os animais alojados individualmente em gaiolas de polipropileno, em sala com temperatura e umidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. Este experimento foi realizado durante sete dias consecutivos. Nestas condições, os animais receberam dieta padrão normocalórica (*chow*) contendo 3,5% de Kcal provenientes de lipídeos (Nuvilab® - CR-1) ou dieta hipercalórica (HFD, *High-Fat Diet*) contendo 42% de Kcal provenientes de lipídeos (Rhooster®, Araçoiaba da Serra, SP). O peso corporal foi determinado por balança digital diariamente.

### ***Tratamento dos animais com melatonina***

Para avaliar os efeitos da melatonina sobre o ganho de peso corporal induzido por dieta hipercalórica (HFD), um segundo grupo de animais foi alojado individualmente em gaiolas de polipropileno, em sala com temperatura e umidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. Nestas condições, os animais foram divididos em quatro grupos:

- i) dieta normocalórica recebendo melatonina na água de beber noturna;
- ii) dieta normocalórica recebendo veículo na água de beber noturna;

- iii) dieta hipercalórica recebendo melatonina na água de beber noturna;
- iv) dieta hipercalórica recebendo veículo na água de beber noturna.

A melatonina foi administrada na dose de 45 µg/L e diluída em veículo (concentração final de 0,05% de etanol em água). Esta solução foi preparada e repostada diariamente. Para o tratamento dos animais, todos os bebedouros (grupos veículo ou melatonina) foram envoltos em papel alumínio para evitar a degradação da melatonina devido a exposição à luz. Os bebedouros foram ofertados aos animais apenas durante a fase de escuro. Na fase de claro os bebedouros foram substituídos por novos bebedouros contendo apenas água. A pesagem dos animais foi realizada diariamente, sempre antes do tratamento dos animais com a melatonina.

### ***8. Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal***

Para avaliar a expressão de 14 proteínas da via de sinalização dos receptores TLRs e NF-κB em pinealócitos, utilizamos ensaios de imunocitoquímica. Após o cultivo, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% gelado por 10 min e permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS em temperatura ambiente. Foi realizado bloqueio com albumina bovina (fração V) 1% e glicina (0,3 M) por 60 min, com o objetivo de minimizar a ligação do anticorpo a sítios não específicos. Na tabela 1



apresentamos as especificações dos anticorpos utilizados. Estes foram incubados por 18 h a 4°C. Após as incubações com os anticorpos primários, seguiu-se incubação com os anticorpos secundários apropriados: anti-coelho (1:400, Abcam) ou anti-camundongo (1:200, Invitrogen), ambos conjugados ao fluoróforo FITC por 1 h em temperatura ambiente. O núcleo celular foi marcado com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 300 µM, 5 min) a temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos no tampão de bloqueio descrito acima. Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário e incubação apenas com o anticorpo secundário. Nestas condições a marcação celular foi completamente abolida.

**Tabela 1 – Especificações dos anticorpos utilizados**

<b>Antígeno</b>	<b>Fabricante, tipo, espécie em que foi produzido e número de catálogo</b>	<b>Diluição do anticorpo</b>
TLR2	Abcam, Monoclonal produzido em camundongo (CAT: AB9100)	1:50
TLR6	Abcam, Policlonal produzido em coelho (CAT: AB37072)	1:50
NF-kB p65 (RelA)	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-372x)	1:100
NF-kB RelB	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-226x)	1:200
NF-kB c-Rel	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-70x)	1:100
NF-kB p52	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-298x)	1:100
NF-kB p100/p52	Abcam, Policlonal produzido em coelho (CAT: AB7972)	1:100
NF-kB p105/p50	Abcam, Policlonal produzido em coelho (CAT: AB7971)	1:100
Bcl3	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-185x)	1:300
IKK1	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-7218)	1:100

IKK2	Abcam, Policlonal produzido em coelho (CAT: AB59195)	1:100
IRAK	Abcam, Policlonal produzido em coelho (CAT: AB238)	1:50
TIRAP	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-28822)	1:50
TRAF6	Merck Milipore, Monoclonal produzido em coelho, (CAT: 04-452)	1:50
TRAF1	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-7186)	1:50
I $\kappa$ B-alpha	Santa Cruz Biotechnology, Policlonal produzido em coelho (CAT: sc-371)	1:100
Caspase 8	Novus Biologicals, Policlonal produzido em coelho (CAT: NBP1-05123)	1:50
MEK7	Abcam, Monoclonal produzido em coelho (CAT: AB52618)	1:50

A marcação imuno-positiva foi observada usando microscópio confocal (Zeiss, Baden-Wurttemberg, Alemanha) com a objetiva de imersão em óleo (40X). Para a excitação do fluoróforo FITC utilizou-se laser argônio no comprimento de onda de 488 nm e filtro de emissão em 505. O laser enterprise (UV) foi utilizado para excitação do marcador DAPI no comprimento de onda de 364 nm e a emissão verificada com filtro de 435-485 nm. Foram obtidas 4 imagens de cada poço selecionadas aleatoriamente contendo pelo menos 10 células viáveis. Este ensaio foi repetido duas vezes com marcações imuno-positivas semelhantes nos dois ensaios.

### ***9. Extração de proteína nuclear***

Para a extração de proteína nuclear, as glândulas pineais obtidas após o cultivo foram homogeneizadas individualmente em 100  $\mu$ L de tampão de lise (HEPES 10 nM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0, glicerol 10%, DTT 1

mM e PMSF 0,1 mM) com auxílio de um homogeneizador e pistilo para tubo plástico de 1,5 mL de volume. Em seguida, foi adicionado 12,5 µL de NP40 (10%) para auxiliar no processo de lise. Após uma breve agitação em vórtex as amostras foram incubadas em gelo por 15 min, centrifugadas (12000 g, 1 min, 4°C) e o sobrenadante, correspondente à fração citoplasmática do extrato, descartado. O *pellet* formado foi então ressuspense em 50 µL de tampão de lise e seguiu-se nova centrifugação (12000 g, 1 min, 4°C). Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspense em tampão de extração nuclear (HEPES 10 mM, KCl 500 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, glicerol 10%, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM). Após incubação por 15 min em gelo sob agitação, as amostras foram centrifugadas (20000 g, 5 min, 4°C) e o sobrenadante contendo o extrato proteico nuclear foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. A quantificação do conteúdo de proteína no extrato foi realizada a 280 nm usando o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

## **10. Ensaio de eletromobilidade por retardo em gel (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Este ensaio foi utilizado para análise do conteúdo nuclear de NF-κB em glândulas pineais e consiste na reação de ligação de proteínas do extrato nuclear com a sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição NF-κB marcada com o radioisótopo <sup>32</sup>P.

Nestes ensaios foram utilizados 6  $\mu\text{g}$  de proteína, obtida por extração nuclear descrita anteriormente. Seguiu-se incubação destas, com tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, poli(dIdC) 1  $\mu\text{g}$  e glicerol 4%) por 20 min em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente com aproximadamente 40000 cpm de sonda de oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NF- $\kappa$ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega, Madison, WI, EUA) marcado com radioisótopo. A marcação da sonda foi realizada previamente pela incubação do oligonucleotídeo consenso para NF- $\kappa$ B com 1  $\mu\text{L}$  de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (atividade específica 3000 Ci/mmol) na presença da enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U). Esta enzima substitui os fósforos do oligonucleotídeo por fósforo radioativo e o que não é incorporado é removido por coluna sefadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida (Tris-HCl 250 mM pH 7,5, glicerol 4%, azul de bromofenol 0,2%). Os complexos proteína-DNA foram analisados em gel de poliacrilamida não-desnaturante, 6% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) por eletroforese (150V, 1h30min) em tampão 0,25 x de Tris-borato/EDTA (TBE). Finalizada a corrida, o gel foi seco a vácuo, exposto ao filme BIOMAX-MS (Kodak, Rochester, NY, EUA) em cassete apropriado por 2 a 4 dias a  $-80^\circ\text{C}$ . Seguiu-se revelação por imersão do filme em solução reveladora por 5 min (Kodak, Rochester, NY, EUA) e em solução fixadora por 10 min (Kodak, Rochester, NY, EUA). As autorradiografias foram escaneadas e quantificadas através do *software* Image J (*download* gratuito em <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

A especificidade da sonda para NF- $\kappa$ B utilizada foi testada em ensaio de competição. A adição de oligonucleotídeo sem marcação com radioisótopo (para NF- $\kappa$ B), competiu com o oligonucleotídeo marcado, favorecendo o desaparecimento de ambos os complexos identificados. Ainda, a adição do oligonucleotídeo não relacionado (AP-1) sem marcação com radioisótopo, não alterou a marcação dos complexos, indicando a especificidade do complexo à sequência de nucleotídeos utilizada (Cecon et al., 2010; Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010; Carvalho-Sousa et al., 2011).

### **11. Ensaio de *super-shift***

A identificação das subunidades de NF- $\kappa$ B nuclear presentes em extratos de glândulas pineais tratadas na presença de Zimosan (1,0  $\mu$ g/mL, 15 min) ou Pam3CSK4 (1,0  $\mu$ g/mL, 15 min) foi realizada através de ensaio EMSA com 6  $\mu$ g de proteína provenientes de um *pool* de 4 extratos nucleares de cada grupo experimental. Este ensaio (*super-shift*) foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente. A diferença foi a inclusão de uma etapa, que consiste na incubação com anticorpos específicos para cada subunidade de NF- $\kappa$ B (2  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ L por amostra, 45 min) antes da incubação com o tampão de ensaio. As demais etapas foram realizadas sem alterações.

## **12. Determinação de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

O conteúdo de melatonina induzido por noradrenalina presente no meio de cultura em que glândulas pineais foram incubadas na ausência (veículo) ou presença de Zimosan (1 µg/mL, 13 h) ou Pam3CSK4 (1 µg/mL, 13 h) e estimuladas com noradrenalina (10 nM) foi determinado por HPLC com detecção eletroquímica. O sistema cromatográfico (Waters, Mildford, MA, EUA) foi operado isocraticamente em temperatura ambiente. A fase móvel para melatonina (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 25%, pH 3,7) fluiu com fluxo de 0,50 mL/min, através da coluna de fase reversa 5-mm Resolve C18 (Waters, Mildford, MA, EUA). O potencial do detector foi ajustado para +0,90 V *versus* eletrodo de referência Ag/AgCl, acoplado a um computador para integração dos dados. Foi injetado 20 µL do meio de cultura ou de padrões diretamente no sistema cromatográfico.

## **13. Determinação do conteúdo circulante de melatonina em modelos *in vivo***

O conteúdo de melatonina no plasma foi determinado por ELISA através de kit comercial (IBL, Hamburgo, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O limite de detecção do kit de melatonina foi de 3,0 a 300 pg/mL.

## 14. *Transcrição Gênica*

Estes experimentos foram realizados em glândulas pineais de ratos eutanasiados ao longo de cinco pontos das fases claro e escuro ambiental: ZT0, ZT6, ZT12 na fase de claro (15 min antes do apagar das luzes), ZT12 na fase de escuro (30 minutos após o apagar das luzes) e no ZT18 (horário de maior conteúdo circulante de melatonina (Fernandes et al., 2009). A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol®, conforme instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). De forma resumida, as glândulas foram homogeneizadas em 100 µL de TRIzol® com auxílio de um homogeneizador e pistilo para tubo plástico de 1,5 mL de volume. Em seguida, o homogenato foi acrescido de 900 µL de TRIzol® e o RNA foi isolado em outro tubo pela adição de clorofórmio e centrifugação (12000 g, 15 min, 4°C). A precipitação do RNA foi realizada por isopropanol seguida de nova centrifugação (12000 g, 15 min, 4°C). Em seguida, o *pellet* de RNA foi lavado por duas vezes com etanol 75% seguido de centrifugação (7500 g, 5 min, 4°C). Após a remoção do etanol a amostra foi solubilizada em água de injeção estéril (Beker, Brasil). A quantificação do RNA foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 de acordo com as instruções do equipamento e, em seguida, a amostra foi tratada com DNase de acordo com as recomendações do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e seguiu-se a realização da síntese de cDNA através do protocolo da Super Script III de acordo com as recomendações do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

A expressão gênica dos componentes da maquinaria de sinalização dos TLRs foi determinada por kit comercial de arranjo de PCR em tempo real “*Rat Toll-Like receptor signaling pathway*” (CAT: PARN-018A, SABioscience, Frederick, MD, EUA) seguindo as instruções do fabricante no equipamento iCycler 5 (BioRad). Os estudos com estes arranjos de PCR em tempo real foram realizados com 3 *pools* por ponto analisado. Cada *pool* continha 3 amostras de cDNA diferentes e, portanto, foram utilizadas 9 glândulas pineais para cada ZT examinado. Em cada placa de PCR fornecido no arranjo havia 84 poços referentes a 84 genes relevantes na sinalização dos TLRs, cinco genes de referência (*housekeeping* genes: *Rplp1*, *Rpl13a*, *Hprt1*, *Ldha* e *Actb*), e controles em cada placa para a determinação de contaminação com DNA genômico, qualidade de RNA e desempenho da corrida de qPCR em cada ensaio. Neste ponto é importante ressaltar que esta ferramenta se mostrou efetiva em análises que realizamos para determinar a reprodutibilidade entre placas utilizando um mesmo *pool* de cDNAs. Além disso, os resultados foram aprovados pelos controles providos em cada ensaio. Quando observado que alguma corrida não foi aprovada nos controles do kit, novo ensaio foi realizado utilizando-se outras amostras.

Para a análise dos resultados da expressão circadiana dos genes contidos neste arranjo de PCR, optamos pela utilização do *software GeNorm*, desenvolvido como um “*add-in*” para o Microsoft Excel, que permite determinar o gene de referência mais estável em um painel de genes de referência provenientes no kit. Este software calcula o melhor gene de referência baseado na média geométrica das expressões (Vandesompele et al., 2002). Apesar de todos os genes de referência terem apresentado uma



boa estabilidade, optamos por normalizar os dados pelo *housekeeping gene Rpl13*, que foi o que não apresentou variação neste bloco experimental. Para realizar o cálculo que permitisse a comparação entre os horários avaliados utilizamos o método da razão de expressão relativa (<http://relative.gene-quantification.info>) que analisa a razão entre a expressão dos genes de interesse em cada ZT em relação ao gene de referência. A análise estatística dos dados foi feita por análise de variância de uma via seguida de teste Newman-Keuls comparando os diferentes grupos. Quando a variabilidade de um dos grupos impedia detectar diferenças por esta análise, normalizamos os dados pelo método *Delta-Delta CT*, utilizando o tempo em que havia a maior expressão gênica como grupo controle. Em seguida, cada grupo teve sua expressão normalizada com relação a este grupo (*fold-change*), eliminando da análise o ponto de grande variabilidade. Nos experimentos em que avaliamos os efeitos de mifepristona sobre a expressão gênica normalizamos os dados pelo método *Delta-Delta CT*, utilizando o grupo que recebeu veículo como grupo controle. Nestas condições utilizamos o gene *housekeeping Rpl13* para a normalização da expressão gênica. Na tabela 2, apresentamos a lista de gene examinados, bem como o número de acesso no *GenBank*.

**Tabela 2: Genes examinados no arranjo de qPCR “Rat Toll-Like receptor signaling pathway”**

GenBank	Símbolo	Nome do Gene	Aliases
NM_001007798	<i>Btk</i>	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	-
NM_022277	<i>Casp8</i>	Caspase 8	-
NM_031530	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	MCP-1, Scya2, Sigle
NM_021744	<i>Cd14</i>	CD14 molecule	-
NM_012926	<i>Cd80</i>	Cd80 molecule	B7-1

<b>NM_020081</b>	<i>Cd86</i>	CD86 molecule	B7-2
<b>NM_024125</b>	<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Il6dbp, LAP, NF-IL6, TCF5
<b>NM_001107588</b>	<i>Chuk</i>	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	-
<b>NM_001005897</b>	<i>Clec4e</i>	C-type lectin domain family 4, member e	Clecsf9, Mincle
<b>NM_053852.1</b>	<i>Csf2</i>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Gm-csf, Gmcsf
<b>NM_017104</b>	<i>Csf3</i>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	-
<b>NM_139089</b>	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	IP-10, Scyb10
<b>NM_152937</b>	<i>Fadd</i>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Mort1
<b>NM_022197</b>	<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	c-fos
<b>NM_012963</b>	<i>Hmgb1</i>	High mobility group box 1	Ac2-008, Hmg1, MGC93598, MGC93599
<b>NM_001098241</b>	<i>Hras</i>	Harvey rat sarcoma virus oncogene	HRAS1, c-H-ras
<b>NM_031971</b>	<i>Hspa1a</i>	Heat shock 70kD protein 1A	HSP72, Hsp70-1, Hspa1, Hspa1b
<b>NM_022229</b>	<i>Hspd1</i>	Heat shock protein 1 (chaperonin)	Hsp60, Hspd1-30p
<b>NM_001014786</b>	<i>Ifna1</i>	Interferon-alpha 1	IFN-alpha1
<b>NM_019127</b>	<i>Ifnb1</i>	Interferon beta 1, fibroblast	Ifnb
<b>NM_138880</b>	<i>Ifng</i>	Interferon gamma	IFNG2
<b>NM_053355</b>	<i>Ikbkb</i>	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	AIM-1, IKK2
<b>NM_012854</b>	<i>Il10</i>	Interleukin 10	IL10X
<b>NM_053390</b>	<i>Il12a</i>	Interleukin 12a	-
<b>NM_017019</b>	<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha	IL-1 alpha
<b>NM_031512</b>	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	-
<b>NM_013123</b>	<i>Il1r1</i>	Interleukin 1 receptor, type I	-
<b>NM_053836</b>	<i>Il2</i>	Interleukin 2	-
<b>NM_012589</b>	<i>Il6</i>	Interleukin 6	IL6g, Ifnb2
<b>NM_017020</b>	<i>Il6r</i>	Interleukin 6 receptor	IL6R1, Il6ra
<b>NM_001127555</b>	<i>Irak1</i>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	RGD1563841
<b>NM_001025422</b>	<i>Irak2</i>	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-
<b>NM_012591</b>	<i>Irf1</i>	Interferon regulatory factor 1	-
<b>NM_001006969</b>	<i>Irf3</i>	Interferon regulatory factor 3	MGC94729
<b>NM_021835</b>	<i>Jun</i>	Jun proto-oncogene	-
<b>NM_145095</b>	<i>Kcnh8</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8	ELK3, Elk1, Ets-1
<b>NM_001106786</b>	<i>Tbk1</i>	TANK-binding kinase 1	-
<b>NM_001097582</b>	<i>Tlr7</i>	Toll-like receptor 7	RGD1563357
<b>NM_080769</b>	<i>Lta</i>	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	Tnfb
<b>NM_001106405</b>	<i>Cd180</i>	CD180 molecule	Ly78
<b>NM_001024279</b>	<i>Ly96</i>	Lymphocyte antigen 96	MD-2
<b>NM_012798</b>	<i>Mal</i>	Mal, T-cell differentiation protein	MALGENE
<b>NM_001100674</b>	<i>Map2k3</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 3	-
<b>NM_001030023</b>	<i>Map2k4</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 4	MKK4
<b>NM_053887</b>	<i>Map3k1</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 1	Mekk1
<b>NM_001107920</b>	<i>Map3k7</i>	Mitogen activated protein kinase kinase 7	Tak1
<b>NM_001106904.1</b>	<i>Map4k4</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	-
<b>NM_053829.1</b>	<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK
<b>NM_001100673</b>	<i>Mapk8ip3</i>	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	JIP3, JSAP1
<b>NM_017322</b>	<i>Mapk9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9	SAPK
<b>NM_198130</b>	<i>Myd88</i>	Myeloid differentiation primary response gene 88	-
<b>NM_001276711.1</b>	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NF-kB
<b>NM_001105720</b>	<i>Nfkbia</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	RL, IF-1
<b>NM_030867</b>	<i>Nfkbib</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	MGC93398

<b>NM_212509</b>	<i>Nfkbil1</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	-
<b>NM_001108133</b>	<i>Nfrkb</i>	Nuclear factor related to kappa B binding protein	-
<b>NM_017323</b>	<i>Nr2c2</i>	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Tr4
<b>NM_001100565</b>	<i>Peli1</i>	Pellino 1	-
<b>NM_053373</b>	<i>Pglyrp1</i>	Peptidoglycan recognition protein 1	Pglyrp, Pgrp
<b>NM_013196</b>	<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	PPAR
<b>NM_019335</b>	<i>Eif2ak2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	Pkr, Prkr
<b>NM_017232</b>	<i>Ptgs2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX-2, Cox2
<b>XM_223688</b>	<i>Rel</i>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	-
<b>NM_199267</b>	<i>Rela</i>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	NFkB
<b>NM_001008349</b>	<i>Nfkb2</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	MGC93816, RGD1307189
<b>NM_001191865.1</b>	<i>Ripk2</i>	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	-
<b>NM_053588</b>	<i>Rnf138</i>	Ring finger protein 138	MGC72355, Rsd4, Trif
<b>NM_001105817</b>	<i>Sarm1</i>	Sterile alpha and TIR motif containing 1	-
<b>NM_001108890</b>	<i>Ticam2</i>	Toll-like receptor adaptor molecule 2	-
<b>NM_001172120</b>	<i>Tlr1</i>	Toll-like receptor 1	-
<b>NM_198769</b>	<i>Tlr2</i>	Toll-like receptor 2	-
<b>NM_198791</b>	<i>Tlr3</i>	Toll-like receptor 3	-
<b>NM_019178</b>	<i>Tlr4</i>	Toll-like receptor 4	-
<b>NM_001145828</b>	<i>Tlr5</i>	Toll-like receptor 5	-
<b>NM_207604</b>	<i>Tlr6</i>	Toll-like receptor 6	-
<b>NM_198131</b>	<i>Tlr9</i>	Toll-like receptor 9	-
<b>NM_012675</b>	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	MGC124630, RATTNF, TNF-alpha, Tnfa
<b>NM_013091</b>	<i>Tnfrsf1a</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	MGC105478, Tnfr1
<b>NM_001024771</b>	<i>Tnip2</i>	TNFAIP3 interacting protein 2	-
<b>NM_001109668</b>	<i>Tollip</i>	Toll interacting protein	-
<b>NM_001100480</b>	<i>Tradd</i>	TNFRSF1A-associated via death domain	-
<b>NM_001107754</b>	<i>Traf6</i>	Tnf receptor-associated factor 6	-
<b>NM_053928</b>	<i>Ube2n</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	MGC93937
<b>NM_001110345.2</b>	<i>Ube2v1</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	-
<b>NM_001007604</b>	<i>Rplp1</i>	Ribosomal protein, large, P1	MGC72935
<b>NM_012583</b>	<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Hgprtase, Hprt, MGC112554
<b>NM_173340</b>	<i>Rpl13a</i>	Ribosomal protein L13A	-
<b>NM_017025</b>	<i>Ldha</i>	Lactate dehydrogenase A	Ldh1
<b>NM_031144</b>	<i>Actb</i>	Actin, beta	Actx

## 15. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (e. p. m.). As médias foram obtidas a partir de, no mínimo três amostras em cada grupo experimental. A comparação entre duas médias foi realizada pelo

teste “t” de *student*. A comparação entre mais de duas médias foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de pós-teste *Newman-Keuls*, calculados pelo software *GraphPad Prism* 5.0. As amostras foram consideradas significativamente diferentes quando apresentavam probabilidade de  $P < 0,05$ .

