Camila Lopes Petrilli

Regulação da atividade da glândula pineal
por estimulação purinérgica

São Paulo

2012

Camila Lopes Petrilli

Regulação da atividade da glândula pineal
por estimulação purinérgica

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

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Petrilli, Camila Lopes

Regulação da atividade da glândula pineal por estimulação purinérgica/ Camila Lopes Petrilli; orientadora Zulma F. S. Ferreira. São Paulo, 2012.

105 f.

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

1. Glândula Pineal. 2. Purinas. 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.

Orientadora

À minha família e amigos.

“Não importa aonde você parou...

Em que momento da vida você cansou...

O que importa é que sempre é possível e necessário ‘Recomeçar’.

Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...

É renovar as esperanças na vida e o mais importante...

Acreditar em você de novo.

Sofreu muito nesse período?

Foi aprendizado...

Chorou muito?

Foi limpeza da alma...

Ficou com raiva das pessoas?

Foi para perdoá-las um dia...

Sentiu-se só por diversas vezes?

É porque você fechou as portas até para os anjos...

Acreditou que tudo estava perdido?

Era o início da sua melhora...

Pois é...

Agora é hora de reiniciar...”

Carlos Drummond de Andrade

“Não devemos ter medo dos confrontos...

até os planetas se chocam e do caos nascem as estrelas.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

“Não me prendo a nada que me defina.

Sou companhia, mas posso ser solidão...

Tranquilidade e inconstância, pedra e coração.

Sou abraços, sorrisos, ânimo, bom humor, sarcasmo, preguiça e sono.

Música alta e silêncio.

Serei o que você quiser, mas só quando eu quiser.”

Clarice Lispector

Agradeço à Deus, pois sem Ele, nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional e dedicação nesta e em todas as etapas da minha vida.

À minha avó por ser meu exemplo enquanto trilho meu próprio caminho.

Aos meus tios, tias e primos pela presença constante, apoio e carinho especialmente nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de faculdade Biu, Gabi, Mô, Nati, Nati Mackenzie e Zé, por estarem sempre comigo (mesmo que de longe) e compreenderem (na maioria das vezes) a minha ausência, durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz na USP, Alex, Ceci, Nathi, Leopoldo, Bruno, Kelly, Nathali, Danilo (Presuntinho), por todos os cafés e cervejas que tomamos juntos, pelas conversas no corredor, por terem tornado mais feliz esta etapa da minha vida.

Agradeço à família LaboCrono: Adriessa, Alessandra, Cláudia, Daiane, Erika, Eliana, Marina, Luciana, Leila, Gabriela, Leticia, Eduardo, Pedro, Sanseray, Luis, Débora, Sandra, Edurardo (Mohamed), por terem sido sempre muito mais que colegas de trabalho, por terem compartilhado comigo experiências, conhecimento, alegrias, tristezas, por terem sido minha cabeça quando quem falou mais alto foi meu coração. Obrigada por tudo, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço ao Marco meu melhor amigo, companheiro, parceiro de todas as horas e namorado, por ter me aguentado e dividido comigo todos os momentos desta caminhada.

Agradeço à Dr^a Valerie Simonneaux do Laboratoire de Neurobiologie des Rhythms em Estrasburgo na França, pelo auxílio na realização de alguns ensaios.

Agradeço em especial à Prof^a Dr^a Regina Pekelmann Markus por ter aberto as portas do laboratório para mim, pela compreensão, por me surpreender, instigar e me ensinar a cada dia uma coisa nova.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Zulma, pela oportunidade, paciência, confiança, respeito e principalmente por todos os ensinamentos profissionais e pessoais ao longo destes anos.