# Resultados

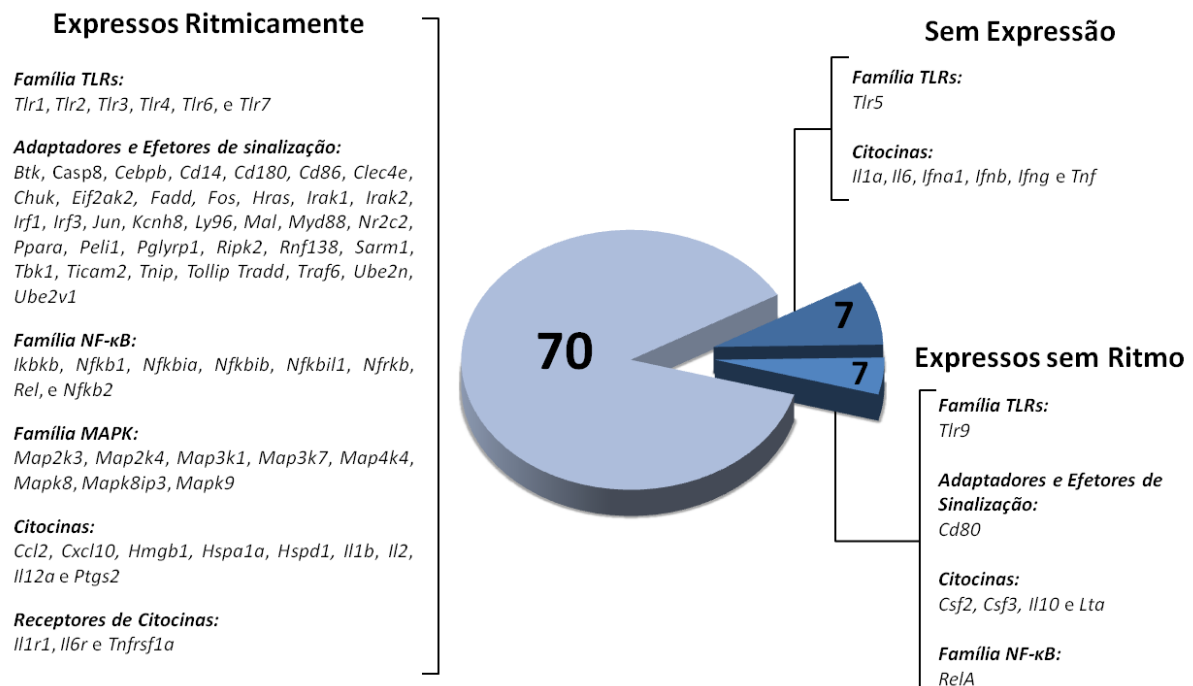
## IV. RESULTADOS

### **1. Caracterização da expressão gênica circadiana de mediadores inflamatórios em glândulas pineais de rato**

A caracterização da expressão circadiana de 84 genes relacionados a via dos receptores TLRs e NF- $\kappa$ B foi avaliada ao longo de cinco pontos nas fases de claro ou escuro: ZT0, ZT6, ZT12 na fase de claro (ZT12C, 15 minutos antes do apagar das luzes), ZT12 na fase de escuro (ZT12E, 30 minutos após o apagar das luzes) e no ZT18 (horário de máximo conteúdo circulante de melatonina). A seguir, apresentamos os 84 genes de interesse analisados neste arranjo de qPCR: 8 genes de receptores da família TLRs (*Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr5*, *Tlr6*, *Tlr7*, *Tlr9*); 38 genes de adaptadores ou efetores que participam da via intracelular de sinalização via TLRs (*Btk*, *Casp8*, *Cebpb*, *Cd14*, *Cd180*, *Cd80*, *Cd86*, *Clec4e*, *Chuk*, *Eif2ak2*, *Fadd*, *Fos*, *Hras*, *Ikkkb*, *Irak1*, *Irak2*, *Irf1*, *Irf3*, *Jun*, *Kcnh8*, *Ly96*, *Mal*, *Myd88*, *Nr2c2*, *Ppara*, *Peli1*, *Pglyrp1*, *Ripk2*, *Rnf138*, *Sarm1*, *Tbk1*, *Ticam2*, *Tnip2*, *Tollip*, *Tradd*, *Traf6*, *Ube2n*, *Ube2v1*), 8 genes de membros da família NF- $\kappa$ B (*Nfkb1*, *Nfkbia*, *Nfkbib*, *Nfkbil1*, *Nfrkb*, *Rel*, *Rela*, e *Nfkb2*), 8 genes de membros família das MAPKs (*Map2k3*, *Map2k4*, *Map3k1*, *Map3k7*, *Map4k4*, *Mapk8*, *Mapk8ip3*, *Mapk9*), 19 genes de citocinas (*Ccl2*, *Csf2*, *Csf3*, *Cxcl10*, *Hmgbl*,

*Hspa1a*, *Hspd1*, *Il1a*, *Il1b*, *Il2*, *Il6*, *Il10*, *Il12a*, *Ifna1*, *Ifnb*, *Ifng*, *Lta*, *Ptgs2* e *Tnf*) e três genes de receptores de citocinas (*Il1r1*, *Il6r* e *Tnfrsf1a*).

Do total dos genes examinados, 7 deles não foram expressos (*Il1a*, *Il6*, *Ifna1*, *Ifnb*, *Ifng*, *Tnf* e *Tlr5*), outros 7 genes foram expressos, mas não apresentaram variação circadiana (*Cd80*, *Csf2*, *Csf3*, *Il10*, *Lta*, *RelA*, e *Tlr9*) enquanto outros 70 genes foram expressos de forma rítmica na glândula pineal de ratos (Figura 5).



**Figura 5:** Diagrama da Expressão gênica constitutiva em glândulas pineais de ratos determinada pelo arranjo de PCR “*Toll-Like receptor signaling pathway*” (SABioscience, Frederick, MD, USA).

### - **Receptores do tipo Toll (TLRs)**

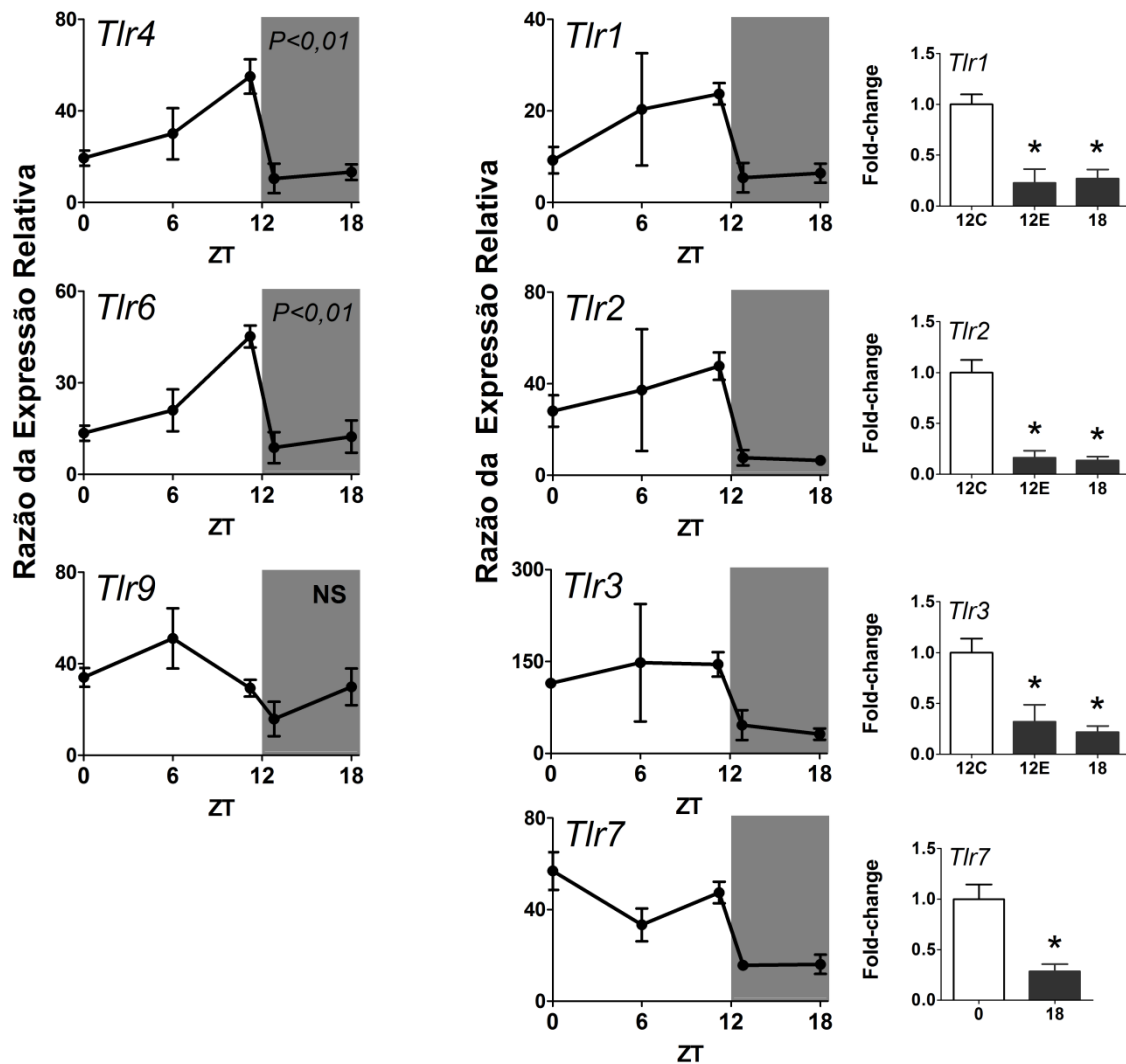
A família de TLRs é conservada evolutivamente e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) derivados de diversos agentes agressores exógenos ao organismo (Kawai e Akira, 2007). Ainda, recentes evidências indicam que estes receptores podem reconhecer também componentes endógenos ao organismo, como proteínas e peptídeos (por exemplo, as *heat shock proteins 60* e *70*, ou a proteína *high-mobility group B1*, HMGB1), ácidos graxos, lipoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e ácidos nucleicos. A lista destes “padrões moleculares associados a sinais de perigo” (DAMPs, do inglês, *Danger-Associated Molecular Patterns*) aumenta a cada dia (revisto por Trotta et al., 2014).

Neste contexto, a observação de que a glândula pineal está **equipada para reconhecer** componentes exógenos e endógenos, possibilita especular sobre a organização do sistema circadiano em diferentes quadros fisiopatológicos, tais como obesidade, doenças neurodegenerativas e auto-imunes. De fato, nossos resultados prévios descrevem a expressão do receptor TLR4 em pinealócitos, microglia e astrócitos da glândula pineal de ratos e os mecanismos que regulam a síntese de melatonina na pineal frente à ativação deste receptor (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012).

A avaliação da expressão de genes codificadores dos receptores do tipo *toll* mostrou que sete de oito genes dessa família são constitutivamente expressos em glândulas pineais. Apenas o receptor TLR5 não apresenta expressão endógena em nossas condições experimentais, e o receptor TLR9 não apresentou um perfil de expressão rítmica ao longo do dia. Em relação



ao padrão de expressão, os genes *Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3*, *Tlr4*, e *Tlr6* apresentam expressão rítmica com aumento gradativo durante a fase de claro e redução rápida na expressão assim que as luzes são apagadas (ZT12E), permanecendo baixos durante toda a fase de escuro (ZT12E e ZT18) (Figura 6).



**Figura 6: Expressão circadiana dos receptores TLRs em glândulas pineais de ratos.** Os experimentos foram realizados com três *pools* por ponto provenientes de três amostras de cDNA em cada *pool*. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa ou da média  $\pm$  E.P.M do *fold-change*. A significância estatística está apresentada no gráfico e foi calculada por Análise de Variância de uma via seguida de pós-teste de Newman-

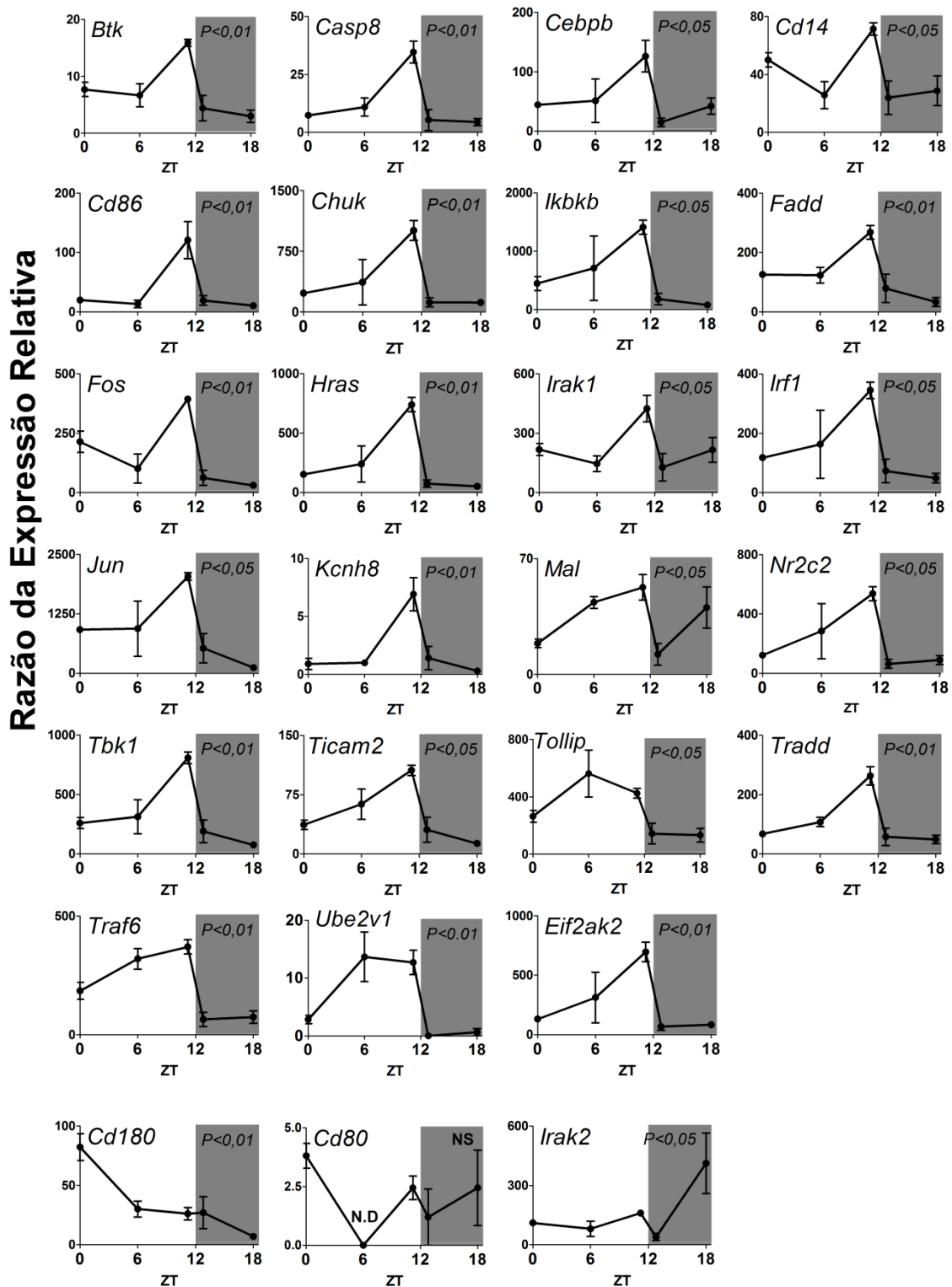
Keuls. \* representa  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (maior expressão).  $N=3$  em cada ponto. O eixo X representa o *Zeitgeber Time*. NS: Não estatisticamente significativo.

#### - ***Adaptadores e Efetores da sinalização via TLRs***

Os receptores TLRs são conhecidos por compartilhar adaptadores e efetores citoplasmáticos. O recrutamento inicial dos efetores para a transdução do sinal induz interações proteína-proteína que podem ativar as cascatas de sinalização dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, MAPKs e outras (revisto por Kawasaki e Kawai, 2014). Dentre os 38 genes dos adaptadores e efetores avaliados, determinamos que 37 desses são expressos de forma rítmica, com algumas diferenças no padrão desta expressão: 35 genes apresentam expressão maior durante a fase de claro comparado a fase de escuro. O gene *Cd180* apresenta maior expressão no início da fase de claro, comparado ao final da fase de claro ou durante toda a fase de escuro. Por outro lado, não observamos ritmo na expressão do gene *Cd80*, apesar da falta de expressão no ZT6. Ainda, o gene *Irak2* foi o único entre os genes efetores que apresentou maior expressão durante a fase de escuro comparado a expressão diurna. Neste ponto é importante ressaltar que os principais genes codificadores de proteínas que interagem com o receptor TLR4 na membrana celular (gene *Cd14* que codifica a proteína CD14 e o gene *Ly96* que codifica a proteína MD-2) possuem padrão de expressão semelhante ao do receptor transmembrana. Quando presentes, estes adaptadores podem aumentar a eficiência na interação do LPS ao TLR4 (Huyton et al., 2007). É interessante observar também que dentre os genes

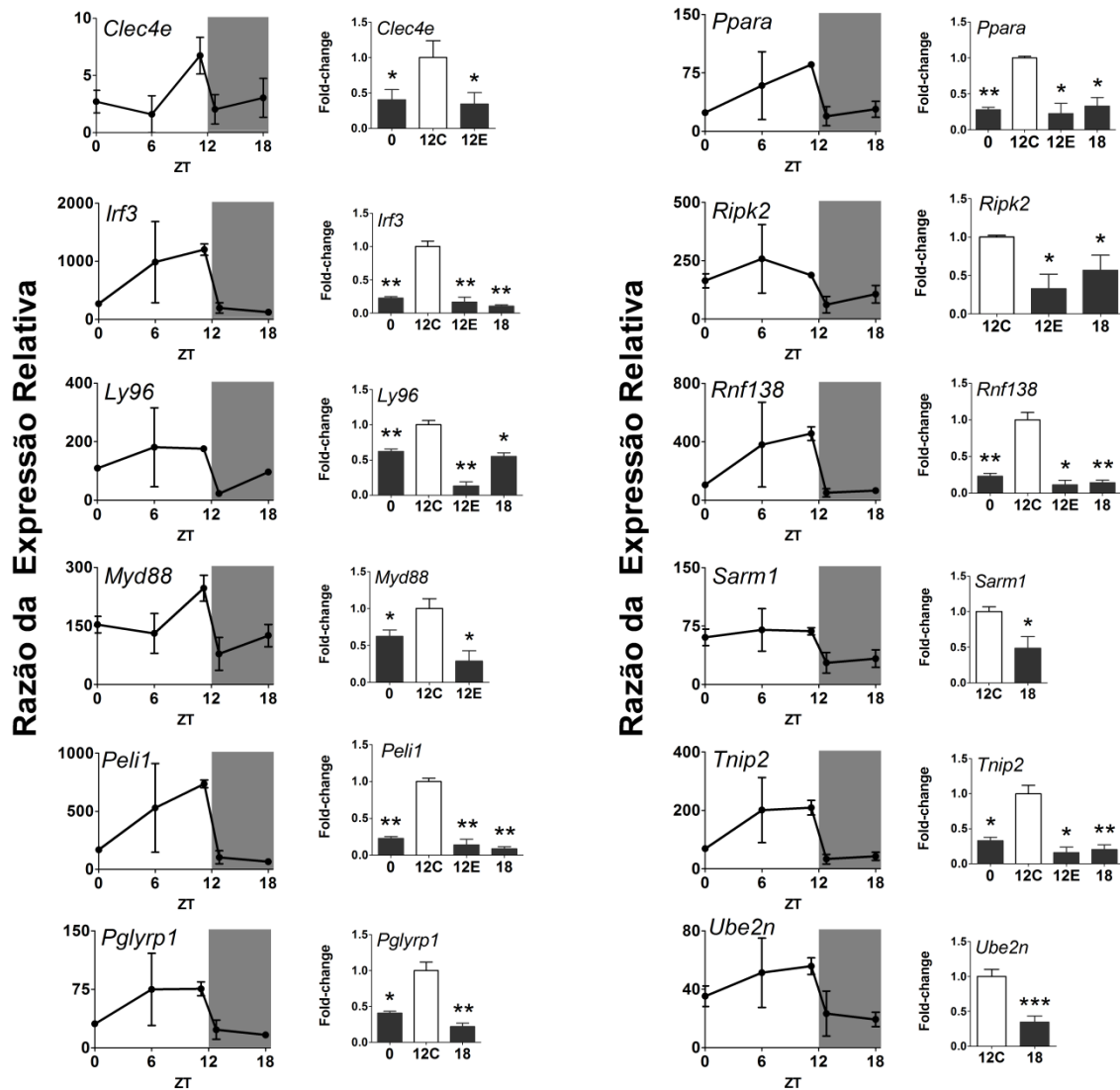
codificadores dos adaptadores imediatos que interagem aos domínios intracelulares dos TLRs, os genes *Myd88*, (que codifica a proteína de mesmo nome), *Mal* (que codifica a proteína TIRAP), *Rnf138* (que codifica a proteína TRIF), e *Ticam2* (que codifica a proteína TRAM) apresentam maior expressão na fase de claro ambiental.