Agradeço, por fim, o auxílio financeiro da FAPESP (2009/12307-8), CAPES e CNPq, cuja contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
1. Sistema Purinérgico.....	1
1.1 Perspectiva Histórica	1
1.2 ATP.....	2
1.3 Receptores Purinérgicos	6
1.3.1 Receptores P1	7
1.3.2 Receptores P2X.....	7
1.3.3 Receptores P2Y	9
2. Mecanismos moleculares de transdução de sinal de receptores purinérgicos.....	12
2.1 Proteína ativadora 1 (AP-1).....	12
2.2 Fator de transcrição nuclear kappa B(NF-κB)	13
3. Glândula Pineal	15
3.1 Morfologia e Inervação da Glândula Pineal	16
3.2 Vias metabólicas de síntese e degradação da melatonina	17
3.3 Controle da Síntese de Melatonina.....	21
3.4 Atividades Biológicas da Melatonina.....	23
3.5 Receptores Purinérgicos na Glândula Pineal.....	24
OBJETIVOS	30
MATERIAL E MÉTODOS	32

1. Animais	32
2. Drogas e Reagentes	32
3. Preparo de Drogas.....	34
4. Cultura de Glândula Pineal.....	35
5. Cultura de Pinealócitos	35
6. Dosagem de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	37
7. Dosagem radioimunológica de melatonina	37
8. Extração de proteína nuclear	38
9. Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA)	39
10. Ensaio de supershift	40
11. Extração de RNA	40
12. Síntese da fita de DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa.....	41
13. RT-PCR em tempo real.....	42
14. Ensaio de atividade enzimática da AA-NAT.....	43
15. Ensaio de atividade enzimática da HIOMT	44
16. Análise dos resultados	44
RESULTADOS.....	47
1. Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de NAS e melatonina induzidas por isoproterenol em glândulas pineais em cultura	47

2. Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de melatonina induzida por isoproterenol em pinealócitos	48
3. Mecanismo molecular envolvido na estimulação de receptores purinérgicos P2Y ₁ na glândula pineal.....	49
3.1 Proteína Ativadora 1 (AP-1).....	49
3.2 Fator de transcrição NF-κB.....	50
3.2.1 Decurso temporal.....	50
3.2.2 Estudo funcional - Efeito de PDTC sobre a produção de NAS e melatonina induzida por isoproterenol.....	52
4. Expressão gênica das enzimas AA-NAT e HIOMT na glândula pineal de ratos ...	53
5. Atividade enzimática das enzimas AA-NAT e HIOMT em pinealócitos isolados.	54
6. Efeito do antagonista seletivo A3'P-5'P sobre a produção de NAS e melatonina induzida por isoproterenol	55
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES	69
RESUMO	71
ABSTRACT	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
SÚMULA CURRICULAR.....	87
ANEXOS	90

Lista de Abreviaturas

α	alfa
β	beta
$[Ca^{2+}]_i$	concentração intracelular de Ca^{2+}
2-Cl-adenosina	2-cloroadenosina
2-ClATP	2-cloroATP
2MeSADP	2-metiltioADP
2MeSAMP	2-metiltio AMP
2MeSATP	2-metiltio ATP
5-HIAA	ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HIAL	5-hidroxi-indolacetaldeído
5-HL	5-hidroxitriptofol
5-HT	serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-MIAA	ácido 5-metoxi-indolacético
5-ML	metoxitriptofol
A2'P5'P	adenosina 2', 5'-bifosfato
A3'P5'P	adenosina 3', 5'-bifosfato
A3'P5'PS	adenosina 3'-fosfato-5'-fosfosulfato
AAAD	aminoácido aromático descarboxilase
AA-NAT	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
AC	adenilil ciclase
ADP	adenosina 5'difosfato

ADPβS	adenosina 5'-O-2-tiodifosfato
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
Akt	tirosina quinase e serina/treonina quinase
AMK	N ¹ -acetil-5-metoxiquinuramina
AMP	monofosfato de adenosina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AMP-PNP	adenosina paranitrofenilfosfato
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora 1
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BAPTA	1,2-bis (O-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-ácido tetraacético
bZIP	zíper de leucina básico
CaMKII	proteína quinase dependente de calmodulina tipo II
CAT	catalase
CRE	elementos responsivos a AMPc
CREB	proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc
CYP450	citocromo P450
DAG	dicilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucleico
EMSA	ensaio de eletromobilidade em gel
E-NPPs	ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDases	ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases
epm	erro padrão da média
EPPO	eosinilperoxidase

GMPc	guanosina monofosfato cíclico
HIOMT	enzima hidroxindol-O-metiltransferase
HRP	<i>horseradish</i> peroxidase
IB-MECA	N6-(3-iodo-benzil)-5'-(N-metilcarbamoil) adenosina
ICER	repressor induzido por AMPc
IDO	indolamina-2,3-dioxigenase
IKB	proteína inibitória kappa B
IKK	proteína quinase de IKB
IP₃	trifosfato de inositol
ISO	isoproterenol
IκB	proteína inibitória kappa B
MAOB	monoamina oxidase B
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MPO	mieloperoxidase
NAS	N-acetilserotonina
NECA	5'-N-etilcarboxamidoadenosina
NF-κB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NPY	neuropeptídeo Y
NSQs	núcleos supraquiasmáticos
NTPDase	nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDTC	pirrolidina ditiocarbamato
PKA	proteína quinase dependente de AMPc

PKC	proteína quinase dependente de cálcio
PLA	fosfolipase A
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PPADS	ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2', 4'-disulfônico
PVN	núcleo paraventricular
QR2	quinona redutase 2
RHD	domínio de homologia Rel
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
RNS	espécies reativas de nitrogênio
ROS	espécies reativas de oxigênio
R-PIA	(R)N6-fenilisopropiladenosina
STAT3	transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TAD	domínio de ativação de transcrição
TPH	triptofano-hidroxilase
TPOH	enzima triptofano hidroxilase
UDP	uridina-5'-difosfato
UTP	uridina-5'-trifosfato
μM e mM	micromolar e milimolar, respectivamente

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Sistema Purinérgico

1.1 Perspectiva Histórica

O termo sistema purinérgico refere-se à sinalização celular desencadeada por purinas e pirimidinas. Adenosina, adenosina 5'-difosfato (ADP) e adenosina 5'-trifosfato (ATP) são as moléculas conhecidas como purinas e, uridina-5'-trifosfato (UTP) e uridina-5'-difosfato (UDP) representam as pirimidinas. Uma vez liberados, estes nucleotídeos interagem com receptores purinérgicos específicos mediando diferentes eventos biológicos, tais como: neurotransmissão, contração do músculo liso, resposta imunológica, agregação plaquetária, entre outros (Burnstock, 2006).

O conceito de purinas como moléculas sinalizadoras extracelulares surgiu em 1929 com a demonstração realizada por Drury e Szent-Györgyi que o nucleosídeo adenosina e o nucleotídeo monofosfato de adenosina (AMP), extraídos do músculo cardíaco de roedores, podiam reduzir a contratilidade cardíaca, aumentar a dilatação arterial, reduzir a pressão sanguínea e inibir a contração intestinal. Em 1934, Gillespie foi o primeiro a apontar uma relação entre a atividade das purinas e sua estrutura, demonstrando que a desaminação reduzia grandemente sua atividade, e que a remoção dos grupamentos fosfatos da molécula influenciava, não apenas a potência, mas também o tipo de resposta, sendo que ATP induzia a um aumento da pressão sanguínea,

enquanto adenosina produzia hipotensão. Esta foi a primeira indicação de que adenosina e ATP atuavam de forma distinta, o que sugeria a existência de diferentes receptores para purinas. Contudo, a denominação “receptores purinérgicos” só foi formalmente reconhecida em 1978, quando Burnstock propôs a existência de duas classes de receptores denominadas P1, em que a adenosina é o ligante natural e, P2 que reconhecem principalmente ATP, ADP, UTP e UDP (para revisão Ralevic & Burnstock, 1998). Em 1985, Burnstock e Kennedy, tendo como base ensaios farmacológicos, estabeleceram a distinção entre dois tipos de receptores P2, denominados P2X e P2Y. Posteriormente, com base em suas estruturas moleculares e mecanismos de ação, a classificação dos receptores P2 foi consolidada em 1994 em uma importante revisão de autoria dos pesquisadores Abbracchio e Burnstock (para revisão Burnstock, 2007b).

1.2 ATP

O ATP é uma molécula de distribuição ubíqua no sistema nervoso central e periférico e fundamental à atividade celular. É composto de três fosfatos, um açúcar e um anel de adenina (Figura 1). A ligação entre os dois últimos grupos fosfato é uma ligação fraca e instável. Quando quebrada, o ATP é alterado para ADP e um fosfato, liberando energia para ser usado em reações celulares. ATP é uma molécula solúvel e, portanto, facilmente transportada. A maior parte das moléculas do ATP é sintetizada na mitocôndria e difunde-se para o citoplasma e para as membranas.