A convergência dos sinais gerados frente à ativação dos TLRs atua sobre as quinases inibitórias *kappa* B (IKK1 ou IKK2, codificados pelos genes *Chuk* ou *Ikkkb*, respectivamente). Também observamos que estes genes apresentam padrão de expressão semelhante aos genes que codificam proteínas que estão *upstream* a via de sinalização (Figuras 7 e 8).



**Figura 7: Expressão circadiana dos adaptadores e efetores da via dos TLRs em glândulas pineais de ratos.** Os experimentos foram realizados com três pools de três amostras de cDNA provenientes de nove pineais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa. A

significância estatística está apresentada no gráfico e foi calculada por Análise de Variância de uma via seguida de pós-teste de Newman-Keuls.



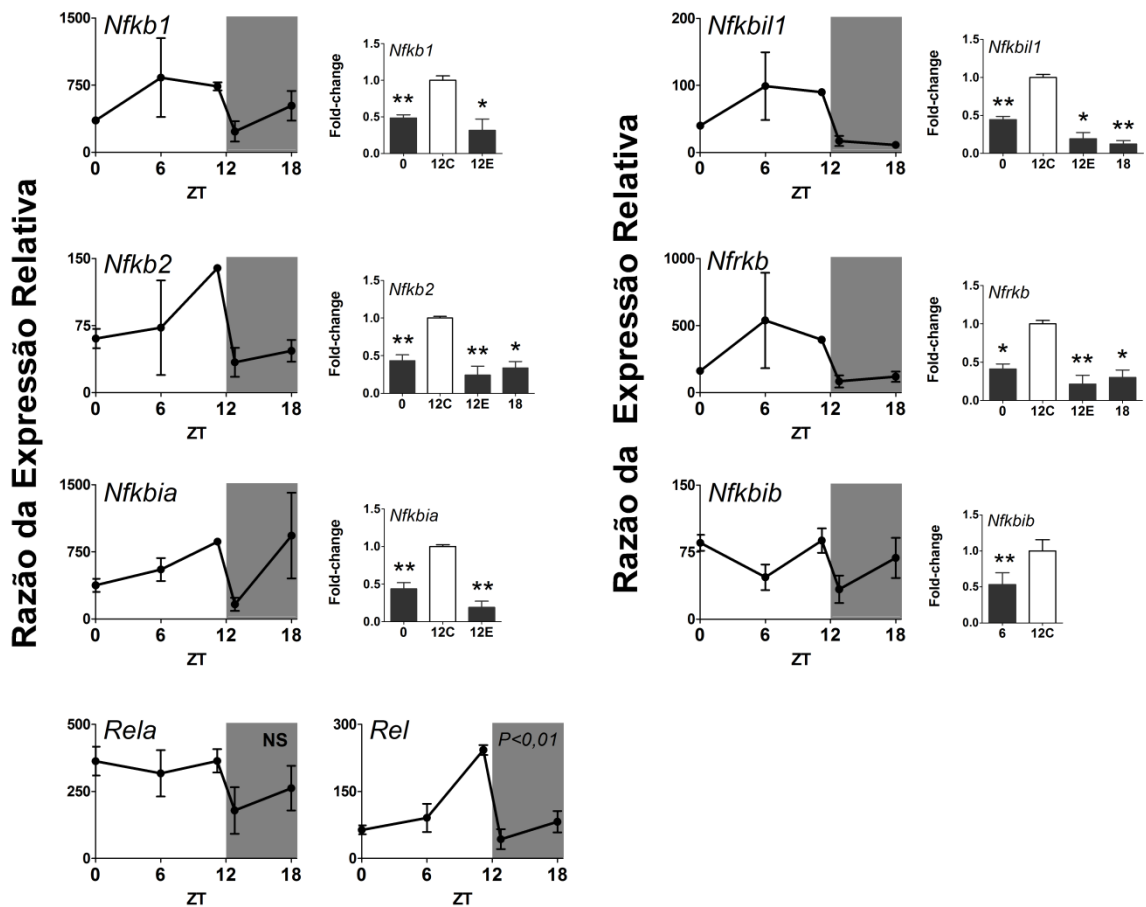
**Figura 8: Expressão circadiana dos adaptadores e efetores da via dos TLRs em glândulas pineais de ratos (continuação).** Os experimentos foram realizados com três *pools* de três amostras de cDNA provenientes de nove pineais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa ou pela média  $\pm$  E.P.M do *fold-change* calculados em relação ao ZT com maior expressão. \* representa  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (maior expressão).

- **Fator de transcrição NF- $\kappa$ B**

Na figura 9, apresentamos os resultados referentes a análise da transcrição de 8 genes da família NF- $\kappa$ B. Com exceção do gene *RelA*, todos os genes desta família apresentam ritmo circadiano (*Nfkb1*, *Nfkb2* e *Rel*). O ritmo na expressão do gene *Nfkb1* (que codifica a subunidade p50) é semelhante ao observado para seu conteúdo proteico em glândulas pineais de rato (Cecon et al., 2010). Esta subunidade é a única que está constitutivamente expressa na glândula pineal em condições de hígidez (Cecon et al., 2010). Em relação à expressão de *RelA* na pineal, sua ativação é conhecida por ocorrer apenas na vigência de estímulo inflamatório (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012; Carvalho-Sousa et al., 2011). Em nossos resultados não observamos ritmo para o gene que codifica esta proteína (*RelA*). Outros genes que codificam proteínas regulatórias desta via como *Nfrkb* e *NFkbil1* também possuem maior expressão na fase de claro.

As I $\kappa$ Bs clássicas (I $\kappa$ B-alfa codificado pelo gene *Nfkbia*, e I $\kappa$ B-beta codificado pelo gene *Nfkbib*) atuam no citoplasma mantendo os dímeros de NF- $\kappa$ B inativos. Por outro lado, as I $\kappa$ Bs podem também regular a desativação desta via, tendo sua transcrição e subsequente tradução aumentadas para que, ao migrarem para o núcleo celular, removam a ligação das subunidades de NF- $\kappa$ B ao DNA (revisto por Hinz e Scheidereit, 2014). Nossos dados demonstram que o ritmo da expressão gênica para estas proteínas é coerente com o observado para as proteínas da família NF- $\kappa$ B. Na transição da fase de claro para o escuro, há uma queda abrupta na expressão gênica de *Nfkbia* e uma subsequente tendência em aumento durante o ZT18. Este gene é o único membro desta família que aumenta na fase de escuro. É possível que a

codificação deste gene em proteína seja um mecanismo adicional para o controle de baixos níveis de p50 na glândula pineal na fase de escuro (Cecon et al., 2010), constituindo uma regulação pós-transcricional da via de ativação do NF- $\kappa$ B.

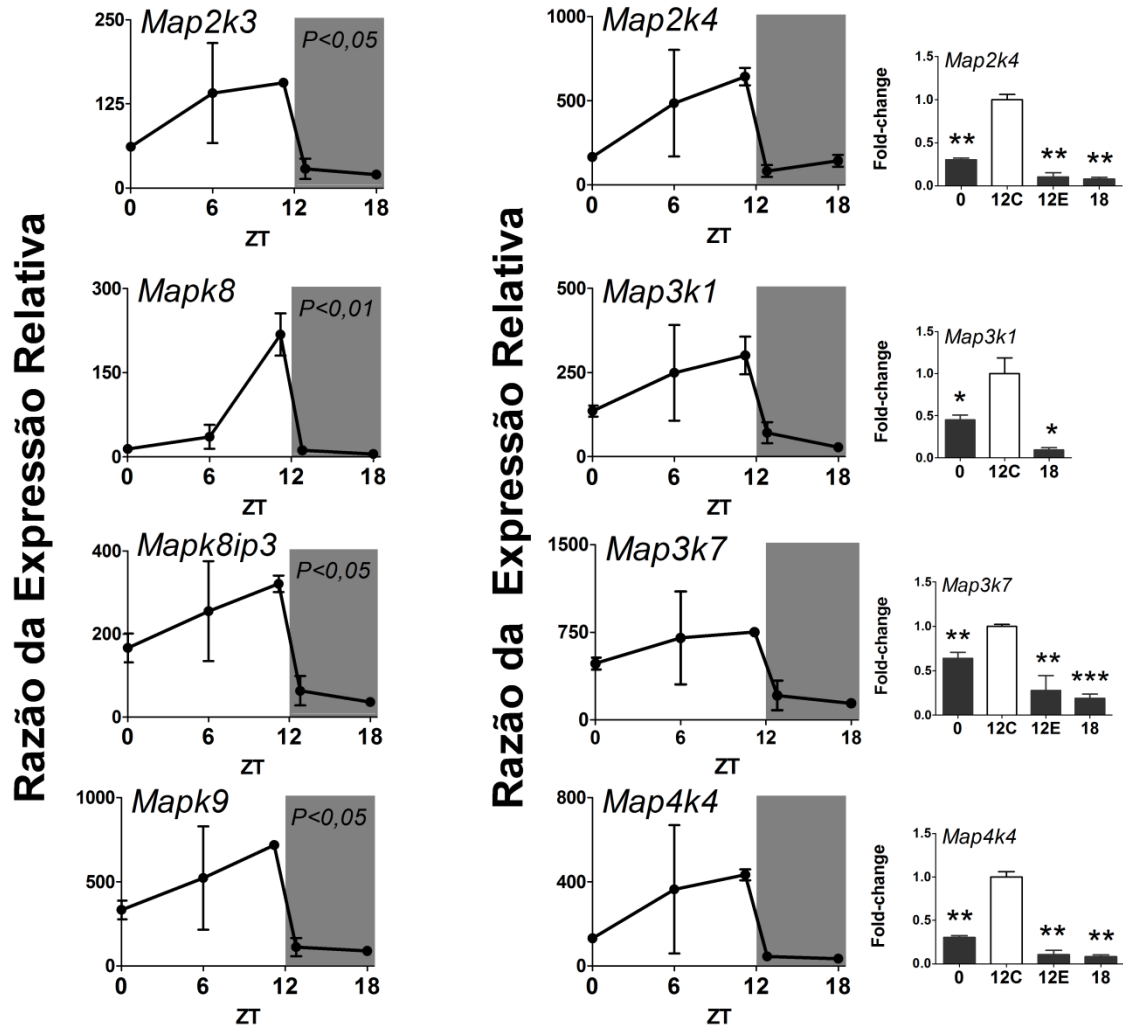


**Figura 9: Expressão circadiana da família NF- $\kappa$ B em glândulas pineais de ratos.** Os experimentos foram realizados com três *pools* de três amostras de cDNA provenientes de nove pineais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa ou pela média  $\pm$  E.P.M do *fold-change* calculados em relação ao ZT com maior expressão. \* representa  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (maior expressão).

- **Família MAPK**

Neste trabalho também apresentamos os resultados relativos a outros fatores de transcrição expressos ritmicamente na glândula pineal. Chama a atenção que os genes que codificam proteínas da família MAPKs também são expressos de forma rítmica. Esta família de proteínas pode atuar em cooperação com a sinalização do NF- $\kappa$ B (Barchowsky et al., 2000; Mikami et al., 2006). Na Figura 10 apresentamos os resultados referentes à expressão dos genes *Map2k3*, *Map2k4*, *Map3k1*, *Map3k7*, *Map4k4*, *Mapk8*, *Mapk8ip3* e *Mapk9*. O padrão de expressão destes genes também apresenta aumento gradativo do conteúdo transcricional durante a fase de claro e rápida redução na expressão após o apagar das luzes.

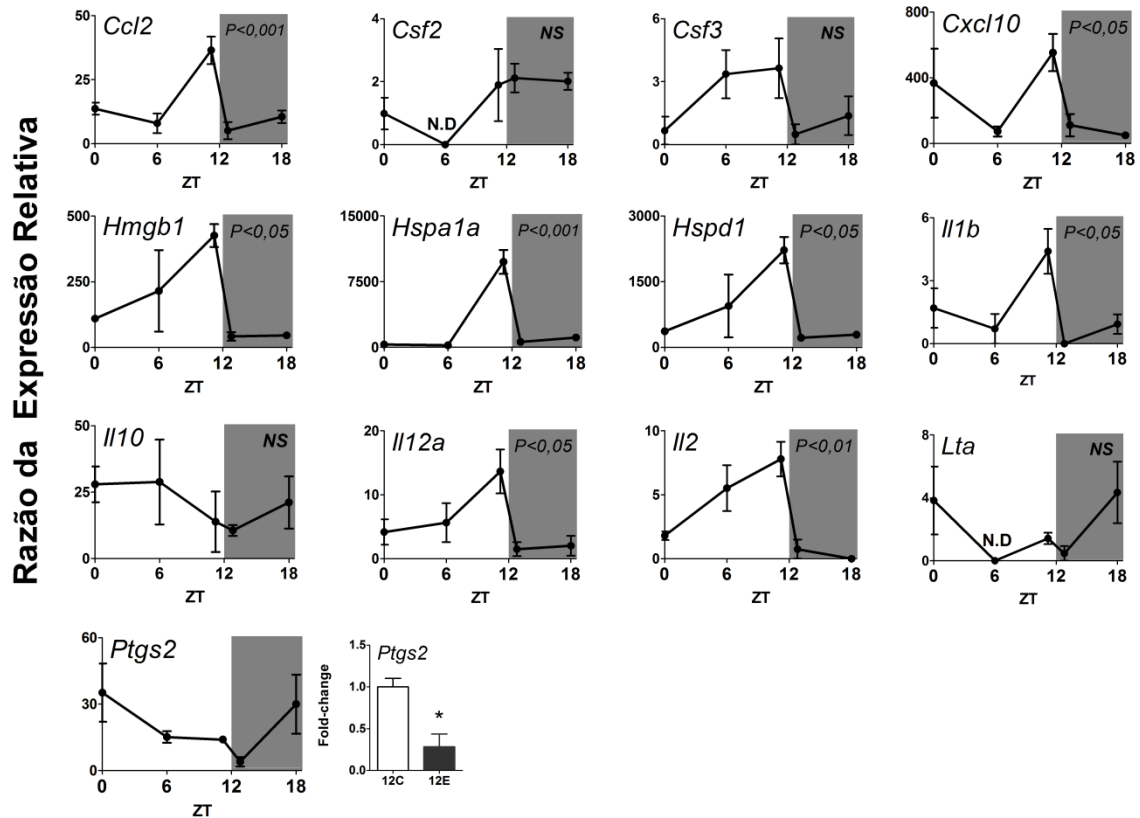




**Figura 10: Expressão circadiana da família MAPK em glândulas pineais de ratos.** Os experimentos foram realizados com três *pools* de três amostras de cDNA provenientes de nove pineais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa ou pela média  $\pm$  E.P.M do *fold-change* calculados em relação ao ZT com maior expressão. \* representa  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (maior expressão).

### - **Citocinas**

Na Figura 11, apresentamos os resultados referentes à expressão constitutiva de genes que codificam citocinas na glândula pineal de ratos. A glândula pineal apresenta baixo conteúdo de expressão relativa para os genes codificadores de citocinas (ao compararmos com os outros genes avaliados). Além disso, não foi observada expressão gênica constitutiva para 6 dos 19 genes de citocinas avaliados em nenhum dos tempos examinados: *Il1a*, *Il6*, *Ifna1*, *Ifnb*, *Ifng* e *Tnf*. Além disso, outros 4 genes foram expressos, mas não apresentaram ritmo circadiano em sua expressão: *Csf2*, *Csf3*, *Il10* e *Lta*. Por outro lado, a glândula pineal expressa ritmicamente os genes *Hmgb1*, *Hspa1a*, *Hspd1* e *Cxcl10*. Chamam a atenção os três primeiros genes, uma vez que codificam proteínas que são ligantes endógenos para os TLRs. Outros genes que apresentaram expressão rítmica foram: *Ccl2*, *Il1b*, *Il12a*, *Il2* e *Ptgs2*. Estes genes também apresentaram maior expressão na fase de claro comparada à fase de escuro.

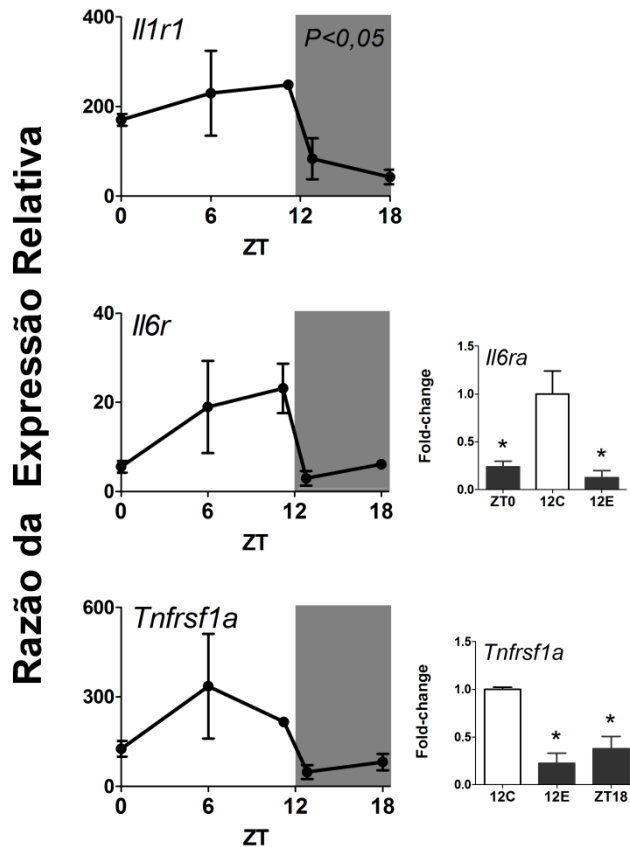


**Figura 11: Expressão circadiana constitutiva de citocinas em glândulas pineais de ratos.** Os experimentos foram realizados com três *pools* de três amostras de cDNA provenientes de nove pineais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa ou pela média  $\pm$  E.P.M do *fold-change* calculados em relação ao ZT com maior expressão. \* representa  $P<0,05$  comparado ao grupo controle (maior expressão).

### - **Receptores de Citocinas**

Neste trabalho também avaliamos a expressão de 3 genes de receptores de citocinas importantes na montagem da resposta inflamatória: *Il1r1* (que codifica o receptor para Interleucina 1 beta do tipo 1), *Il6r* (que codifica o receptor para a interleucina 6) e *Tnfrs1a* (que codifica o receptor para TNF, TNFR1). Nossos dados demonstram que estes receptores também

são expressos ritmicamente e de forma semelhante aos TLRs. Nossos resultados confirmam evidências anteriores de que a pineal expressa o receptor TNFR1 e ainda expande o entendimento de que este receptor é expresso de forma rítmica na glândula pineal (Figura 12).



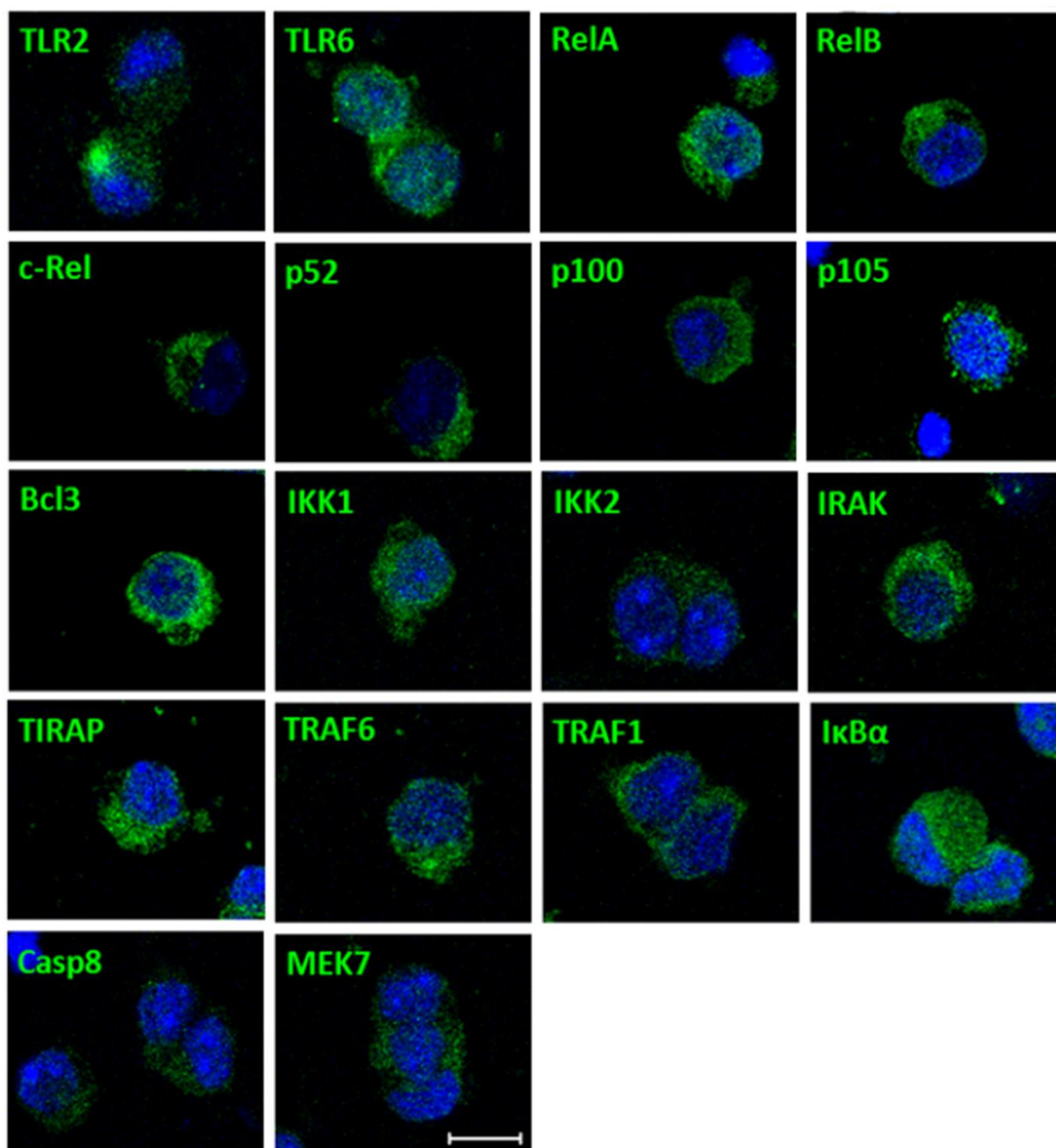
**Figura 12: Expressão circadiana constitutiva de receptores de citocinas em glândulas pineais de ratos.** Os experimentos foram realizados com três *pools* de três amostras de cDNA provenientes de nove pineais. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M da razão da expressão relativa ou pela média  $\pm$  E.P.M do *fold-change* calculados em relação ao ZT com maior expressão. \* representa  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (maior expressão).

Em conjunto, os resultados obtidos com a caracterização da expressão das vias de sinalização TLRs/NF- $\kappa$ B sugerem que o repertório rítmico que atua no controle circadiano da função da glândula pineal também modula a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória. Ainda, indica um programa transcricional para o reconhecimento de mediadores inflamatórios gerando sinais que possam permitir a regulação da produção de melatonina. A seguir, caracterizamos a expressão protéica de 14 destes genes em pinealócitos, as células produtoras de melatonina.

## ***2. Expressão proteica de componentes da maquinaria de sinalização via TLRs e NF- $\kappa$ B em pinealócitos de rato***

Tendo verificado a expressão gênica dos componentes da sinalização dos TLRs, realizamos experimentos de imunocitoquímica em cultura de pinealócitos e analisamos por microscopia confocal para verificar se as células produtoras de melatonina na glândula pineal também expressam proteína para 14 entre os 84 genes avaliados. Os animais foram eutanasiados no ZT10 (final da fase de claro). Em trabalhos recentes, demonstramos que pinealócitos expressam CD14, TLR4 e TNFR1 (Carvalho-Sousa et al., 2011; Da Silveira Cruz-Machado et al., 2012). Neste trabalho foi possível verificar que pinealócitos também expressam os receptores de membrana TLR2 e TLR6, bem como os principais adaptadores para a sinalização intracelular (IKK1, IKK2, IRAK, TIRAP, TRAF6, TRAF1, Caspase 8

e MEK7). Em relação aos membros da família de proteínas inibitórias *kappa* B, observamos que pinealócitos expressam I $\kappa$ B-alfa, a subunidade de NF- $\kappa$ B p100 e p105. A proteína p100 atua como repressor do NF- $\kappa$ B no citoplasma, mas pode ser clivada em p52, enquanto p105 pode ser clivada em p50. Confirmamos a presença da subunidade p52 em pinealócitos, e já é conhecido que estas células expressam a subunidade p50 (Cecon et al., 2010). Verificamos ainda que as proteínas RelA, RelB e c-Rel também são expressos em pinealócitos (Figura 13).



**Figura 13: Imagens representativas da expressão proteica dos componentes da maquinaria de sinalização dos TLRs em pinealócitos de rato.** As células foram observadas por microscopia confocal. Marcação em verde representa imunofluorescência emitida pelo anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo FITC. Marcação em azul representa a imunofluorescência emitida por DAPI, marcador de núcleo celular. N = 3 culturas diferentes. Escala = 10  $\mu$ m.

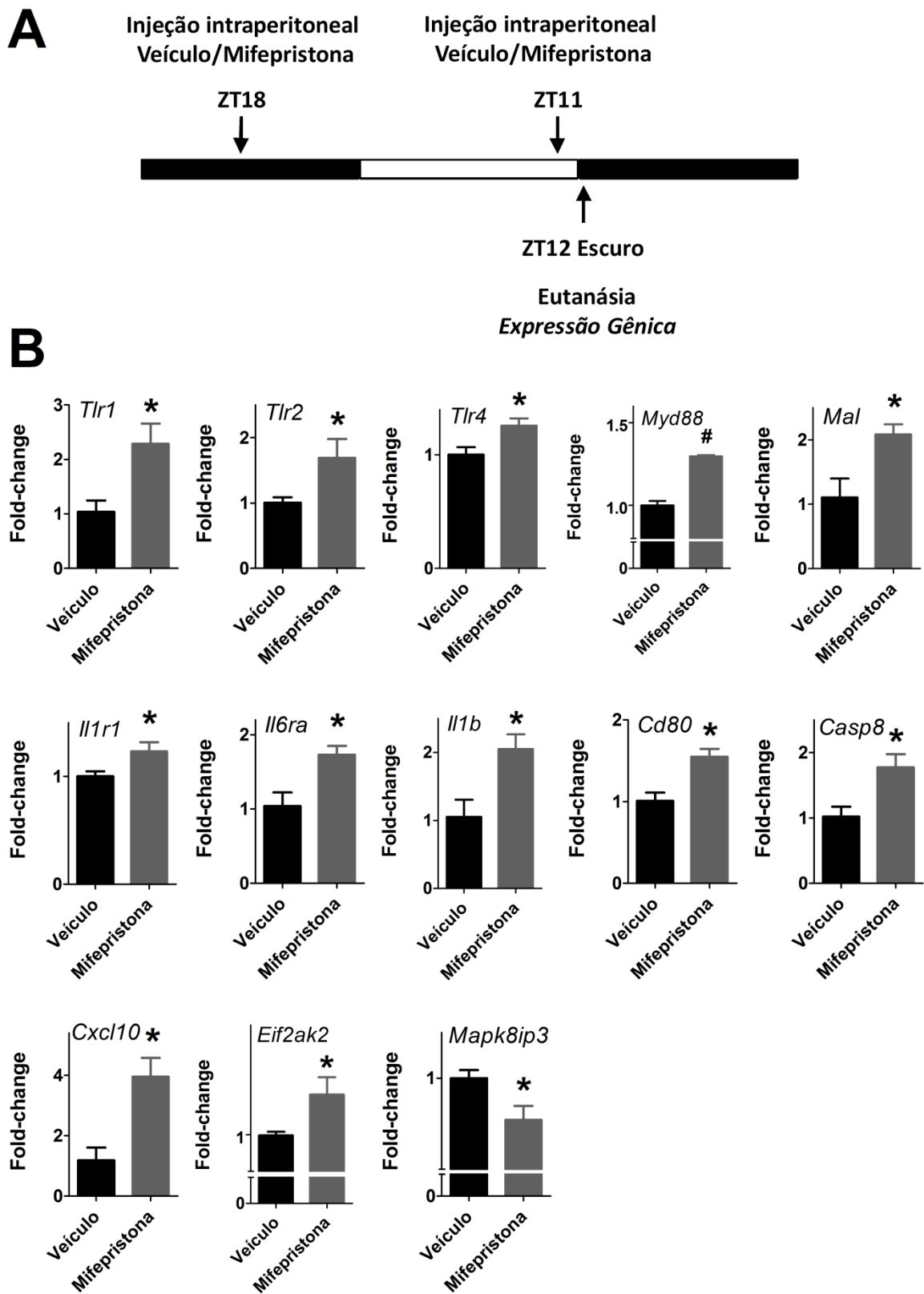
### **3. Ativação de receptor de glicocorticóides (GR) modula a expressão de genes inflamatórios e a síntese de melatonina na glândula pineal.**

Os efeitos de glicocorticóides sobre a glândula pineal já foram estudados e os resultados demonstram que a adrenalectomia abole o ritmo noturno na síntese de melatonina (Lopes et al., 1997), que glândulas pineais de rato expressam GR (Ferreira et al., 2005) e que corticosterona potencia a síntese de melatonina tanto *in vitro* (Ferreira et al., 2005) quanto via infusão direta deste hormônio na glândula pineal por microdiálise (Fernandes et al., 2009). Mais recentemente foi determinada ausência de ritmo na expressão do NF- $\kappa$ B em pineais de rato quando os animais são mantidos em escuro constante (Cecon et al., 2010). Nestas condições, durante as 24 horas do horário circadiano (CT, do inglês, *Circadian Time*) não é detectado aumento cumulativo no conteúdo de NF- $\kappa$ B como ocorre quando os animais são mantidos em ciclo de claro/escuro (Cecon et al., 2010). No entanto, quando os animais em escuro constante entram em atividade (CT12) é observada a máxima detecção de corticosterona no plasma e uma redução no conteúdo de NF- $\kappa$ B nas pineais de rato (Cecon, 2010). De fato, corticosterona bloqueia o NF- $\kappa$ B na glândula pineal para aumentar a síntese de melatonina (Ferreira et al., 2005). Visto que a glândula pineal está sob o efeito de glicocorticóides e que a principal variação na transcrição dos genes ocorre na transição claro/escuro, examinamos o efeito do bloqueio de GR sobre a expressão dos



84 genes analisados anteriormente para avaliar se este receptor regula o conteúdo transcricional nesta transição.

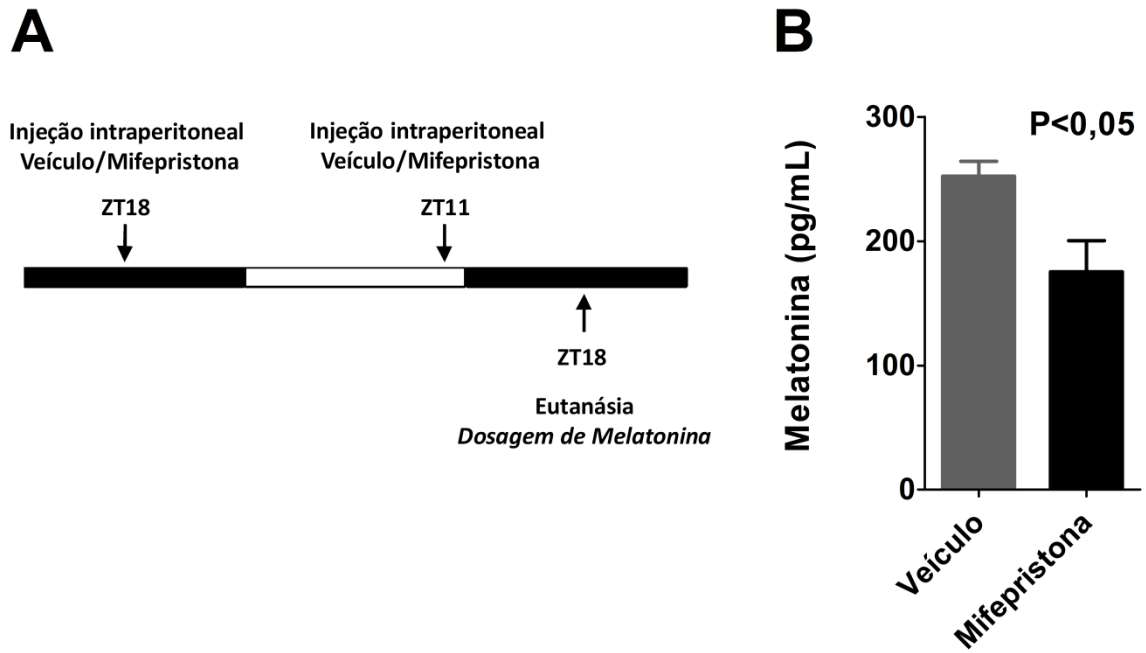
Nossos resultados indicam que 13 dos 84 genes são influenciados pelo bloqueio de GR mediado por mifepristona. Dos genes modulados, 12 deles haviam sido demonstrados como expressos ritmicamente na glândula pineal de ratos: *Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Mal*, *Il1r1*, *Il6r*, *Il1b*, *Casp8*, *Cxcl10*, *Eif2ak2* e *Mapk8ip3*. O único gene modulado pelo bloqueio de GR que não era expresso ritmicamente é o gene *Cd80*. Observamos que, exceto o gene *Mapk8ip3*, todos os demais genes possuem sua expressão aumentada por mifepristona. Nossos resultados sugerem que a ação do GR na pineal durante a transição do claro para o escuro é relevante para modular a expressão de um programa transcricional de genes inflamatórios (Figura 14).



**Figura 14: Efeitos de mifepristona sobre a expressão de genes da via TLRs/NF- $\kappa$ B na fase de escuro do ZT12 em glândulas pineais de rato. A)**

Protocolo experimental para o bloqueio de GR por mifepristona (10 mg/kg) injetada por via intraperitoneal no ZT18 e ZT11 anteriores ao horário de eutanásia dos animais. O grupo controle recebeu duas injeções (nos mesmos horários) do veículo de mifepristona. Os animais foram eutanasiados na fase de escuro, 30 minutos após o apagar das luzes. B) Expressão dos 13 genes regulados pelo bloqueio de GR. Os experimentos foram realizados com três amostras de cDNA em cada grupo. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M do *fold-change* calculados em relação ao veículo. \* representa  $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo. # representa  $P < 0,01$  comparado ao grupo veículo.

Avaliamos ainda o efeito do bloqueio de GR sobre a síntese de melatonina no ZT18 (Figura 15). Nestas condições, observamos que o conteúdo circulante de melatonina no grupo controle (veículo,  $252,1 \pm 12,05$  pg/mL) é reduzido em aproximadamente 31% no grupo que recebeu o bloqueio de GR (mifepristona,  $175,4 \pm 24,9$  pg/mL).



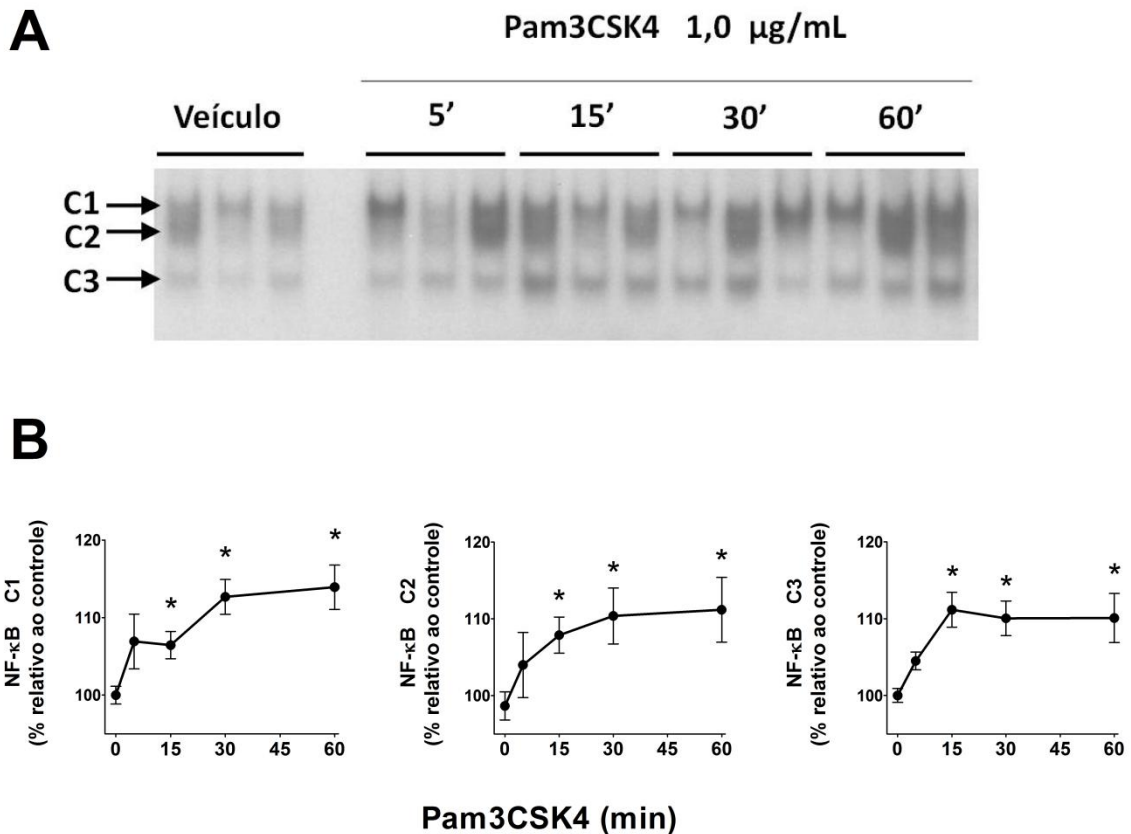
**Figura 15: Efeitos de mifepristona sobre a produção de melatonina.** A) Protocolo experimental para o bloqueio de GR por mifepristona (10 mg/kg) injetada por via intraperitoneal no ZT18 e ZT11 anteriores ao horário de eutanásia dos animais. O grupo controle recebeu duas injeções (nos mesmos horários) do veículo de mifepristona. Os animais foram eutanasiados na fase de escuro no ZT18. B) Conteúdo plasmático de melatonina nos grupos que receberam veículo ou mifepristona. Como apresentado, o bloqueio de GR reduz o conteúdo plasmático noturno de melatonina. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. N=5 animais em cada grupo.

#### **4. Efeitos da ativação dos ligantes de TLR1/TLR2 (Pam3CSK4) ou TLR2 e TLR6 (zimosan) na glândula pineal de ratos**

Até o momento nossos resultados demonstram a expressão circadiana de mediadores inflamatórios na glândula pineal de ratos em condições de hígidez. A seguir, examinamos se mediadores inflamatórios via TLR1, TLR2 ou TLR6 também regulam a produção de melatonina a exemplo do receptor TLR4 (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012). Utilizamos o lipopeptídeo bacteriano sintético Pam3CSK4, conhecido por atuar em heterodímeros TLR1/TLR5 ou o componente de membrana de leveduras, zimosan, que atua via TLR2 e TLR6.

##### **- Efeitos sobre o fator de transcrição NF- $\kappa$ B:**

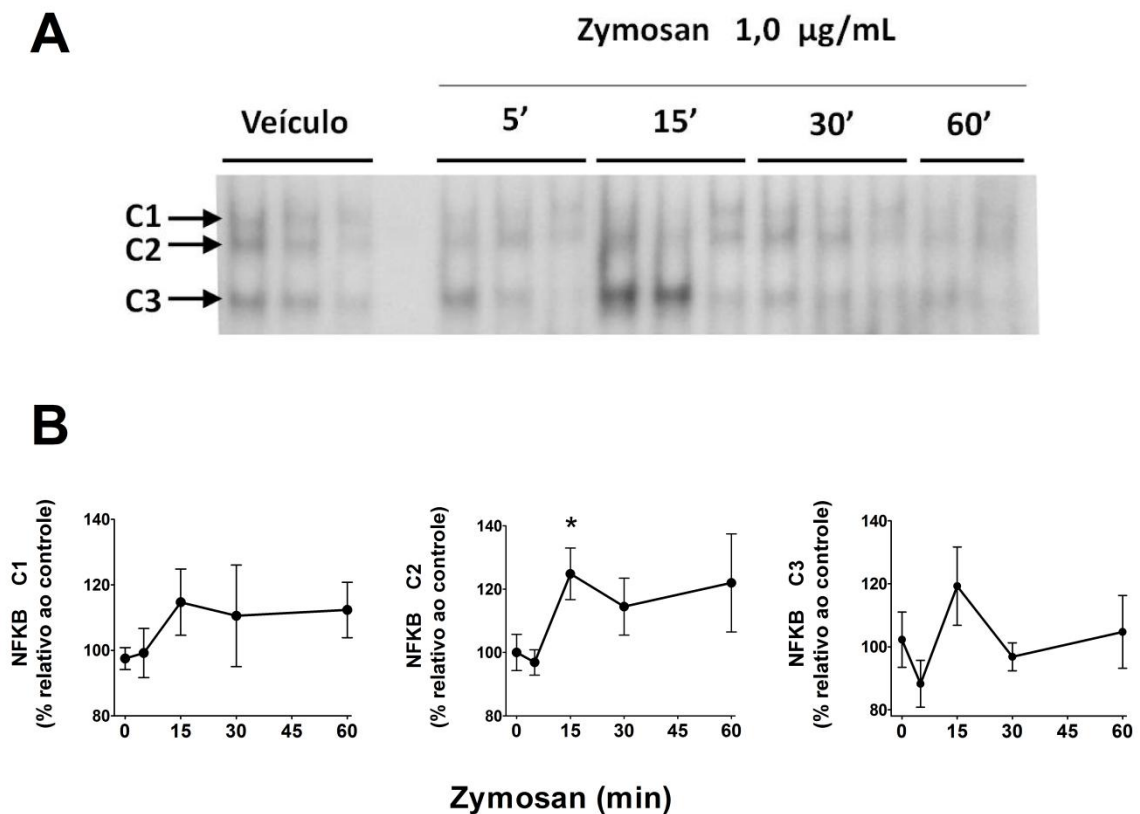
Através da técnica de ensaio de eletromobilidade em gel (EMSA) avaliamos a translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em extratos nucleares de glândulas pineais de rato mantidas em cultura por 48 horas, tratados com veículo ou com os respectivos ligantes: Pam3CSK4 (Figura 16, 1  $\mu$ g/mL, 5 a 120 minutos) ou Zimosan (Figura 17, 1  $\mu$ g/mL, 5 a 120 minutos). Foi verificada a formação de três complexos DNA-proteína (C1, C2 e C3). A quantificação densitométrica demonstra que Pam3Csk4 promove aumento rápido na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B (Figura 16), cujo aumento ocorre entre 15 e 60 minutos em todos os complexos detectados.



**Figura 16: Efeitos dos ligantes de TLR1/TLR2 (Pam3CSK4) sobre a translocação nuclear do NF-κB em cultura de glândulas pineais de rato.**

Glândulas pineais de rato em cultura foram tratadas com Pam3Csk4 (1 µg/mL, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pelos tempos indicados (zero a 60 min). A) Imagem representativa da autoradiografia obtida em extratos nucleares por EMSA utilizando oligonucleotídeo para NF-κB marcado com radioisótopo <sup>32</sup>P e evidenciando a formação de três complexos proteína-DNA (NF-κB C1, C2 e C3). B) Quantificação densitométrica das autoradiografias obtidas no ensaio de EMSA. Dados estão representados pela média ± E.P.M. da porcentagem em relação às glândulas estimuladas apenas com veículo. N= 2 géis; 5 a 7 glândulas pineais por ponto. \* P<0,05 versus o grupo veízulo (zero).