Figura 1. Representação estrutural do ATP. O ATP é composto de três fosfatos, um açúcar e um anel de adenina, quando a ligação entre os dois últimos grupos fosfato é quebrada, o ATP é convertido em ADP e um fosfato, liberando energia para ser usada no metabolismo celular.

Em condições metabólicas normais a concentração citoplasmática de ATP é 10 mmol/L. Este ATP citoplasmático é utilizado como fonte de energia em eventos celulares que envolvem, por exemplo, a Na^+/K^+ -ATPase, enzima responsável por manter o potencial de membrana em repouso; a Ca^{2+} -ATPase, responsável pela homeostase de Ca^{2+} no citoplasma; várias proteínas quinases envolvidas na transdução de sinal; H^+ -ATPase, presente na membrana da vesícula sináptica e responsável por acidificar o lúmen vesicular e gerar um gradiente de prótons necessário para a captação de neurotransmissores; eventos de exocitose propriamente ditos; dentre outras (Sperlagh & Vizi, 1996).

Além dos estoques citoplasmáticos e mitocondriais, o ATP está presente em todos os tipos de vesículas sinápticas nos terminais nervosos, podendo ser armazenado de forma isolada ou juntamente com outros neurotransmissores

como noradrenalina, acetilcolina e glutamato. Quando co-estocado com outros neurotransmissores o conteúdo vesicular de ATP é excedente em número de moléculas e, dependendo do tipo de vesícula, as proporções variam de 2:1 a 50:1, correspondendo a concentração de ATP a cerca de 1-200 mM dentro da vesícula (Sperlagh & Vizi, 1996).

A liberação de ATP de muitas células é uma resposta fisiológica ou fisiopatológica como estresse mecânico, hipóxia, trauma ou processos inflamatórios (Burnstock, 2006). Além das evidências da liberação de ATP por exocitose vesicular em células neuronais (Pankratov *et al.*, 2007), estudos também suportam a liberação vesicular de ATP em astrócitos (Bowser & Khakh, 2007) através da ação de lisossomos (Zhang *et al.*, 2007). Mecanismos adicionais da liberação de nucleotídeos incluem transportadores que ligam ATP, canais acoplados à conexina ou panexina, como, por exemplo, o P2X₇, um subtipo de receptor P2X ou canais de ânions dependentes de voltagem (Sabiroy & Okada, 2005; Scemes *et al.*, 2007).

Após a liberação, ATP e outros nucleotídeos sofrem rápida degradação enzimática, degradação esta, funcionalmente importante, uma vez que metabólitos do ATP atuam como ligantes fisiológicos em vários receptores purinérgicos (Zimmermann, 2006). Várias famílias de enzimas estão envolvidas na hidrólise de ATP liberado para o meio extracelular: (1) ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDases), das quais NTPDase 1, 2, 3 e 8 são extracelulares; (2) ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs); (3)

fosfatases alcalinas e (4) ecto-5'-nucleotidases. A enzima NTPDase1 hidrolisa ATP diretamente para AMP e UTP a UDP, enquanto a enzima NTPDase2 hidrolisa ATP a ADP. A enzima 5'-nucleotidase finaliza esta cascata ao hidrolisar o AMP a adenosina (Figura 2) (para revisão, Burnstock, 2006).

Figura 2. Representação esquemática do sistema purinérgico envolvendo ATP, enzimas de degradação e receptores. O ATP, liberado por exocitose vesicular do terminal nervoso simpático, atua como cotransmissor em receptores purinérgicos P2X e P2Y. ADP e adenosina são gerados através da atividade de ectonucleotidases ativando receptores P2Y e P1 específicos. A liberação de ATP pode também ser efetuada via canais na membrana celular evocando ações autócrinas ou parácrinas.

1.3 Receptores Purinérgicos

Na tabela 1 apresentamos um resumo das características farmacológicas e mecanismos de transdução dos receptores purinérgicos.

Tabela 1 – Características Farmacológicas e Mecanismos de Transdução dos Receptores Purinérgicos

	Receptor P1	Receptor P2		
Ligante endógeno	Adenosina	ATP ADP UTP UDP Dinucleotídeos de adenosina		
Subgrupo	A	P2X	P2Y	
Tipo de Receptor	Acoplados à proteína G: G_s , G_q , G_i , G_o	Canal iônico	Acoplados à proteína G: $G_{q/11}$, G_i , G_s	
Subtipos	A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3	$P2X_{1-7}$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$	
Efetores	IP_3 , Ca^{2+} , AMPc	$Ca^{2+} > Na^{+} > K^{+}$	$\uparrow IP_3$, $\uparrow Ca^{2+}$, $\uparrow DAG$ $\uparrow$, $\downarrow$ AMPc	
Agonistas	R-PIA CGS21680 IB-MECA NECA	Seletivo P2X α , β -mATP β , γ -mATP Bz-ATP	Não-seletivo $ATP\gamma S$ 2MeSATP A_p4A	Seletivo P2Y ADP 2MeSADP ADP βS UTP/UDP
Antagonistas	XAC, CSC, MRS 1067	Suramina, reativo azul. PPADS (receptor acoplado a PLC) A_3P_5P , A_2P_5P , A_3P_5PS ($P2Y_1$), 2MeSAMP ($P2Y_{12}$)		

Abreviaturas: R-PIA - (R)N6-fenilisopropiladenosina; CGS21680 - 2-p-(2-Carboxietil) fenetilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina; IB-MECA - N6-(3-iodo-benzil)-5'-(N-metilcarbamoil) adenosina; NECA - 5'-N-etilcarboxamidoadenosina; XAC - Congênero amino xantina; CSC - 8-(3-clorostiril) cafeína; MRS 1067 - 3,6-dichoro-2'-isopropiloxi-4'-metilflavona; α , β -mATP - α , β -metileno adenosina 5-trifosfato; β , γ -mATP - β , γ -metileno adenosina 5-trifosfato; Bz-ATP - benzoil ATP 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosina 5-trifosfato; $ATP\gamma S$ - adenosina 5'-O-(3-tio) trifosfato; 2MeSATP - 2-metil(tio) adenosine- 5'- O- trifosfato; A_p4A - diadenosinetetrafosfato; ADP - adenosina 5'difosfato; 2MeSADP - 2-metil(tio) adenosina 5'difosfato; ADP βS - adenosina 5'-O-(2-tiodifosfato); UTP - uridina-5'-trifosfato; UDP - uridina-5'-difosfato; PPADS - ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2', 4'-disulfônico; A_3P_5P - adenosina 3', 5'-bifosfato; A_2P_5P - adenosina 2', 5'-bifosfato; A_3P_5PS - adenosina 3'-fosfato-5'-fosfosulfato; 2MeSAMP - 2 metil(tio) monofosfato de adenosina.

1.3.1 Receptores P1

Os receptores P1 são receptores metabotrópicos, acoplados à proteína G, cujo ligante endógeno é a adenosina. Quatro diferentes subtipos de receptores P1 foram clonados e caracterizados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ e, como todos os representantes da superfamília dos receptores acoplados a proteína G, estes apresentam 7 segmentos transmembrânicos, o terminal amino voltado para o meio extracelular e o terminal carboxil para o meio intracelular (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock 2007b). Estes diferentes subtipos se diferenciam pelo tipo de proteína G a que estão acoplados e pela transdução de sinais que desencadeiam, sendo A₁ e A₃ ligados à proteína inibitória G_{i/o} e A_{2A} e A_{2B} ligados à proteína estimulatória G_s (Fredholm *et al.*, 2001). Quando ativados, os receptores A₁ e A₃ inibem a adenilil ciclase (AC), levando a uma diminuição no monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), por uma via que envolve a ativação da enzima fosfolipase C (PLC). Os receptores A_{2A} e A_{2B} por sua vez, levam a uma ativação da AC, aumentando a concentração intracelular de AMPc (Abbracchio *et al.*, 1995; Fredholm *et al.*, 2001).

1.3.2 Receptores P2X

Os receptores P2X são proteínas de membrana que formam canais iônicos na bicamada lipídica da membrana celular. Em resposta a agonistas, estes canais permitem a passagem rápida, não-seletiva, de cátions de acordo com a

seguinte permeabilidade iônica: $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+ > \text{K}^+$. Dessa forma, a principal via de sinalização ativada por esses receptores é o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que leva à despolarização da membrana e à ativação de diversas quinases intracelulares como proteína quinase dependente de cálcio (PKC), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina tipo II (CaMKII) conferindo, à ativação de receptores P2X, eventos intracelulares complexos (Köles *et al.*, 2008).