Em relação aos efeitos do zimosan sobre a ativação do NF- $\kappa$ B, também observamos a formação de três complexos DNA-proteína. A quantificação densitométrica demonstra que Zimosan promove aumento rápido e transitente na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B no complexo 2 (Figura 17), cujo aumento significativo ocorre após 15 minutos de estímulo, decaindo a seguir a valores inferiores após este tempo. Nos complexos 1 ou 3, não observamos aumento significativo no conteúdo nuclear do NF- $\kappa$ B.



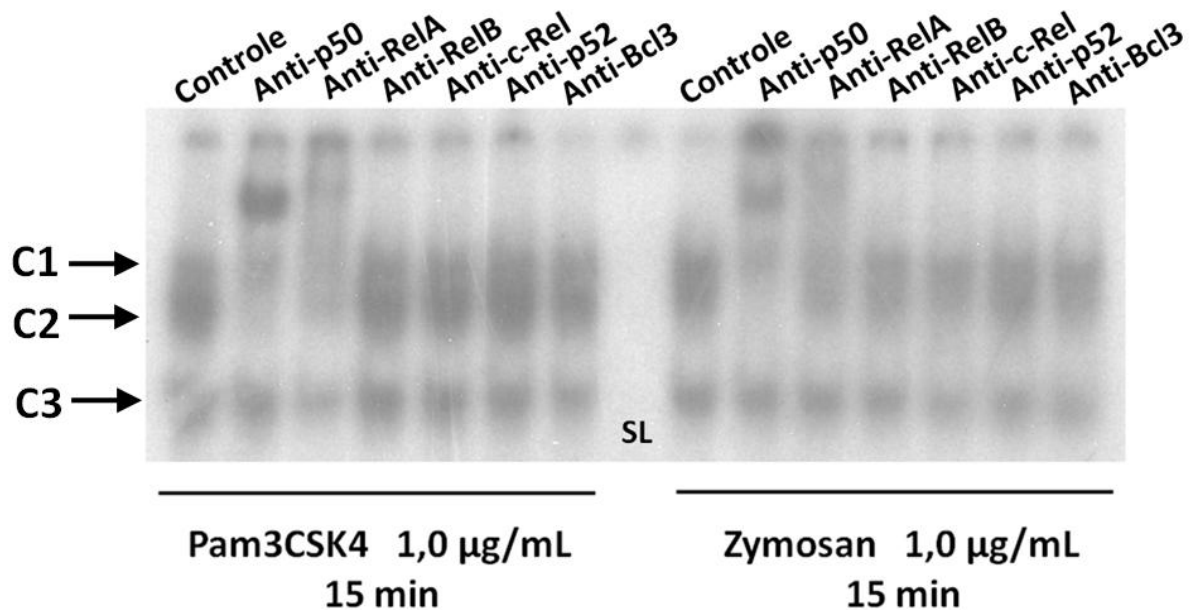
**Figura 17: Efeitos dos ligantes de TLR2/TLR6 (zimosan) sobre a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B em cultura de glândulas pineais de rato.** Glândulas pineais de rato em cultura foram tratadas com Zimosan (1  $\mu$ g/mL, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pelos tempos indicados (zero a 60 min). A) Imagem representativa da autoradiografia obtida em extratos nucleares por EMSA utilizando oligonucleotídeo para NF- $\kappa$ B marcado com radioisótopo <sup>32</sup>P e evidenciando a

formação de três complexos proteína-DNA (NF- $\kappa$ B C1, C2 e C3). B) Quantificação densitométrica das autoradiografias obtidas no ensaio de EMSA. Dados estão representados pela média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem em relação às glândulas estimuladas apenas com veículo. N= 2 géis; 5 a 7 glândulas pineais por ponto. \*  $P < 0,05$  versus o grupo veículo (zero).

Para identificar as subunidades de NF- $\kappa$ B presentes em cada complexo foi utilizado um *pool* de extratos proteicos provenientes de glândulas pineais tratadas com Pam3CSK4 ou Zimosan (1  $\mu$ g/mL, 15 min). Estes extratos foram incubados com anticorpos específicos para cada subunidade da família NF- $\kappa$ B (p50, RelA, RelB, c-Rel, p52) e também com anticorpo para a proteína BCL3. Quando há interação do anticorpo com a proteína de interesse forma-se um complexo maior (DNA-anticorpo-proteína) que promove um retardo adicional na migração dos extratos no gel (*super-shift*).

Como observado na figura 18, nas amostras de pineais tratadas por Pam3CSK4 o retardo ocorreu nos complexo 1 e complexo 2. No complexo 1, a banda foi parcialmente descolada pelo anticorpo anti-RelA e parcialmente deslocada por anti-p50, sugerindo a presença de heterodímeros p50/RelA. No complexo 2 a banda foi totalmente deslocada pelo anticorpo p50, sugerindo a presença de homodímeros p50/p50. Em extratos de glândulas pineais estimuladas por zimosan, observamos o mesmo padrão de deslocamento, com presenças de heterodímeros p50/RelA no complexo 1 e homodímeros p50/p50 no complexo 2.

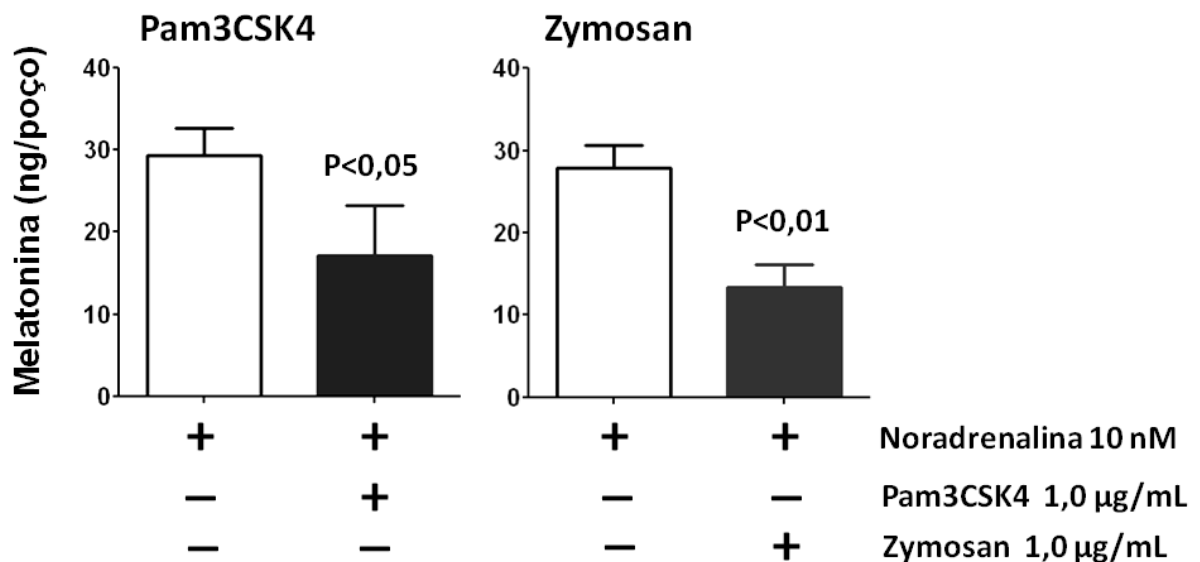




**Figura 18: Ensaio de *super-shift* em glândulas pineais de rato:** Na parte superior da figura é possível observar cada anticorpo utilizado no ensaio de *super-shift*. Como representado na autoradiografia, em extratos de glândulas pineais estimuladas por Pam3CSK4, o anticorpo anti p-50 desloca parcialmente o C1 e desloca o C2 por completo, enquanto o anticorpo anti-RelA desloca parcialmente a banda no C1, sugerindo a presença de heterodímeros p50/RelA (C1) e homodímeros p50/p50 (C2). Em extratos de glândulas tratadas com zimosan observa-se que o anticorpo anti p-50 também desloca parcialmente o C1 e desloca o C2 por completo, enquanto o anticorpo anti-RelA desloca parcialmente a banda no C1, sugerindo a presença de heterodímeros p50/RelA (C1) e homodímeros p50/p50 (C2). A incubação com nenhum dos anticorpos deslocou a banda no complexo 3 (C3). SL: Sonda livre, sem presença de extrato nuclear.

- **Efeitos sobre a síntese de melatonina:**

Para avaliar os efeitos dos ligantes de TLRs sobre a síntese de melatonina induzidos por noradrenalina, pineais mantidas em cultura por 35 horas foram estimuladas com os ligantes Pam3CSK4 (1,0 µg/mL) ou Zimosan (1,0 µg/mL) por 13 horas adicionais totalizando 48 horas de cultivo. A seguir, ainda na presença do respectivo ligante, as glândulas pineais foram incubadas com noradrenalina (10 nM) por 5 horas. Os dados da dosagem de melatonina no meio de cultura por HPLC (Figura 19) demonstram que tanto Pam3Csk4 (controle 29,4 ± 3.2; Pam3Csk4 17.2 ± 3.8 ng/200uL) quanto Zimosan (controle 27,8 ± 2.7; Zimosan 13.36 ± 2.8 ng/200uL) bloqueiam a produção de melatonina induzida por noradrenalina em cultura de glândulas pineais de rato.



**Figura 19: Efeitos dos ligantes de TLR1/TLR2 (Pam3Csk4) ou TLR2/TLR2 e TLR2/TLR6 (Zimosan) sobre a produção de melatonina induzida por noradrenalina em cultura de glândulas pineais de rato.** Glândulas pineais de rato em cultura foram tratadas com Pam3CSK4 ou Zimosan (1 µg/mL, 37°C,

5% CO<sub>2</sub>) por 13 horas, seguida de estimulação com noradrenalina (10 nM, 5 horas). O conteúdo de melatonina foi quantificado por HPLC. Coluna branca representa o grupo controle (que recebeu apenas o tratamento com noradrenalina) e coluna preta representa o grupo estimulado com o ligante na presença de noradrenalina. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. N = 6 a 8 glândulas provenientes de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi avaliada por teste *t* de *student* e está apresentada no gráfico.

## **5. Efeitos da exposição aguda à dieta hipercalórica sobre a síntese de melatonina em ratos**

Como já abordado anteriormente, diversos modelos demonstraram que a produção de melatonina pela glândula pineal é suprimida durante a montagem da resposta inflamatória (revisto por Markus et al., 2007, 2013). Nesta tese, realizamos experimentos para avaliar o que ocorreria com o eixo imune-pineal em uma condição onde um sinal inflamatório fosse produzido de forma contínua e os receptores TLRs estivessem ativados permanentemente. Em outras palavras, como funcionaria o eixo imune-pineal em uma resposta fisiopatológica, que ao invés de passar para o estado de resolução, é perpetuada.

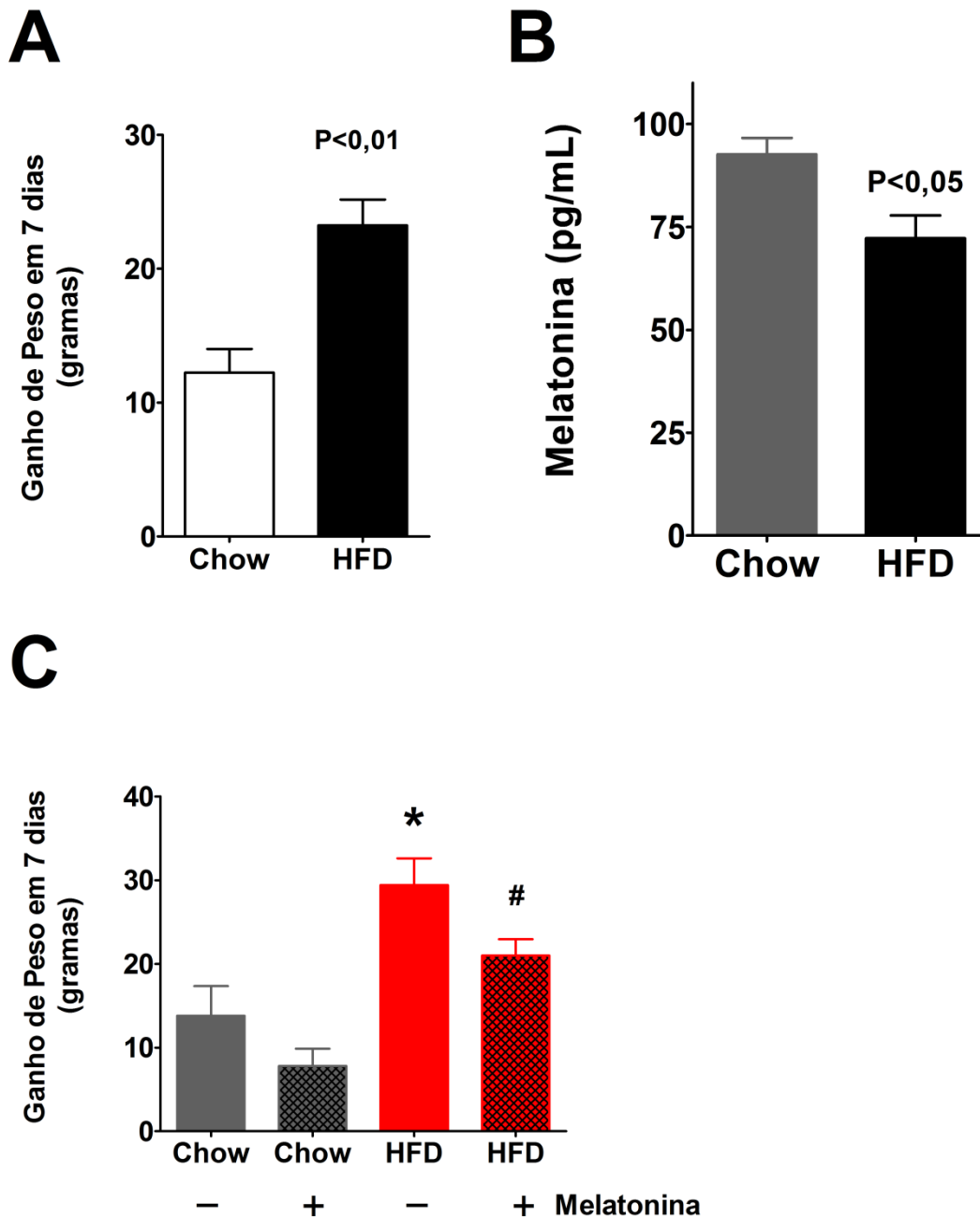
Para responder esta questão utilizamos o modelo de obesidade em ratos induzida por dieta hipercalórica (HFD, do inglês, *High-Fat Diet*). Este é um modelo animal bem estabelecido e bem caracterizado quanto a presença de um estado inflamatório de baixa intensidade (Xu et al., 2003; Elks e

Francis, 2010). Nestes experimentos utilizamos uma exposição curta dos animais à dieta hipercalórica (7 dias), haja visto que é suficiente para induzir a produção de diversos mediadores inflamatórios no SNC (Thaler et al., 2012) enquanto não há detecção dos mesmos em tecidos metabólicos, como fígado e tecido adiposo (Thaler et al., 2012).

Como apresentado na Figura 20, os animais submetidos à dieta hipercalórica (HFD) apresentam ganho de peso significativo comparado ao grupo que foi mantido em dieta normocalórica (*chow*) mesmo quando expostos por 7 dias à dieta. Ainda, a detecção do conteúdo circulante de melatonina no ZT18 é reduzida de  $92,6 \pm 3,9$  pg/mL no grupo em dieta normocalórica (*chow*) para  $72,2 \pm 5,6$  pg/mL no grupo de animais mantidos em dieta hipercalórica (HFD), sugerindo que o estado fisiopatológico desencadeado pela dieta hipercalórica ativa o Eixo Imune-Pineal, reduzindo a produção noturna de melatonina.

Em seguida, examinamos o efeito da reposição de melatonina na água de beber, apenas durante a fase de escuro, sobre o ganho de peso de animais mantidos em dieta normocalórica (*chow*) ou hipercalórica (HFD). Doses de melatonina semelhantes à usada neste estudo foram determinadas por repor os níveis de melatonina próximos ao conteúdo noturno circulante (Rasmussen et al., 2001). Nossos resultados demonstram que quando os animais mantidos em dieta de manutenção (*chow*) recebendo melatonina não há diferença no ganho de peso corporal durante o período experimental. Por outro lado, animais mantidos em dieta hipercalórica recebendo melatonina durante a fase de escuro apresentam ganho de peso significativamente

menor que os animais na mesma dieta que receberam veículo. Ainda, mesmo recebendo melatonina durante a fase de escuro, animais mantidos em dieta hipercalórica apresentam peso significativamente maior que os animais mantidos em dieta de manutenção. Em conjunto, estes resultados sugerem uma relação importante entre a regulação da síntese de melatonina e o ganho de peso corporal.



**Figura 20: Efeitos da dieta hipercalórica em ratos:** A) Ganho de peso corporal após 7 dias de manutenção dos animais em dieta de normocalórica (*Chow*) ou hipercalórica (HFD). B) Conteúdo noturno circulante de melatonina (ZT18) após 7 dias de manutenção dos animais em dieta de normocalórica (*Chow*) ou hipercalórica (HFD). C) Efeitos do tratamento de animais mantidos em dieta normocalórica (*Chow*) ou hipercalórica (HFD) por veículo ou melatonina na água de beber noturna. Barras cinza representam os grupos de animais que foram mantidos em dieta normocalórica. Barras vermelhas

representam os grupos de animais que foram mantidos em dieta hipercalórica. A representação em xadrez indica grupos que receberam melatonina na água de beber noturna. Dados estão expressos pela média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo *Chow* que recebeu veículo. #  $P < 0,05$  comparado ao grupo HFD que recebeu veículo ou  $P < 0,01$  comparado ao grupo *Chow* que recebeu melatonina. N=5 animais por grupo.

A organização temporal interna em mamíferos envolve a interação entre as glândulas pineal e adrenais. A primeira sintetiza o hormônio melatonina na fase de escuro tanto em animais de hábito diurno quanto noturno (revisto por Simmoneaux e Ribelayga, 2003). A segunda produz e libera glicocorticóides para preparar o organismo para a fase de atividade (Kalsbeek et al., 2012). Neste sentido, a produção circadiana destes hormônios promove a adaptação de sistemas fisiológicos (Kalsbeek et al., 2006). Em roedores, o pico de corticosterona ocorre imediatamente antes do apagar das luzes e envolve o aumento da afinidade de receptores para glicocorticóides (GR) (De Kloet et al., 1998; Sapolsky et al., 2000).

# Discussão



## I. DISCUSSÃO

A glândula pineal, como transdutora neuroendócrina dos ciclos ambientais, produz melatonina apenas durante a fase de escuro (revisito por Reiter, 1991). Uma vasta literatura consolida as vias moleculares que permitem a produção noturna de melatonina em diversas espécies (revisito por Simmoneaux e Ribelayga, 2003). Por outro lado, evidências recentes apontam que a glândula pineal também pode ser modulada por mediadores endógenos, como citocinas e glicocorticóides (Withyachumnarnkul et al., 1990, 1991; Tsai e McNulty, 1999; Tsai et al., 2001a, b; Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2006; Fernandes et al., 2009; Carvalho-Sousa et al., 2011).

A comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o estado de atividade do sistema imunológico permite a regulação no conteúdo circulante de melatonina e o ajuste das respostas de defesa (Markus et al., 2013). A produção noturna de melatonina é conhecida por controlar a interação de células de defesa à camada endotelial, permitindo a manutenção de um estado de quiescência por reduzir a adesão e o rolamento destas células (Lotufo et al., 2001). Havendo a necessidade da ativação das células de defesa, a glândula pineal deveria discernir entre fatores que sinalizam estados de higidez ou inflamatórios para regular sua produção de melatonina e modular a resposta inflamatória (revisito por Markus et al., 2007, 2013). Este preceito faz parte de uma das alças do eixo imune-pineal e faz parte do escopo desta tese. Em seguida a redução no conteúdo circulante de melatonina, e como parte integrante da resposta de defesa, células

ativadas por mediadores inflamatórios passam a produzir melatonina de forma não-rítmica no local do processo inflamatório (revisto por Carrilo-Vico et al., 2013; Markus et al., 2013), permitindo a modulação fina de fatores de transcrição e mediadores (Tamura et al., 2009; Marçola et al., 2012) e o aumento da fagocitose (Pires-Lapa et al., 2013). Na fase de resolução do processo inflamatório, a produção rítmica de melatonina é restaurada (revisto por Markus et al., 2007, 2013). Nesta tese, a função da glândula pineal será discutida acerca das rotas que mediadores inflamatórios poderiam utilizar para regular a síntese de melatonina.

### ***TLRs/NF- $\kappa$ B em condições de hígidez***

A glândula pineal é um órgão circumventricular e, portanto, fora da barreira hemato-encefálica e prontamente acessível a mediadores inflamatórios circulantes (Szathmari et al., 2014). Neste estudo, caracterizamos a expressão de moléculas que a glândula pineal poderia utilizar para reconhecer mediadores inflamatórios e regular a síntese rítmica de melatonina. A presente tese determinou que, na pineal de ratos, 70 dentre 84 genes que participam da resposta inflamatória são expressos de forma rítmica. Entre estes estão incluídos genes que codificam a expressão de receptores, moléculas acopladoras, proteínas implicadas nas vias de transdução e proteínas efetoras de PAMPs e DAMPs. Considerando que estas vias, além de serem responsáveis pela montagem de uma resposta inflamatória, também estão implicadas na regulação fisiológica do SNC

(Fassbender et al., 2003), nosso trabalho mostra pela primeira vez que estes processos devem estar implicados na fisiologia normal da glândula pineal de ratos. O perfil observado para a maioria dos genes indica um padrão de expressão maior durante a fase de claro em relação à fase de escuro. Ao considerarmos o padrão de produção de melatonina, a qual ocorre apenas na fase de escuro, estes resultados podem ser discutidos de duas formas: a primeira seria que o aumento na expressão destes genes inflamatórios seria um fator para impedir a síntese de melatonina durante a fase de claro. A segunda seria que a redução rápida no conteúdo transcricional destes genes após o apagar das luzes seria um “fator permissivo” para que a síntese de melatonina fosse induzida por ativação de adrenocetores  $\beta 1$  na fase de escuro.