Os receptores P2X são conjuntos homoméricos ou heteroméricos de três subunidades protéicas. Até o momento, foram clonados sete subtipos de receptores P2X (P2X_{1-7}). Considerando que muitos desses receptores são expressos na mesma célula, a formação de receptores heterotriméricos pode produzir um grande número de complexo de receptores com características farmacológicas e funcionais diferenciadas (Ralevic & Burnstock, 1998; Roberts *et al.*, 2006).

A plasticidade funcional destes receptores pode ser também observada através de sua interação com várias macromoléculas que podem modificar a localização, o tráfego e a expressão destes receptores na membrana celular além de regular sua ativação, cinética de dessensibilização e seletividade iônica (Köles *et al.*, 2008).

1.3.3 Receptores P2Y

Assim como os receptores P1, os receptores P2Y pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, e acoplam-se com proteínas G dos tipos $G_{q/11}$, G_s e G_i . Estruturalmente apresentam sete domínios transmembrânicos, domínio amino-terminal constituído de diversos sítios de glicosilação e domínio carboxi-terminal intracelular com diversos sítios de ligação/fosforilação para proteínas quinases. Alguns resíduos positivamente carregados nos domínios 3, 6 e 7 são cruciais para ativação do receptor por agonistas (Abbracchio *et al.*, 2006).

Até o momento foram clonados em mamíferos oito subtipos de receptores P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}). Estes números indicam a ordem cronológica em que foram clonados. Os números que faltam representam receptores que não ocorrem em mamíferos como o receptor p2y₃ de aves, o receptor tp2y, encontrado em peru e o receptor p2y₈, expresso na placa neural de *Xenopus laevis* ou receptores que possuem certo grau de identidade com os receptores P2Y, mas que não respondem a nucleotídeos (p2y₅, p2y₇, p2y₉, p2y₁₀ e p2y₁₅) como o receptor inicialmente denominado p2y₇ que atua como um receptor para leucotrieno B₄, mas não para nucleotídeos (para revisão Abbracchio *et al.*, 2006).

Segundo a divisão farmacológica proposta por Abbracchio e colaboradores (2006), os receptores P2Y podem ser subdivididos em: (I) receptores que respondem preferencialmente aos nucleotídeos de adenina, ATP

e ADP, incluindo os receptores P2Y₁, ₁₁, ₁₂, ₁₃; (II) receptores que respondem preferencialmente aos nucleotídeos de uracila, UTP ou UDP, P2Y₄ e P2Y₆ em humanos; (III) receptores de seletividade mista, que respondem igualmente ao ATP e ao UTP, P2Y₂; e (IV) receptores que respondem apenas a compostos de uracila difosfato com açúcares (UDP-glicose e UDP-galactose), como P2Y₁₄.

Classicamente, os antagonistas mostram o seguinte perfil: suramina antagoniza a maior parte dos receptores P2Y com exceção do receptor P2Y₄; PPADS (ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2', 4'-disulfônico) é um potente antagonista apenas de receptores P2Y₁; reativo azul 2 não é efetivo no bloqueio de receptores P2Y₂ (tabela 1) (von Kugelgen, 2006).

No mecanismo de transdução, os receptores P2Y₁, ₂, ₄, ₆, ₁₁ acoplados a proteína G_{q/11} estimulam a enzima PLC, e levam à formação de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), com subsequente mobilização de [Ca²⁺]_i; o receptor P2Y₁₁, acoplado à proteína G_{i/0}, estimula a enzima AC aumentando os níveis de AMPc, enquanto os receptores P2Y₁₂, ₁₃, ₁₄, por acoplamento à proteína G_{i/0}, inibem a atividade desta enzima. Os receptores P2Y podem ainda ativar fosfolipase A (PLA), fosfolipase D (PLD), MAPK, tirosina quinase e serina/treonina quinase (Akt) (revisto por Franke & Illes, 2006).

Portanto, as respostas funcionais decorrentes da ativação de receptores purinérgicos podem ser reguladas por uma série de vias de mensageiros intracelulares (Figura 3). Alterações na translocação de fatores de transcrição como AP-1 (proteína ativadora 1), NF-κB (fator nuclear kappa B), CREB

(proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc) e STAT3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) têm sido descritas (Burnstock, 2007a).

Figura 3. Representação esquemática dos mecanismos de sinalização purinérgica.

Nucleotídeos e nucleosídeos se ligam a receptores P1 e P2Y acoplados a enzimas efetoras de transdução de sinal. A ativação destas enzimas leva à geração de segundos mensageiros ou a estimulação de proteínas quinases que regulam a expressão de genes alvo. As respostas funcionais, portanto, podem ser reguladas por uma série de vias de segundos mensageiros, como por exemplo, via de ativação de adenilil ciclase (AC), fosfolipase C (PLC), fosfolipase A (PLA), fosfolipase D (PLD), estimulando monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), Ca^{2+} , diacilglicerol (DAG), trifosfato de inositol (IP_3) e óxido nítrico (NO), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína quinase dependente de cálcio (PKC), quinase serina/treonina (Akt) e proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK). Alterações na translocação de fatores de transcrição como AP-1, NF- κ B, CREB e STAT3 têm sido descritas. A ativação de receptores P2X com subsequente aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode resultar também na ativação das diversas quinases citadas (adaptada de Burnstock, 2007a).

2. Mecanismos moleculares de transdução de sinal de receptores purinérgicos

2.1 Proteína ativadora 1 (AP-1)

A proteína ativadora 1 (AP-1) é um complexo dimérico formado por moléculas das famílias Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2). Os genes da família Jun são proto-oncogenes de resposta primária, induzidos por estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios e outros mitógenos que, quando expressos, codificam para proteínas nucleares com atividade de fatores de transcrição (Ryseck *et al.*, 1988). Tais genes, juntamente com a família dos genes Fos codificam fosfoproteínas nucleares, que se associam e formam o fator de transcrição AP-1.

Estas proteínas têm em comum um domínio rico em resíduos de leucinas essencial para a dimerização e ligação com o DNA, composto por sete aminoácidos que formam homodímeros jun-jun ou heterodímeros fos-jun, na forma de α -hélices, denominados “zíper de leucina básico”(bZIP). O complexo AP-1 regula a transcrição de genes alvos, positiva ou negativamente, dependendo da composição dos dímeros (Angel & Karin, 1991; Sassone-Corsi *et al.*, 1988).

Na glândula pineal de ratos o fator de transcrição AP-1 exibe um ritmo de atividade *in vivo* temporalmente correlacionado com o ritmo de produção de melatonina, sendo a atividade noturna do AP-1 cinco vezes maior que a encontrada na fase de claro. Este padrão de ativação tem sido também

demonstrado em glândulas pineais em cultura estimuladas por noradrenalina, onde o acúmulo das proteínas JunB e cFos tem sido demonstrado em extratos nucleares de pineais após estimulação tanto *in vitro* como *in vivo* (Carter, 1994).

2.2 Fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB)

O fator de transcrição NF-κB (do inglês, *nuclear factor kappa B*) é composto por uma família de proteínas que possuem em comum uma sequência de 300 aminoácidos denominada de domínio de homologia Rel (RHD, do inglês, *Rel homology domain*). Estas regulam a expressão de uma grande variedade de genes, sendo uma via central na resposta imunológica inata e adaptativa. Atualmente, fazem parte da família Rel cinco subunidades que apresentam-se como homo ou heterodímeros: p50 e p52 (p50 gerada através da clivagem de p105, e p52 a partir da proteína p100), que não possuem um domínio de ativação de transcrição (TAD, do inglês, *transcription activation domain*), sendo então, responsáveis pela inibição da transcrição de um gene; e Rel A (ou p65), Rel B e c-Rel, que possuem este domínio e podem atuar positivamente sobre a transcrição gênica (Hayden & Ghosh, 2008).

Quando inativos, os dímeros encontram-se no citoplasma associados a uma família de proteínas inibitórias, IκB, que mantém o dímero do NF-κB sequestrado no citoplasma, impedindo sua translocação ao núcleo e sua associação com o DNA (Hayden & Ghosh, 2008). Estímulos diversos induzem a ativação de proteínas quinase de IκB (IKKs), que são quinases responsáveis por

fosforilar as moléculas de I κ B e fazer com que estas sejam degradadas via proteassoma, permitindo a translocação nuclear do dímero NF- κ B (Verma *et al.*, 1995; Hayden & Gosh, 2008).