Atualmente há consenso sobre os principais mecanismos que mantêm os níveis de melatonina altos durante a fase de escuro, embora poucos sejam determinados para explicar a ausência de síntese de melatonina durante a fase de claro. De modo geral, refere-se que a ausência de liberação diurna de noradrenalina seja o principal mecanismo para a manutenção do baixo conteúdo de melatonina circulante observado durante a fase de claro ambiental (revisto por Simmoneaux e Ribelayga, 2003). No entanto, o conteúdo circulante de melatonina pode ser detectável mesmo durante a fase de claro, embora em menor quantidade. O conteúdo intrapineal de noradrenalina também é detectável nesta fase e, aumenta em cerca de quatro vezes na fase de escuro (Drijfhout et al., 1996). Uma vez que a pinealectomia abole por completo a detecção circulante do conteúdo noturno deste hormônio (revisto por Reiter, 1991), a principal função da glândula

pineal é traduzir variações rítmicas nos ciclos de luminosidade ambiental através da regulação da amplitude do conteúdo circulante de melatonina. O fator chave para este processo envolve a disponibilidade proteica da enzima AANAT (revisto por Zheng e Cole, 2002). Mesmo *in vitro*, a pineal produz menor quantidade de melatonina quando as glândulas de ratos são obtidas durante a fase de claro comparada à fase de escuro e estimuladas com uma mesma concentração de noradrenalina (Vaughan et al., 1986). Portanto, seria possível que mecanismos intrínsecos fossem estabelecidos para regular a síntese diária deste hormônio e a consequente característica de sua produção e secreção em maior quantidade durante a fase de escuro. Um deles versa a respeito da expressão dos receptores do  $\beta$ 1-adrenérgicos, os quais estão presentes na membrana de pinealócitos em alta densidade (Harmouch et al., 1994) e apresentam variação rítmica ao longo do fotoperíodo, com maior expressão na fase de escuro ambiental (Craft et al., 1985; Pangerl et al., 1990). Neste trabalho, apresentamos o programa transcricional de genes inflamatórios na glândula como outra possibilidade de regulação da síntese de melatonina. Alguns estudos já exploraram mecanismos para explicar a regulação da síntese de melatonina durante a fase de claro. Dentre eles, podemos citar que a ativação dos receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos (Rudeen et al., 1990), ou a heterodimerização entre receptores  $\alpha$ 1- ou  $\beta$ 1-adrenérgicos ao receptor de dopamina  $D_4$  (González et al., 2012) durante a fase de claro são os mais referidos. No entanto, a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Cecon et al., 2010) e a produção circadiana de mediadores inflamatórios (Lissoni et al., 1990; Withyachumnarnkul et al.,

1990; Tsai e McNulty, 1999; Tsai et al., 2001a) também são fatores que podem contribuir para esta observação.

Outra discussão pertinente a este trabalho versa sobre os mecanismos que regulam o aumento na expressão dos genes inflamatórios durante a fase de claro e promovem o ritmo circadiano na expressão deste programa transcricional. É conhecido que a expressão protéica do fator de transcrição NF- $\kappa$ B sob a forma de homodímeros p50/p50 na pineal de ratos (Cecon et al., 2010) ocorre de forma semelhante aos observados para o seu gene (*Nfkb1*) neste trabalho. Quando os animais são mantidos em escuro constante, não se observa o aumento característico do conteúdo de NF- $\kappa$ B como nas condições de claro/escuro. Portanto, o aumento deste fator de transcrição e, possivelmente, a expressão gênica de mediadores inflamatórios é um efeito induzido pela presença de luz. Outros autores já descreveram efeito semelhante na glândula pineal de ratos: a expressão da enzima 3-O-sulfotransferase 2 é regulada positivamente durante a fase de claro e não é detectável na fase de escuro (Borjigin et al., 2003). Essa enzima transfere um grupo sulfato para a posição 3-OH de uma glicosamina para proteoglicanos de heparan sulfato (Kuberan et al., 2004). É interessante notar que o heparan sulfato foi descrito recentemente como um ligante endógeno do receptor TLR4 (Brennan et al., 2012; Goodall et al., 2014) e poderia contribuir para a regulação endógena do ritmo na expressão dos genes avaliados neste trabalho. Neste ponto, é importante mencionar ainda que outros genes, que também são descritos como ligantes endógenos do receptor TLR4 foram detectados na glândula pineal em nosso estudo: *Hmgb1*, *Hsp60* e *Hsp70* possuem aumento gradativo de sua expressão na

fase de claro e redução após o apagar das luzes. Estes mediadores estão aumentados em patologias que cursam com o comprometimento do sistema melatonérgico, como no diabetes do tipo 2 (Dasu et al., 2010). A confirmação da tradução destes genes em proteína na pineal permitirá avaliar se a interação destas com o receptor TLR4 também controla a síntese de melatonina na glândula. De modo geral, o padrão observado em glândulas pineais de rato, durante as fases de claro ou escuro, sugere um estereótipo na expressão dos genes desde os receptores de membrana até os genes que codificam a via de sinalização intracelular. Outros estudos também encontraram um padrão de expressão semelhante para os genes que avaliamos (Klein et al., 2010; Bustos et al., 2011).

Em contrapartida ao aumento cumulativo na expressão gênica na fase de claro, observamos que nos primeiros minutos após o apagar das luzes, grande parte dos genes apresentam redução rápida na expressão gênica. Uma vez que o receptor para glicocorticóides (GR) possui sua afinidade aumentada no momento que ocorre a máxima secreção de corticosterona e, considerando que o pico deste hormônio em ratos ocorre na transição entre as fases de repouso e atividade (revisto por De Kloet et al., 1998; Sapolsky et al., 2000), avaliamos o envolvimento do ritmo endógeno de glicocorticóides na expressão dos genes de mediadores inflamatórios no início da fase de escuro (ZT12E), para entender se a exemplo do observado para a expressão da proteína p50 (Cecon et al., 2010), corticosterona regula a expressão desta via de sinalização na pineal de ratos. Nossos resultados indicam que quando GR é bloqueado por mifepristona, a expressão de 13 genes dos 84 avaliados é regulada. Desses, 12 genes tiveram a expressão aumentada por

mifepristona. O único gene que manteve uma redução ainda maior na expressão no início da fase de escuro foi o *Mapk8ip3*. Este gene codifica a proteína JIP3 (do inglês, *JNK-Interacting Protein 3*) que é conhecida por interagir com o receptor TLR4 e aumentar a produção de citocinas (Matsuguchi et al., 2003). De fato, dos 19 genes que codificam citocinas testados em nossos ensaios, apenas o gene de *Il1b* foi aumentado pelo bloqueio de GR. A expressão deste gene em pineais de rato é conhecida por regular a síntese de indolaminas na glândula, ao reduzir o conteúdo de serotonina (Tsai et al., 2001b).

Os efeitos da corticosterona exógena sobre a produção de melatonina já foram caracterizados anteriormente (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2009). Nestas condições, a ativação de GR induziu aumento na produção de melatonina. Em relação à interação entre o ritmo endógenos de glicocorticóides sobre a produção noturna de melatonina, já foi determinado, em camundongos, que a adrenalectomia reduz a excreção noturna do metabólito 6-sulfatoximelatonina, sugerindo uma regulação no sistema melatonérgico (Lopes et al., 2001). Em nosso trabalho, observamos que animais tratados com mifepristona apresentam diminuição do conteúdo circulante de melatonina no ZT18. Este resultado sugere que o bloqueio de GR na glândula pineal reduz a produção noturna de melatonina. Um possível mecanismo pelo qual GR poderia modular a síntese de melatonina seria através do antagonismo mútuo existente entre este receptor e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (McKay e Cidlowski, 1998, 2000; Widén et al., 2003). De fato, os efeitos da corticosterona exógena são conhecidos por serem mediados via redução do conteúdo de NF- $\kappa$ B em pineais de rato (Ferreira et

al., 2005). Ainda, o pico de corticosterona endógeno na transição das fases de repouso para a de atividade, também é conhecido por reduzir o conteúdo de NF- $\kappa$ B na pineal (Cecon et al., 2010). Neste trabalho, o bloqueio de GR mediado por mifepristona aumentou a expressão de genes que são conhecidos por regular a síntese de melatonina, como *Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Mal*, *Il1r1* e *Il6r*. É interessante notar que estes genes codificam proteínas que estão *upstream* à sinalização do NF- $\kappa$ B. Dessa forma, seria possível que o aumento na expressão desta via de transdução de sinal, promovido pelo bloqueio de GR, atue na glândula pineal em conjunto para reduzir a produção de melatonina. De fato, já foi determinado que a ativação do receptor TLR4 (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012) ou TLR1/TLR2 (presente tese) reduzem a produção de melatonina.

### ***TLRs/NF- $\kappa$ B em condições inflamatórias***

A modulação da síntese de melatonina por moléculas mediadoras de resposta inflamatória já foi previamente descrita, e constitui uma das bases do conceito do eixo imune-pineal explorada nesta tese (Markus et al., 2007, 2013). O fato de a glândula pineal perceber sinais inflamatórios como provenientes de patógenos (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, 2012) ou moléculas endógenas que sinalizam processos inflamatórios (Fernandes et al., 2006, Carvalho-Sousa et al., 2011; Cecon, 2014) reforça o conceito da pineal como um novo componente da resposta de defesa do organismo, a qual atua como sensor do estado de higidez para regular a produção



circadiana de melatonina e modular a migração de células de defesa, quando necessário.

Na presente tese determinamos a expressão de 14 proteínas em pinealócitos que haviam sido detectadas na forma de expressão gênica em glândulas pineais. É interessante observar que a expressão dos receptores TLR2 e TLR6 foi confirmada em pinealócitos, bem como a expressão das demais subunidades de NF- $\kappa$ B: RelA, RelB, c-Rel e p52, ou a forma não-clivada das proteínas, p100 e p105. Essas últimas também atuam como proteínas inibitórias da via NF- $\kappa$ B no citoplasma celular (revisto por Beinke e Ley, 2004). Outro membro da família de proteínas inibitórias detectada foi a Bcl3. Esta proteína pode atuar no núcleo celular em cooperação aos dímeros de NF- $\kappa$ B que não possuem domínio de transativação para induzir transcrição gênica (revisto por Gamble et al., 2012). É importante salientar que os pinealócitos foram obtidos de glândulas pineais quiescentes e, portanto, é esperado que a expressão destas proteínas seja predominante no citoplasma celular, haja visto que não houve estímulo para a indução destas proteínas ao núcleo celular. Estes resultados são essenciais para caracterizar que as células produtoras de melatonina, os pinealócitos, possuem a maquinaria necessária para regular a síntese de melatonina via translocação nuclear de qualquer dímero de NF- $\kappa$ B possível, já que no citoplasma celular são encontradas todas as subunidades, a exemplo do observado na transcrição gênica. Além disso, demonstramos a presença de alguns adaptadores e efetores celulares no citoplasma celular de pinealócitos: os adaptadores imediatos dos receptores do tipo *Toll*, TIRAP,

IRAK, TRAF6 e TRAF1, as quinases IKK1 e IKK2, a principal proteína inibitória da via NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , e também os efetores caspase 8 e MEK7.

Na glândula pineal, a ativação do receptor TLR4 *in vitro* induz a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B de maneira rápida e transiente, se iniciando logo após sua incubação, atingindo a máxima detecção nuclear após 15 minutos e, reduzindo nos tempos subseqüentes (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). De modo geral, a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B é regulada pelo tempo de estímulo e também ocorre de maneira rápida em diversos tecidos (Covert et al., 2005; Werner et al., 2005). Na presente tese, avaliamos o efeito da ativação dos receptores TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6 sobre a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B pelos ligantes Pam3CSK4 ou zimosan, respetivamente. Ambos os ligantes foram eficientes na indução da translocação nuclear deste fator de transcrição de maneira significativa após 15 minutos de incubação, a exemplo do observado pela ativação do TLR4 (Da Silveira Cruz-Machado et al., 201). A principal diferença foi observada no perfil do processo, o qual foi persistente quando o NF- $\kappa$ B em pineais foi induzido via receptores TLR1/TLR2, enquanto transiente quando as pineais foram estimuladas via TLR2/TLR6. Neste contexto, uma possível explicação para a transiência no conteúdo de NF- $\kappa$ B ativado por zimosan pode envolver as alças de retroalimentação negativa controladas pelas proteínas inibitórias. Estas proteínas (principalmente I $\kappa$ B $\alpha$ ) podem ser sintetizadas rapidamente após incubação com os ligantes (Hoffmann e Baltimore, 2006) e sua ressíntese está diretamente relacionada à redução do conteúdo nuclear deste fator de transcrição (Nelson et al., 2004; Hoffmann et al., 2002; Covert et al., 2005) promovendo a finalização apropriada da atividade transcricional para

que as células se mantenham responsivas aos estímulos subsequentes (Wan e Lenardo, 2010). Por outro lado, a persistência na ativação do NF- $\kappa$ B via TLR1/TLR2 pode envolver uma regulação diferencial no recrutamento das proteínas inibitórias I $\kappa$ B, ou ser dependente da geração de sinais, como a produção de citocinas, permitindo a perpetuação da ativação desta via (Kagoya et al., 2014).

A caracterização das subunidades envolvidas na ativação de NF- $\kappa$ B foi realizada através da técnica de *super-shift*, na qual anticorpos específicos de cada subunidade são incubados com os extratos proteicos nucleares. Dímeros de p50 e p65 são recrutados ao núcleo das células da pineal após tratamento com zimosan ou Pam3CSK4. Os dados obtidos no presente estudo demonstram que a produção de melatonina é reduzida pela ativação dos TLR1/TLR2 e TLR2/TLR6. Em fagócitos do colostro humano a ativação dos TLR2/TL6 por zimosan induz a síntese de melatonina (Muxel et al., 2012; Pires-Lapa et al., 2013). Nesta condição, zimosan induz a translocação nuclear das subunidades p50, RelA e c-Rel (Muxel et al., 2012). Esta última não foi observada na glândula pineal de ratos neste estudo. Em pinealócitos, o aumento no conteúdo nuclear da subunidade p50 induzido pela ativação dos TLRs provavelmente está relacionado com a inibição da transcrição gênica da AANAT, como já observado em outros estudos (Fernandes et al., 2006; Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Além disso, a presença de sítios responsivos ao NF- $\kappa$ B no promotor da *Aa-nat* já foram demonstrados anteriormente (Markus et al., 2007; Muxel et al., 2012). Portanto, determinamos que zimosan e Pam3CSK4 ativam o eixo imune-pineal e regulam a síntese de melatonina.

A ativação do eixo imune-pineal considera que o início da resposta imune-inata promove a alternância entre as fontes produtoras de melatonina e a regulação da migração de células de defesa para o local do foco inflamatório. Tendo considerado a glândula pineal como um alvo para moléculas que medeiam respostas inflamatórias, investigamos se a resposta inflamatória induzida por dieta hipercalórica regula a produção de melatonina.

A obesidade é uma pandemia que cursa com alterações no estado metabólico e com presença de um estado inflamatório de baixa intensidade (Xu et al., 2003, Elks e Francis, 2010) que é reconhecida como importante problema de saúde pública mundial, a qual predispõe o organismo à severas complicações. No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística estimam que metade da população apresente sobrepeso (IBGE, 2010).

Evidências recentes têm demonstrado que a ativação da resposta inflamatória em centros hipotalâmicos que controlam a homeostase energética é um dos principais mecanismos para a indução de obesidade (revisto por Thaler et al., 2013). Diversos estudos foram eficientes na confirmação desta hipótese (Milanski et al., 2009; Thaler et al., 2012, 2013; Wang et al., 2012; Guyenet et al., 2013; Lee et al., 2013), embora ainda não seja completamente entendido como mediadores inflamatórios induzem a resistência a leptina.

O hormônio leptina, produzido por adipócitos, sinaliza a eficiência energética para os centros hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar

(revisto por Elias e Purohit, 2012). Sabidamente, os principais modelos animais de obesidade utilizados em pesquisa são os que não produzem leptina (camundongo *Lepr<sup>ob</sup>*) ou que não possui uma sinalização eficiente deste hormônio (camundongo *Lepr<sup>db</sup>* ou rato Zucker). Neste ponto gostaria de ressaltar que mutações nos genes *Lep* ou *Lepr* ocorrem em menor frequência e, portanto, o aumento na ingestão calórica é tido como o principal indutor de obesidade em humanos. Nesta tese, optamos por utilizar o modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica ao considerar que este modelo é conhecido por ativar a produção de mediadores inflamatórios para regular a homeostase energética (Thaler et al., 2012). Em órgãos como fígado e tecido adiposo, marcadores inflamatórios são observados após semanas ou meses de exposição à dieta. Em contrapartida, logo após 24 horas de exposição à dieta hipercalórica, processos como gliose e produção de citocinas são observados no hipotálamo de ratos (Thaler et al., 2012). Ainda, observa-se que núcleos hipotalâmicos localizados próximos aos órgãos circunventriculares se tornam resistentes a leptina mais rapidamente, comparado a outros núcleos hipotalâmicos mais afastados destas áreas. Em seguida, os principais núcleos reguladores da homeostase energética se tornam insensíveis a leptina (Münzberg et al., 2004). Estes estudos sugerem que os mecanismos que induzem o controle da ingestão alimentar podem utilizar os órgãos circunventriculares como via de entrada para a indução da resistência a leptina e a regulação da homeostase energética. A glândula pineal é um órgão circunventricular e, portanto, também poderia ser alvo de mediadores inflamatórios produzidos via dieta hipercalórica.

No presente estudo, observamos que ratos alimentados por dieta hipercalórica apresentam aumento rápido no peso corporal. Além disso, observamos que após 7 dias de dieta hipercalórica, o conteúdo circulante de melatonina é reduzido. Outros estudos já demonstraram que na obesidade a síntese e secreção rítmica de melatonina está reduzida em humanos (Ostrowska et al., 1996, 2001) e que em modelos experimentais de obesidade pela exposição prolongada dos animais à dieta hipercalórica, também se observa redução na amplitude noturna da síntese de melatonina (Cano et al., 2008). Neste contexto, a redução na produção de melatonina poderia ser decorrente de um desarranjo cronobiológico (McHill et al., 2014) ou mesmo devido a hiperglicemia (Amaral et al., 2014). É interessante observar que a secreção noturna de melatonina também é reduzida em indivíduos com diabetes do tipo 1 (Kor et al., 2014) ou em modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina (Amaral et al., 2014). De fato, a produção adequada deste hormônio é fundamental para as ações da insulina no controle da homeostase energética (revisto por Cipolla-Neto et al., 2014). Em nosso estudo, o tempo que os animais foram expostos à dieta hipercalórica não é suficiente para induzir hiperglicemia (Thaler et al., 2012) e também não é suficiente para induzir a resistência a leptina (Münzberg et al., 2004). Portanto, trabalhamos com a hipótese de que a geração de mediadores inflamatórios seja o mecanismo para a regulação da síntese de melatonina na glândula pineal de ratos expostos à dieta hipercalórica, a exemplo do que ocorre no hipotálamo (Thaler et al., 2012). Considerando o aumento na migração de células de defesa para diversos tecidos metabólicos (revisto por Harford et al., 2011) ou na ativação de células gliais no SNC na obesidade

(Thaler et al., 2012), a ativação do eixo imune-pineal também deveria cursar em paralelo a progressão deste quadro.

No hipotálamo, o bloqueio do TLR4 reduz o quadro inflamatório sistêmico, restaura a resistência à leptina e insulina e melhora o quadro fisiopatológico (Milanski et al., 2009). Além disso, é sabido que a deleção global do TLR4 em camundongos impede a resistência à insulina induzida por dieta hipercalórica (Shi et al., 2006; Tsukumo et al., 2007). Atualmente acredita-se que ácidos graxos livres, fetuína A e outros DAMPs atuem via TLRs para ativar quinases responsáveis pela translocação nuclear do NF- $\kappa$ B em diferentes tecidos (Pal et al., 2012). Os ácidos graxos livres induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em via receptores do tipo *Toll*, de forma semelhante ao LPS derivado de bactérias gram-negativas (Shi et al., 2006; Kim, 2006; Kim et al., 2007; Fessler et al., 2009; Schaeffler et al., 2009). Além disso, a dieta hipercalórica é conhecida por induzir o aumento no conteúdo circulante de LPS, via mobilização da microbiota intestinal (revisto por Kelly et al., 2012). Neste sentido, o controle da produção de melatonina poderia ser direta, via atuação do LPS circulante com o receptor TLR4 expresso na glândula pineal (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010), ou poderia ser indireta via DAMPs.

Considerando o efeito inibitório da dieta sobre a produção de melatonina, em um segundo grupo experimental, observamos que a reposição noturna de melatonina na água de beber dos animais possui efeito protetor sobre o ganho de peso induzido pela dieta hipercalórica. Efeitos semelhantes já foram observados por outros autores (Ríos-Lugo et al., 2010),

embora nem todos os estudos tenham observado que os efeitos benéficos da melatonina ocorram de forma dependente da redução no ganho de peso induzido por dieta hipercalórica (Nduhirabandi et al., 2014). Já é determinado que a melatonina ativa seus receptores de membrana MT1/MT2 no hipotálamo para regular a homeostase energética (Faria et al., 2013) e que seus efeitos protetores na obesidade envolve a redução do estresse oxidativo (Atilgan et al., 2013), da adipogênese (de Luxán-Delgado et al., 2013), aumento do gasto energético (Terrón et al., 2013), a regulação do tecido adiposo branco em marrom (Jiménez-Aranda et al., 2013), a regulação da síntese de diversos hormônios, como adiponectina, insulina e leptina (Ríos-Lugo et al., 2010; revisto por Cipolla-Neto et al., 2014) e também a redução da produção de diversas citocinas inflamatórias (Mesri-Alamdari et al., 2014). Em conjunto, nossos resultados sugerem uma relação importante entre a regulação do conteúdo circulante de melatonina e a obesidade. O fato de a glândula pineal perceber sinais inflamatórios gerados pela obesidade permite ampliar o entendimento de mecanismos que regulam a homeostase energética e o ganho de peso corporal na vigência de um desalinhamento no sistema circadiano. Ainda, permite entender a pineal como um novo componente da resposta de defesa do organismo, já atua como sensor do estado de higidez para regular a produção circadiana de melatonina e modular a resposta imunológica.



# Conclusões

## VI. CONCLUSÕES

- 1) A glândula pineal de rato expressa 77 genes para receptores e efetores inflamatórios de forma constitutiva, sendo 70 desses, expressos de forma rítmica. A caracterização da expressão circadiana destes genes indica que a maioria possui expressão maior na fase de claro em relação à fase de escuro e que o conteúdo transcricional é regulado na transição claro/escuro por mecanismo que envolve o ritmo endógeno de glicocorticóides.
- 2) Pinealócitos expressam constitutivamente os receptores TLR2 e TLR6, bem como todas as subunidades da família NF- $\kappa$ B e os principais adaptadores da via de sinalização dos TLRs.
- 3) Ligantes dos receptores TLR1, TLR2 e TLR6 ativam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B em glândulas pineais de rato. Na presença de zimosan ou Pam3CSK4 há aumento da presença de homodímero p50/p50 e heterodímero p50/RelA.
- 4) A ativação dos receptores TLR1, TLR2 e TLR6 reduz a síntese de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais em cultura.
- 5) A dieta hipercalórica gera sinais inflamatórios que resultam em aumento no ganho de peso corporal e redução no conteúdo noturno circulante de melatonina em ratos no início do processo de obesidade.

- 6) Melatonina reduz o ganho de peso corporal induzido por dieta hipercalórica.

Os resultados apresentados nesta tese permitem concluir que a glândula pineal de ratos está equipada a reconhecer diferentes mediadores inflamatórios, como padrões moleculares associados à patógenos ou sinais de perigo. A via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, central nas respostas de montagem de processos inflamatórios, tem se revelado um fator essencial para a modulação da glândula pineal na montagem do processo inflamatório. Em conjunto, este trabalho pôde somar aos dados do grupo novas evidências que sugerem que a pineal é modulada pelo ritmo endógeno de glicocorticóides. Além disso, os dados obtidos na presente tese abrem uma nova perspectiva quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da função da glândula pineal durante a montagem da resposta inflamatória induzida por dieta hipercalórica e ainda, perspectivas para avaliação do sistema melatonérgico como alvo terapêutico na obesidade.

## VII. RESUMO

A glândula pineal regula diversos ritmos biológicos e respostas de defesa em indivíduos hígidos através da síntese noturna de melatonina. Por outro lado, é sabido que processos inflamatórios reduzem a produção deste hormônio na glândula pineal. Neste estudo utilizamos um arranjo de qPCR para investigar a expressão circadiana de 84 genes relacionados a sinalização via receptores do tipo *toll* e NF- $\kappa$ B em glândulas pineais de rato. Confirmamos ainda, a expressão de 14 proteínas em pinealócitos através de ensaios de imunocitoquímica. Nossos resultados indicam que 70 genes inflamatórios são expressos ritmicamente na glândula pineal de ratos, enquanto 7 não são expressos e outros 7 genes são expressos, mas sem ritmicidade. Grande parte dos genes examinados apresenta padrão de expressão circadiana com maior conteúdo transcricional na fase de claro, atingindo a máxima expressão no final desta fase. Após o apagar das luzes, a expressão destes genes é rapidamente reduzida. Um possível envolvimento do ritmo de glicocorticóides endógeno sobre o padrão dessa expressão gênica foi avaliado através do bloqueio de GR por mifepristona, o que induziu a regulação da expressão de 13 genes e redução do conteúdo plasmático de melatonina no ZT18. Ainda, avaliamos o efeito da ativação dos TLR1, TLR2 e TLR6 sobre a glândula pineal e observamos que zimosan e Pam3CSK4 ativam a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e bloqueia a síntese de melatonina induzida por noradrenalina *in vitro*. Por fim, utilizamos o modelo de obesidade induzido por dieta hipercalórica para avaliar se o processo inflamatório de baixa intensidade regula a síntese de melatonina *in vivo*. Observamos que nestas condições, a dieta hipercalórica induz rápido aumento no peso corporal e redução da produção noturna de melatonina. O efeito protetor da melatonina sobre o ganho de peso induzido por dieta foi testado através da restauração da melatonina na água de beber noturna de animais expostos à dieta. Em conjunto, nossos resultados indicam que genes inflamatórios são expressos ritmicamente na glândula pineal de ratos e influenciam a produção circadiana de melatonina via reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos ou sinais de perigo.

## VIII. ABSTRACT

The pineal gland regulates several circadian rhythms as well as immune responses in healthy animals via rhythmic production of melatonin, the hormone of darkness. On the other hand, nocturnal melatonin levels are reduced in the course of inflammation. To date, it remains to be clear the mechanisms by which the immune system affects pineal melatonin synthesis. Here we used a qPCR array profiler to investigate circadian gene expression of 84 genes related to Toll-Like Receptors and Nuclear Factor kappa B signaling. We also examined the expression of 14 proteins in pinealocytes by immunocytochemistry. Our results indicate rhythmic expression of 70 inflammatory genes, while 7 genes were not expressed and 7 were expressed without rhythmicity. The overall majority of genes tested showed a pattern of expression with a cumulative diurnal increase that peaks at the light phase of ZT12 followed by a fast reduction in the expression as soon as the light is turned off. The possible involvement of endogenous glucocorticoid rhythm in the modulation of pineal's inflammatory gene expression were tested by blocking Glucocorticoid Receptor (GR) using mifepristone. This procedure modulated the expression of 13 genes. In addition, the blockade of GR reduced the circulating melatonin levels at ZT18. The activation of TLR1, TLR2 and TLR6 induces the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B signaling and blocks noradrenaline-induced melatonin synthesis *in vitro*. In addition, high-fat diet feeding increases body weight and reduce the circulating melatonin levels at ZT18. The protective role of melatonin in diet-induced weight gain was also determined by giving these rats melatonin in their drinking water at night. Altogether, our results highlight that inflammatory genes are transiently expressed in the rat pineal gland and influences the daily fluctuation of melatonin synthesis.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL FG, TURATI AO, BARONE M et al., (2014). Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. *J Pineal Res.* **57**(1):67-79.
- ARAVALLI RN, PETERSON PK, LOKENSGARD JR. (2007) Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* **2**:297-312.
- ATILGAN D, PARLAKTAS BS, ULUOCAK N et al., (2013). Weight loss and melatonin reduce obesity-induced oxidative damage in rat testis. *Adv Urol.* **2013**:836121.
- BABA K, POZDEYEV N, MAZZONI F et al., (2009). Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**(35):15043-8.
- BARCHOWSKY A, FRLETA D, VINCENTI MP. (2000). Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts. *Cytokine.***12**:1469-79.
- BEINKE S, LEY SC. (2004). Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* **382**:393-409.
- BERTRAND PP, BERTRAND RL, CAMELLO PJ , POZO MJ. (2010). Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res;* **49**:23-34.
- BEUTLER B. (2009). Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev;* **227**:248-263.
- BHAKAR AL., TANNIS LL., ZEINDLER C., et al., (2002). Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neuroscience.* **22**:8466-8475.
- BONIZZI G., KARIN M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**:280-288.
- BORJIGIN J, DENG J, SUN X, et al., (2003). Diurnal pineal 3-O-sulphotransferase 2 expression controlled by beta-adrenergic repression. *J Biol Chem.* **278**(18):16315-9.
- BRENNAN TV, LIN L, HUANG X, et al., (2012) Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* **120**:2899-908.
- BUSTOS DM, BAILEY MJ, SUGDEN D et al., (2011). Global daily dynamics of the pineal transcriptome. *Cell Tissue Res.* **344**:1-11.
- CANO P, JIMÉNEZ-ORTEGA V, LARRAD A et al., (2008). Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine,* **33**:118-125.
- CARMODY R, RUAN Q, LIOU HC et al. (2007). Essential roles of c-REL in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J Immunol;* **178**:186-191.

- CARPENTIER PA, DUNCAN DS, MILLER SD. (2008). Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun*; **22**:140-147.
- CARRILLO-VICO A, LARDONE PJ, ALVAREZ-SANCHEZ N, (2013). Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*; **14**:8638-83
- CARRILLO-VICO A, LARDONE PJ, FERNANDEZ-SANTOS JM et al., (2004). Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab*; (**90**):992-1000.
- CARVALHO-SOUSA CE, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, TAMURA EK et al., (2011). Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor *Front endocrinol*, **2**:10.
- CAVALCANTI DM, LOTUFO CM, BORELLI P et al., (2007). Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*. **152**:1291-300.
- CECON E., FERNANDES PA., PINATO L., FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2010). Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*. **27**:52-67.
- CHASTE P, CLEMENT N, BOTROS HG et al., (2011) Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. *J Pineal Res*. **51**:394-9.
- CIPOLLA-NETO J, AMARAL FG, AFECHÉ SC et al., (2014). Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. **56**(4):371-81.
- COON SL., DEL OLMO E., YOUN WS 3rd., KLEIN DC. (2002). Melatonin synthesis enzyme in macaca mulatta: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC2.3.1.87). *J Clin endocrinol Metab*. **87**:4699-4706.
- Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D et al., (1996). Immunocytochemical localization of melatonin in the harderian gland of Syrian hamster. *Anat Rec*; (**245**):13-6.
- COVERT MW., LEUNG TH., GASTON JE., BALTIMORE D. (2005). Achieving stability of Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science*. **309**:1854-1857.
- CRAFT CM, MORGAN WW, JONES DJ et al., (1985) Hamster and rat pineal gland beta-adrenoceptor characterization with iodocyanopindolol and the effect of decreased catecholamine synthesis on the receptor. *J Pineal Res*. **2**:51-66.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, CARVALHO-SOUSA CE, TAMURA EK et al. (2010). TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res*, **49**:183-192.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, PINATO L, TAMURA EK et al. (2012). Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One*, e40142.

- DASU MR, DEVARAJ S, PARK S, et al., (2010) Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. **33**:861-8.
- DE KLOET ER, VREUGDENHIL E, OITZL MS et al., (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. **19**:269-301.
- DE LUXÁN-DELGADO B, CABALLERO B, POTES Y et al., (2013) Melatonin administration decreases adipogenesis in the liver of ob/ob mice through autophagy modulation. *J Pineal Res*. [no prelo].
- DE OLIVEIRA TATSCH-DIAS M, LEVANDOVSKI RM, CUSTÓDIO DE SOUZA IC, et al., (2013). The concept of the immune-pineal axis tested in patients undergoing an abdominal hysterectomy. *Neuroimmunomodulation*. **20**:205-12.
- DOBZANSKI P., RYSECK RP., BRAVO R. (1995). Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* **10**:1003-1007.
- DRJFHOUT WJ., VAN DER LINDE AG., KOOI SE., GROL CJ., WESTERINK BH. (1996). Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem*. **66**: 748-755.
- ELIAS CF, PUROHIT D. (2012). Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci*. **70**:841-62.
- ELKS CM E FRANCIS J, (2010). Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*, **12**:99-104.
- ETAÏN B, DUMAÏNE A, BELLIVIER F, et al., (2012). Genetic and functional abnormalities of the melatonin biosynthesis pathway in patients with bipolar disorder. *Hum Mol Genet*. **21**:4030-7.
- FARIA JA, KINOTE A, IGNACIO-SOUZA LM, et al., (2013) Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **305**:E230-42.
- FASSBENDER K, WALTER S, LANDMANN R, et al.,(2003). The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*; **8**:203-205.
- FERNANDES PA., BOTHOREL B., CLESSE D., et al., (2009). Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol*. **21**:90-97.
- FERNANDES PA., CECON E., MARKUS RP., FERREIRA ZS. (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 ZS., CIPOLLA-NETO J., MARKUS RP. (1994). Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol*. **112**:107-110.
- FERREIRA ZS., FERNANDES PA., DUMA D., et al., (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res*. **38**:182-188.



- FERREIRA ZS., GARCIA CR., SPRAY DC., MARKUS RP. (2003). P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocytes-induced extracellular acidification via calcium-dependent mechanism. *Pharmacology*. **69**:33-37.
- FESSLER MB, RUDEL LL, BROWN JM, (2009). Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*, **20**:379-385.
- FISCHER TW, SWEATMAN TW, SEMAK I, et al., (2006). Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J*; **20**:1564-6.
- FRANCO DG, MARKUS RP. (2014). The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture. *PLoS One*. **9**:e106332.
- FRIDMACHER V., KALTSCHMIDT B., GOUDEAU B., et al., (2003). Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci*. **23**: 9403-0408.
- GALECKI P, SZEMRAJ J, BARTOSZ G, et al., (2010). Single-nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin synthesis rate-limiting enzyme in recurrent depressive disorder. *J Pineal Res*. **48**:311-7.
- GAMBLE C, MCINTOSH K, SCOTT R et al., (2012) Inhibitory kappa B Kinases as targets for pharmacological regulation. *Br J Pharmacol*. **165**:802-19.
- GANGULY S., COON SL., KLEIN DC. (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res*. **309**:127-137.
- GHOSH S., HAYDEN MS. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol*. **8**:837-848.
- GOMEZ-CORVERA A, CERRILLO I, MOLINERO P, et al., (2009). Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. *J Pineal Res*. 47:15-22.
- GONZÁLEZ S, MORENO-DELGADO D, MORENO E et al., (2012). Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D4 receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol*. **10**:e1001347.
- GOODALL KJ, POON IK, PHIPPS S, et al., (2014) Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLoS One*. **9**:e109596.
- GRAHAM B., GIBSON SB. (2005). The two faces of NFkappaB in cell survival responses. *Cell Cycle*. **4**:1342-1345.
- GRILLI M., GOFFI F., MEMO M., SPANO P. (1996). Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem*. **271**: 15992-15007.
- GUAN Y, RAMOA DR, JIANG S et al. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 2010; 184:5094-5103.
- GUYENET SJ, NGUYEN HT, HWANG BH et al., (2013). High-fat diet feeding causes rapid, non-apoptotic cleavage of caspase-3 in astrocytes. *Brain Res*. **28**:97-105.

- HARFORD KA, REYNOLDS CM, MCGILLICUDDY FC et al., (2011). Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, **70**:408-417.
- HARMOUCH A., GUERRERO JM., OSUNA C. (1994). Different sensitivity of rat pineal N-acetyltransferase to alpha- and beta-adrenergic receptor agonists during development: in vitro studies. *Neurosci Lett*. **182**:303-305.
- HINZ M, SCHEIDEREIT C. (2014). The I $\kappa$ B kinase complex in NF- $\kappa$ B regulation and beyond. *EMBO*. **15**:46-61.
- HOFFMANN A., BALTIMORE D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*. **210**:171-186.
- HOFFMANN A., LEVCHENKO A., SCOTT ML., BALTIMORE D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. **298**:1241-1245.
- HUYTON T., ROSSJOHN J., WILCE M. (2007). Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle. *Immunol cell Biol*. **85**:406-410.
- IBGE. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009*. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010, 222p.
- ITOH MT, ISHIZUKA B, KUDO Y, FUSAMA S, et al., (1997). Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol*; (**136**):7-13.
- ITOH MT, ISHIZUKA B, KURIBAYASHI Y, et al., (1999). Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod*; (5):402-8.
- JIANG-SHIEH YF., WU., CHEIN HF., WEI TH., CHANG ML., SHIEH JY., WEN CY., (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.
- JIMÉNEZ-ARANDA A, FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ G, CAMPOS D et al., Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res*. **55**:416-23
- JONSSON L, LJUNGGREN E, BREMER A (2010). Mutation screening of melatonin-related genes in patients with autism spectrum disorders. *BMC Med Genomics*. **8**;3:10.
- KAGOYA Y, YOSHIMI A, KATAOKA K et al., (2014) Positive feedback between NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest*. **124**:528-42.
- KALSBECK A, VAN DER SPEK R, LEI J et al., (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol*.**349**:20-9.
- KALSBECK A., GARIDOU ML., PALM IF., VAN DER VLIET J., SIMONNEAUX V., PÉVET P., BUIJS RM. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci*. **12**: 3146-3154.

- KALSBECK A., PERREAU-LENZ S., BUIJS RM. (2006). A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int.* **23**: 521-535.
- KALTSCHMIDT B, WIDERA D, KALTSCHMIDT C. (2005). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta.* **30**(3):287-99.
- KALTSCHMIDT B., KALTSCHMIDT C. (2000). Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction. *Exp Brain Res.* **130**:100-104.
- KALTSCHMIDT B., WIDERA D., KALTSCHMIDT C. (2000). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochem Biophys Acta.* **1745**:287-299.
- KARASEK M., REITER RJ. (1992). Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* **21**:136-157.
- KARIN M., BEN-NERIAH Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol.* **18**:621-663.
- KAWAI T., AKIRA S. (2007). Signaling to NF-kappaB by toll-like receptors. *Trends Mol Med.* **13**:460-469.
- KAWASAKI T, KAWAI T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* **25**:461.
- KELLY CJ, COLGAN SP, FRANK DN. (2012). Of microbes and meals: the health consequences of dietary endotoxemia. *Nutr Clin Pract.* **27**:215-25.
- KIM F, PHAM M, LUTTREL I et al., (2007) Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Cir Res*, **100**:1589-1596.
- KIM JK, (2006). Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab*, **4**:417-419.
- KLEIN DC, BAILEY MJ, CARTER DA et al., (2010). Pineal function: impact of microarray analysis. *Mol Cell Endocrinol.* **314**:170-83.
- KONTUREK SJ, KONTUREK PC, BRZOZOWSKI T , BUBENIK GA. (2007). Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*; (58 Suppl 6):23-52
- KOR Y, GEYIKLI I, KESKIN M et al., (2014). Preliminary study: Evaluation of melatonin secretion in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* **18**:565-8.
- KUBERAN B, LECH M, BORJIGIN J et al., (2004). Light-induced 3-O-sulfotransferase expression alters pineal heparan sulfate fine structure. A surprising link to circadian rhythm. *J Biol Chem.* **279**:5053-4.
- KUMAR A., TAKADA Y., BORIEK AM., AGGARWAL BB. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* **82**:434-448.
- KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* **388**:621-625.
- KVETNOY IM. (1999) Extrpineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J*; 31:1-12.
- LIU HC., HSIA CY. (2003). Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays.* **25**:767-780.

- LISSEONI P, BARNI S, ARCHILI C et al., (1990). Endocrine effects of a 24-hour intravenous infusion of interleukin-2 in the immunotherapy of cancer. *Anticancer Res.* **10**:753-7.
- LIU SF., YE X., MALIK AB. (1999). Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation.* **100**:1330-1337.
- LOPES C., DELYRA JL., MARKUS RP., MARIANO M. (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res.* **23**:72-78.
- LOPES C., MARIANO M., MARKUS RP. (2001). Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res.* **50**:6-11.
- LOTUFO CM, LOPES C, DUBOCOVICH ML et al. (2001) Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*; **430**:351-357.
- LU YC., YEH WC., OHASHI PS. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* **42**:145-151.
- MALDONADO MD, MORA-SANTOS M, NAJI L, et al., (2010). Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells. Possible modulatory role on inflammation. *Pharmacol Res*; (**62**):282-7
- MARÇOLA M, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, FERNANDES PA ET AL., (2012). Tamura EK. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. *J Pineal Res.* **54**:162-9.
- MARKUS RP, CECON E , PIRES-LAPA MA. (2013). Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor kappaB (NF-kB) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci*; (**14**):10979-97.
- MARKUS RP, FERREIRA ZS, FERNANDES PA et al., (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*; **14**:126-33.
- MARSH B, STEVENS SL, PACKARD AE et al. Systemic Lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IFR3. *J Neuroscience* 2009; 29:9839-9849.
- MARSH BJ, STENZEL-POORE MP. Toll-like receptors: novel pharmacological targets for treatment of neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8:8-13.
- MARTINS E, JR., FERREIRA AC, SKORUPA AL, et al., (2004). Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J Leukoc Biol*; **75**:1116-21.
- MATSUGUCHI T, MASUDA A, SUGIMOTO K et al., (2003). JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *EMBO J.* **22**:4455-64.

- MCHILL AW, MELANSON EL, HIGGINS J et al., (2014). Impact of circadian misalignment on energy metabolism during simulated nightshift work. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [no prelo].
- MCKAY LI, CIDLOWSKI JA. (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol*. **12**:45-56.
- MCKAY LI, CIDLOWSKI JA. (2000). CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol Endocrinol*. **14**:1222-34.
- MELKE J, GOUBRAN BOTROS H, CHASTE P, et al., (2008) Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*. **13**:90-8.
- MESRI ALAMDARI N, MAHDAVI R, ROSHANRAVAN N, et al., (2014). A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial Related to the Effects of Melatonin on Oxidative Stress and Inflammatory Parameters of Obese Women. *Horm Metab Res*. [no prelo].
- MIKAMI F, LIM JH, ISHINAGA H et al., (2006). The transforming growth factor-beta-Smad3/4 signaling pathway acts as a positive regulator for TLR2 induction by bacteria via a dual mechanism involving functional cooperation with NF-kappaB and MAPK phosphatase 1-dependent negative cross-talk with p38 MAPK. *J Biol Chem*. **281**:22397-408.
- MILANSKI M, DEGASPERI G, COOPE A et al., (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*, **29**:359-370.
- MISHIMA K, TOZAWA T, SATOH K et al., (1999). Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry*. **45**:417-21.
- MØLLER m., BAERES FM. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*. **309**:139-150.
- MORTANI-BARBOSA EJ., FERREIRA ZS., MARKUS RP. (2000). Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol*. **401**:59-62.
- MUNDIGLER G., DELLE-KARTH G., KORENY Met al., (2002). Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. **30**:536-540.
- MÜNZBERG H, FLIER JS, BJØRBAEK C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. **145**:4880-9.
- MUXEL SM, PIRES-LAPA MA, MONTEIRO AW ET al., (2012). NF-κB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*. **12**:e52010.
- NDUHIRABANDI F, HUISAMEN B, STRIJDOM H et al., (2014). Short-term melatonin consumption protects the heart of obese rats independent of body weight change and visceral adiposity. *J Pineal Res*. **57**:317-32.

- NELSON DE., IHEKWABA AE., ELLIOTT M., JOHNSON JR., GIBNEY CA., FOREMAN BE., NELSON G., SEE V., HORTON CA., SPILLER DG., EDWARDS SW., MCDOWELL HP., UNITT JF., SULLIVAN E., GRIMLEY R., BENSON N., BROOMHEAD D., KELL DB., WHITE MR. (2004). Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*. **306**:704-708.
- O'NEILL LA., BOWIE AG. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. **7**: 353-364.
- O'NEILL LA., KALTSCHMIDT C. (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. **20**:252-258.
- OLOFSSON K., ALLING C., LUNDBERG D., MALMROS C. (2004). Abolished circadian rhythm of melatonin secretion in sedated and artificially ventilated intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand*. **48**:679-684.
- OSTROWSKA Z, KOS-KUDLA B, MAREK B et al., (2001). Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. *Neuro Endocrinol Lett*, **22**:121-127.
- OSTROWSKA Z, NUNTNER B, ZWIRSKA-KORCZALA K et al., (1996). Assessment of Beta-endorphin and melatonin circadian rhythms in normotensive obese women of Reproductive age. *Endocr Regul*, **30**:133-134.
- PAL D, DASGUPTA S, KUNDU R et al., (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Medicine*, **18**:1279-1288.
- PANGERL B., PANGERL A., REITER RJ. (1990). Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect*. **81**:17-29.
- PARFITT A., WELLER JL., KLEIN DC. (1976). Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. *Neuropharmacology*. **15**:353-358.
- PERRAS B., KUROWSKI V., DODT C. (2006). Nocturnal melatonin concentration is correlated with illness severity in patients with septic disease. *Intensive Care Med*. **32**:624-625.
- PINATO L, DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, FRANCO DG, et al., (2013). Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct*. [no prelo].
- PIRES-LAPA MA, TAMURA EK, SALUSTIANO EM et al., (2013) Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res*. **55**:240-6.
- PONTES GN., CARDOSO EC., CARNEIRO-SAMPAIO MM., MARKUS RP. (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 GN., CARDOSO EC., CARNEIRO-SAMPAIO MM., MARKUS RP. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*. **43**:365-371.

- PROVENCIO I., RODRIGUEZ IR., JUANG G., HAYES WP., MOREIRA EF., ROLLAG MD. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* **20**:600-605.
- RAIKHLIN NT , KVETNOY IM. (1976). Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem*; (55):19-24
- RASMUSSEN DD, MITTON DR, LARSEN S et al., (2001). Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res.* **31**:89-94.
- RÍOS-LUGO MJ, CANO P, JIMÉNEZ-ORTEGA V et al., (2010). Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J Pineal Res.***49**:342-8.
- RUDEEN PK, CREIGHTON JA, BYLUND DB (1990). Effects of light and an alpha-2-adrenergic agonist on serotonin N-acetyltransferase activity in chick pineal gland. *J Neural Transm Gen Sect.* **82**:119-29.
- RULAND J., MAK TW. (2003). Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev.* **193**:93-100.
- SAGRILLO-FAGUNDES L, SOLIMAN A , VAILLANCOURT C. (2014). Maternal and placental melatonin: actions and implication for successful pregnancies. *Minerva Ginecol*; **66**:251-66.
- SAITOH SI, MIYAKE K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev* 2009; 227:32-43.
- SANCHEZ-HIDALGO M, DE LA LASTRA CA, CARRASCOSA-SALMORAL MP et al., (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*; **(44)**:328-34.
- SCHAEFFLER A, GROSS P, BUETTNER R et al., (2009). Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology.* **126**:233-45.
- SHI H, KOKOEVA MV, INOUE K et al., (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest,* **116**:3015-3025.
- SIMONNEAUX V., RIBELAYGA C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* **55**:325-395.
- SKWARLO-SONTA K, MAJEWSKI P, MARKOWSKA M et al., (2003). Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol.* **81**:342-9.
- SKWARŁO-SOŃTA K. (1996). Functional connections between the pineal gland and immune system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* **56**: 341-57.
- SORIA V, MARTÍNEZ-AMORÓS E, ESCARAMÍS G, et al., (2010). Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. *J Pineal Res.* **49**:35-44.

- STEFULJ J, HORTNER M, GHOSH M, et al., (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*; **30**:243-7
- SU J, ZHANG T, TYSON J, LI L. The Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase M Selectively Inhibits the Alternative, Instead of the Classical NF $\kappa$ B Pathway. *J Innate Immun* 2009; 1:164-174.
- SUN SC., LEY SC. (2008). New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol.* **29**:469-478.
- SZATHMARI A, JOUVET A, MOTTOLESE C et al., (2014). Anatomical, molecular and pathological consideration of the circumventricular organs. *Neurochirurgie*. [no prelo].
- Tamura EK, Fernandes PA, Marcola M, Da et al., (2010). Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. *PLoS One*; (5):e13958.
- TAMURA EK., CECON E., MONTEIRO AW., SILVA CL., MARKUS RP. (2009). Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res.* **46**:268-274.
- TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP, 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.
- TECLEMARIAM-MESBAH R., TER HORST GJ., POSTEMA F., WORTEL J., BUIJS RM. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol.* **406**:171-182.
- TERRÓN MP, DELGADO-ADÁMEZ J, PARIENTE JA et al., (2013). Melatonin reduces body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats. *Physiol Behav.* **118**:8-13.
- THALER JP, GUYENET SJ, DORFMAN MD et al., (2013). Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes.* **62**:2629-34.
- THALER JP, YI CX, SCHUR EA et al., (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* **122**:153-62.
- TIJMES M, PEDRAZA R , VALLADARES L. (1996). Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*; **61**:65-8.
- TOMA C, ROSSI M, SOUSA I et al., (2007) Is ASMT a susceptibility gene for autism spectrum disorders? A replication study in European populations. *Mol Psychiatry.* **12**:977-9.
- TRICOIRE H., MØLLER M., CHEMINEAU P., MALPAUX B. (2003). Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl.* **61**:311-321.
- TROTTA T, PORRO C, CALVELLO R et al., (2014). Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol.* **268**:1-12.
- TSAI SY., MCNULTY JA. (1999). Interleukin-1beta expression in the pineal gland of the rat. *J Pineal Res.* **27**:42-48.



- TSAI SY., O'BRIEN TE., MCNULTY JA. (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 SY., SCHLUNS KS., LE PT., MCNULTY JA. (2001a). TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. *Histol Histopathol.* **16**:1135-1141.
- TSUKUMO DM, CARVALHO-FILHO MA, CARVALHEIRA JB et al., (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* **56**:1986-98.
- VALLABHAPURAPU S., KARIN M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* **27**:693-733.
- VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F et al., (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**:Research0034.
- VAUGHAN GM, LASKO J, COGGINS SH, et al., (1986). Rhythmic melatonin response of the Syrian hamster pineal gland to norepinephrine in vitro and in vivo. *J Pineal Res.* **3**:235-49.
- WAN F., LENARDO MJ. (2010). The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res.* **20**:24-33.
- WANG X, GE A, CHENG M, GUO F et al., (2012). Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. *Exp Diabetes Res.* **2012**:847246.
- WERNER SL., BARKEN D., HOFFMANN A. (2005). Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science.* **309**:1857-1861.
- WIDÉN C, GUSTAFSSON JA, WIKSTRÖM AC (2003). Cytosolic glucocorticoid receptor interaction with nuclear factor-kappa B proteins in rat liver cells. *Biochem J.* **373**:211-20.
- WITHYACHUMNARNKUL B., NONAKA KO., ATTIA AM., REITER RJ (1990). Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J Pineal Res.* **8**:313-322.
- WITHYACHUMNARNKUL B., REITER RJ., LERCHL A., NONAKA KO., STOKKAN KA. (1991). Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int J Biochem.* **23**:1397-1401.
- WONG ET., TERGAONKAR V. (2009). Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond).* **116**:451-465.
- WURTMAN RJ., AXELROD J., SEDVALL G., MOORE RY. (1967). Photic and neural control of the 24-hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* **157**:487-492.

- XU H, BARNES GT, YANG Q et al., (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 2003, **112**:1821-1830.
- YILMAZ ZB., WEIH DS., SIVAKUMAR V., WEIH F. (2003). RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J*. **22**:121-130.
- ZAWILSKA JB., SKENE DJ., ARENDT J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep*. **61**:383-410.
- ZHANG Z, SCHLUESENER HJ. Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:2901-2907.
- ZHENG W, COLE PA. (2002). Serotonin N-acetyltransferase: mechanism and inhibition. *Curr Med Chem*. **9**:1187-99.

## XX. SÚMULA CURRICULAR

**Nome:** Sanseray da Silveira Cruz Machado

**Data de Nascimento:** 29 de maio de 1984

**Local de Nascimento:** Feira de Santana/BA

**Endereço eletrônico:** sanseray@usp.br

### Formação Acadêmica/Titulação

**2010 – 2014** Doutorado em Ciências (Area Fisiologia).

Universidade de São Paulo – USP

Título da tese: *Caracterização dos receptores tipo toll em glândulas pineais de rato e sua implicação no entendimento do eixo imune-pineal.*

Orientador: Regina Pekelmann Markus

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2010/16536-4

**2012 – 2013** Doutorado Sanduíche

University of Michigan

Co-Orientador: Carol Fuzetii Elias

Projeto: *Caracterização do papel do receptor TLR4 sobre a produção extra-pineal de melatonina e a infertilidade em camundongos obesos*

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP BEPE, processo n° 2012/51101-3

**2011 – 2012** Doutorado Sanduíche

University of Texas Southwestern Medical Center

Co-Orientador: Carol Fuzetii Elias

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2010/51101-3

**2008 – 2010** Mestrado em Ciências (área Fisiologia).

Universidade de São Paulo – USP

Título da dissertação: *Caracterização do Eixo Imune-Pineal: Glândula Pineal como alvo para Lipopolissacarídeo (LPS).*

Orientador: Regina Pekelmann Markus

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2007/06444-7, vigência entre 01/09/2009 a 31/05/2010; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES, vigência 01/06/2009 a 31/08/2009).

**2003 - 2007** Graduação em Fisioterapia.

Centro Universitário de Itajubá, UNIVERSITAS, Brasil

Título: *Uso do Princípio de Irradiação da Facilitação Neuromuscular Proprioceptiva (FNP) em Programas de Reabilitação.*

Orientador: Sidney Benedito da Silva

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. SOUSA CEC., **CRUZ-MACHADO SS**, TAMURA EK. (2008). Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. *Boletim do Centro da Biologia da Reprodução (UFJF)*. 26: 15-21.
2. **CRUZ-MACHADO SS**. (2010). Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-kB. *Revista da Biologia*. 4:40- 43
3. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S.**, SOUSA CEC., TAMURA EK., PINATO L., CECON E., FERNANDES PACM, FERREIRA ZS, AVELLAR MCW., MARKUS RP. (2010). TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland triggers NFkB pathway. *Journal of Pineal Research*, 49:183-192.

4. TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; MARÇOLA, M ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; MARKUS, RP (2010). Long-Lasting Priming of Endothelial Cells by Plasma Melatonin Levels. *Plos One*, v. 5, p. e13958, 2010.
5. CARVALHO-SOUSA, C. E. ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.**; TAMURA, E.K; FERNANDES, P.A.C.M; PINATO, L; MUXEL, S. M; CECON, E. MARKUS, R.P (2011). Molecular Basis for Defining the Pineal Gland and Pinealocytes as Targets for Tumor Necrosis Factor. *Frontiers in Endocrinology*, v. 2, p. 1-11,.
6. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S**, PINATO L, TAMURA EK et al. (2012). Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PloS One*, e40142.
7. MARÇOLA M, **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S**, FERNANDES PACM, MONTEIRO AWA, MARKUS RP, TAMURA EK. (2012). Endothelial cell adhesiveness is a functional of environmental lighting and melatonin level. *Journal of Pineal Research*. 54:162-9.
8. PINATO L, **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S**, FRANCO DG, CAMPOS LM, CECON E, FERNANDES PA, BITTENCOURT JC, MARKUS RP. (2013). Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain, Structure and Function*, (no prelo).

### **Prêmios e títulos**

2013 – Travel Award para o Trabalho: **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; MARKUS, R.P ; ELIAS, C. F. . Gene expression profile of inflammatory mediators in the testis of infertile obese mice. In: 12th Congress of the International Society for Reproductive Immunology., 2013, Boston. 12th Congress of the International Society for Reproductive Immunology., 2013.

2011 - Menção Honrosa pelo Pôster: **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; TAMURA, E.K. ; PINATO, L. ; MARKUS, R.P . Evaluation of Toll-Like Receptors signaling in the rat pineal gland: regulatory network for modulating melatonin synthesis.. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro, RJ. Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011

2011 - Menção honrosa pelo Poster: **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; CARVALHO-SOUSA, C. E. ; PINATO, L. ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; MARKUS, R.P . Why to consider the Pineal Gland a sensor and player in the inflammation responses?. In: Third International Neuroendocrine Federation Summer School in Neuroendocrinology, 2011, Ribeirão Preto. Anais do Third International Neuroendocrine Federation Summer School in Neuroendocrinology, 2011.

2011 – Travel Award For Outstanding Research in the field of Melatonin pelo trabalho: **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S,** CARVALHO-SOUSA S, TAMURA EK, PINATO L, MARKUS RP. Microglia mediates LPS-induced TNF production through NFkB pathway: a paracrine modulation of melatonin synthesis? In: In: 2nd Summer FASEB Conference on Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics. Snowmass, Colorado, EUA. 26 de junho – 01 de julho 2011. Anais do 2nd Summer FASEB Conference on Melatonin Receptors: Actions and Therapeutics, 2011. (Pôster).

2010 – Menção Honrosa pelo Pôster: CARVALHO-SOUSA, C. E. ; **CRUZ-MACHADO, S.S** ; PINATO, L. ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; MARKUS, R.P . Pineal gland expresses TNFR1 in a constitutive and rhythmic manner. In: XV Meeting of

the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. Anais do XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.

2010 – Menção Honrosa pelo Pôster: **CRUZ-MACHADO, S.S** ; PINATO, L. ; CARVALHO-SOUSA, C. E. ; TAMURA, E.K. ; FERREIRA, Z.S ; MARKUS, R.P . Signaling transduction pathway involved in LPS-induced suppression of melatonin production by rat pineal gland. In: 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto. Anais do 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.

### **Resumos publicados em anais de eventos**

1. BORGES, B. C. ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; DING, J. ; SMITH, G. D. ; ELIAS, C. F. . Effects of Obesity in male mouse Fertility. In: 16th International Congress of Endocrinology, 2014, Chicago. 16th International Congress of Endocrinology, 2014.
2. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; MARKUS, R.P ; ELIAS, C. F. . Gene expression profile of inflammatory mediators in the testis of infertile obese mice. In: 12th Congress of the International Society for Reproductive Immunology., 2013, Boston. 12th Congress of the International Society for Reproductive Immunology., 2013.
3. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; TAMURA, E.K. ; CARVALHO-SOUSA, C. E. ; MARKUS, R.P . Toll-like receptors: a rhythmic repertoire for the control of melatonin output.. In: 3rd FASEB Science Research Conference Melatonin Biology: Actions and Therapeutics, 2013, Niagara Falls. 3rd FASEB Science Research Conference Melatonin Biology: Actions and Therapeutics, 2013.
4. MARKUS, R.P ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; Claudia Emanuele Carvalho-Sousa) ; TAMURA, E.K. ; PINATO, L. . Immune-Pineal Axis: How infection impairs the transduction of darkness to whole body by blocking nocturnal melatonin rise. In: Gordon Conference on Pineal Cell Biology,

2012, Galveston, TX. Anais da Gordon Conference on Pineal Cell Biology, 2012.

5. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; TAMURA, E.K. ; PINATO, L. ; MARKUS, R.P . Evaluation of Toll-Like Receptors signaling in the rat pineal gland: regulatory network for modulating melatonin synthesis.. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro, RJ. Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011.
6. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; CARVALHO-SOUSA, C. E. ; PINATO, L. ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; MARKUS, R.P . Why to consider the Pineal Gland a sensor and player in the inflammation responses?. In: Third International Neuroendocrine Federation Summer School in Neuroendocrinology, 2011, Ribeirão Preto. Anais do Third International Neuroendocrine Federation Summer School in Neuroendocrinology, 2011.
7. CARVALHO-SOUSA CE; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; FERNANDES, P.A.C.M ; TAMURA, E.K. ; MUXEL SM; CECON, E. ; MARKUS, R.P . Regulation of pineal gland melatonin synthesis by distinct NFkB dimers.. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro, RJ. Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011.
8. MARÇOLA, M ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; MARKUS, R.P . The role of TNF and melatonin in the priming of endothelial cells culture.. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro, RJ. Anais da XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2011.
9. PINATO, L. ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; FERNANDES, P.A.C.M ; ROCHA, V.A ; FERREIRA, Z.S ; MARKUS, R.P . Intracerebroventricular (ICV) lipopolysaccharide (LPS) imposes antagonistic changes in blood and brain melatonin content. In: Gordon Research Conference on Pineal Cell



Biology, 2010, Galveston, TX. Anais do Gordon Research Conference on Pineal Cell Biology 2010, 2010.

10. **CRUZ-MACHADO, S.S** ; PINATO, L. ; CARVALHO-SOUSA, C. E. ; TAMURA, E.K. ; FERREIRA, Z.S ; MARKUS, R.P . Signaling transduction pathway involved in LPS-induced suppression of melatonin production by rat pineal gland. In: 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto. Anais do 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.
11. CARVALHO-SOUSA, C. E. ; **CRUZ-MACHADO, S.S** ; FERNANDES, P.A.C.M ; TAMURA, E.K. ; PINATO, L. ; PETRILLI, C. L. ; MARKUS, R.P . Pineal gland is instrumented to be an integral player of innate immune response. In: 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto. Anais do 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.
12. **CRUZ-MACHADO, S.S** ; PINATO, L. ; CARVALHO-SOUSA, C. E. ; TAMURA, E.K. ; FERREIRA, Z.S ; MARKUS, R.P . Evidences for glia-pinealocytes interaction in cultured rat pineal gland. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. Anais do XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.
13. CARVALHO-SOUSA, C. E. ; **CRUZ-MACHADO, S.S** ; PINATO, L. ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; MARKUS, R.P . Pineal gland expresses TNFR1 in a constitutive and rhythmic manner. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. Anais do XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.
14. MARÇOLA, M ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; **CRUZ-MACHADO, S.S** ; MONTEIRO A.W.A ; MARKUS, R.P . Endothelial Cells (EC) from Lipopolysaccharide (LPS) treated rats maintain a high expression of adhesion molecules and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in culture. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. Anais do XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.

15. FERNANDES, P.A.C.M ; TAMURA, E.K. ; MARÇOLA, M ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; MARKUS, R.P . Melatonin as a player on the transition between the innate and acquired immune response. In: 26a Conferência da Sociedade Internacional de Cronobiologia, 2010, Vigo, Espanha. Anais da 26a Conferência da Sociedade Internacional de Cronobiologia, 2010.
16. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; FERREIRA, Z.S ; MARKUS, R.P . Characterization of Immune-Pineal Axis: Lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B translocation to nucleus and induces TNF production in rat pineal gland. In: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. Anais do 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009.
17. TAMURA, E.K. ; MARÇOLA, M ; FERNANDES, P.A.C.M ; MONTEIRO A.W.A ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; MARKUS, R.P . Melatonin inhibits preconditioning of cultured endothelial cells induced by lipopolysaccharide (LPS).. In: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. Anais do 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009.
18. MARKUS, R.P ; TAMURA, E.K. ; FERNANDES, P.A.C.M ; MARÇOLA, M ; MONTEIRO A.W.A ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** . Endothelial cells cultures are preconditioned by environmental lighting, melatonin and lipopolysaccharide treatment. In: XI Congress of the European Biological Rhythms Society, 2009, Strasbourg - France. Anais do XI Congress of the European Biological Rhythms Society, 2009.
19. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; CARDOSO, A.P ; SILVA, S.B . The Use of Irradiation Principle from Proprioceptive Neuromuscular Facilitation pattern (PNF) in Rehabilitation programs: A Review. In: V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista, 2007, São José dos Campos. Anais do V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista (CD-ROM), 2007.

20. CANTUÁRIA, A.T ; MIRANDA, C.T ; **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; REIS, B.H.J ; PEREIRA, V.S ; SILVA, S.B . Tratamento Fisioterapêutico das Disfunções Músculo-Esqueléticas de Pacientes Hemofílicos: Revisão da Literatura. In: V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do Cone Leste Paulista, 2007, São José dos Campos. Anais do V Congresso de Saúde e Qualidade de Vida do cone Leste Paulista (CD-ROM), 2007.
21. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; CORRÊA A. P.A ; MALAGÓ, R. ; VILELA, M.S.B ; VILELA, A. S. B. . Proposta de Avaliação dos Efeitos da Estimulação Elétrica Neuromuscular (EENM) no Metabolismo e Morfologia Muscular de Ratos Hiperglicêmicos Experimentais. In: I Congresso de Iniciação Científica de Itajubá, 2007, Itajubá. Proposta de Avaliação dos Efeitos da Estimulação Elétrica Neuromuscular (EENM) no Metabolismo e Morfologia Muscular de Ratos Hiperglicêmicos Experimentais, 2007. p. 19.
22. **DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.** ; SILVA, S.B . Proposta de Avaliação dos Efeitos da FNP Combinada com a EENM no Membro Inferior de Hamiparéticos Crônicos. In: VI Simpósio de Fisioterapia, 2006, Poços de Caldas. Anais eletrônicos do VI Simpósio de Fisioterapia da PUC-Minas, 2006.

## XI. ANEXO

### ***Aprovação do projeto em Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação (IB-USP)***



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/028/2010  
Ref. 2010.1.953.41.7

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB, em reunião realizada no dia 17/08/2010, **APROVOU** o Projeto "Caracterização dos receptores do tipo toll em glândulas pineais de rato e sua implicação no entendimento do eixo imune-pineal" – **Protocolo 115/2010**, de sua responsabilidade (Colaboradora: ~~Sanseray~~ Sanseray da Silveira Cruz Machado).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais  
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Prof. Dra. REGINA PEKELMANN MARKUS  
Departamento de Fisiologia do IBUSP.