A translocação nuclear de NF- κ B pode ser funcionalmente avaliada através da utilização de ferramentas farmacológicas como pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), composto que impede a ligação do NF- κ B às regiões promotoras do gene após a entrada no núcleo celular inativando-o (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993; Wolchok *et al.*, 1994; De Plaen *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008).

Trabalhos de nosso grupo têm demonstrado o envolvimento da via NF- κ B na síntese de melatonina pela glândula pineal de ratos. A glândula pineal apresenta uma expressão constitutiva de dímeros p50/p50 de NF- κ B com um ritmo de translocação nuclear, inverso ao da melatonina. Desta forma, durante a fase de claro, os níveis constitutivos de NF- κ B são crescentes, sofrendo uma queda brusca no início da fase de escuro (Cecon *et al.*, 2010). Uma vez que p50/p50 não possui o domínio de transativação (Hayden & Ghosh, 2008), ele atua como repressor da transcrição gênica o que explica seus baixos níveis durante a noite, permitindo a produção de melatonina. De fato, a inibição do NF- κ B constitutivo potencia a síntese de melatonina induzida por noradrenalina em pineais em cultura (Ferreira *et al.*, 2005). Contudo, em pineais de ratos em cultura por 48 horas a presença dos dímeros de NF- κ B p50/p50 e

p50/RelA foi encontrada, revelando o estado de ativação celular induzido pela manipulação experimental (Carvalho-Sousa *et al.*, 2011).

3. Glândula Pineal

A identificação da glândula pineal como um órgão distinto do cérebro remonta aos séculos III e IV aC. Galeno de Pérgamo (130-200 DC) parece ter sido o primeiro a descrever a localização da pineal, no cérebro humano, caracterizando-a como uma glândula (análoga aos gânglios linfáticos), e nomeando-a *konareion* (*conarium* em Latim) por sua forma de pinha. O órgão foi posteriormente denominado *glândula pinealis*, daí glândula pineal. Várias foram as interpretações do seu papel funcional, que incluem desde um esfíncter controlador do fluxo do “espírito animal” até a interpretação de René Descartes (1596–1650) de “sede da alma” ou como o órgão de coordenação das funções psicofisiológicas do organismo (Arendt, 1995).

Presente em todos os vertebrados, a glândula pineal é um órgão neuroendócrino cuja produção hormonal é classicamente controlada pelo ciclo de iluminação ambiental característico do dia e da noite. Esse controle é tal que, na enorme maioria das espécies estudadas (seja de atividade diurna, noturna ou crepuscular), a produção de melatonina, hormônio produzido e liberado por esta glândula, é exclusivamente noturna e a magnitude e duração de sua concentração plasmática está na estrita dependência da duração da fase de

escuro. Dessa forma, esta característica de produção noturna da melatonina é fator decisivo para que o organismo possa prever e se adaptar às variações diárias e sazonais (para revisão Simmoneaux & Ribelayga, 2003).

3.1 Morfologia e Inervação da Glândula Pineal

O parênquima da pineal é constituído de diferentes tipos celulares. O tipo celular mais abundante é o pinealócito, célula produtora de melatonina. Outros tipos celulares incluem astrócitos, de localização proximal ao pedúnculo pineal e micróglia, difusamente distribuída por todo o parênquima da glândula (Møeller & Baeres, 2002; Carvalho-Sousa *et al.*, 2011; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2012).

A glândula pineal de mamíferos é inervada por fibras de várias origens, sendo que a principal via reguladora do ritmo de produção de melatonina é uma via multissináptica que se inicia na retina. As informações fóticas captadas pela retina através do fotopigmento melanopsina chegam aos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), uma das estruturas anatômicas mais importantes na geração e manutenção de ritmos circadianos em mamíferos, via fibras retino-hipotalâmicas e, a partir daí, são transmitidas para a área retro-quiasmática do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que se projeta direta ou indiretamente, sobre a coluna intermediolateral da medula espinal (Provêncio *et al.*, 2000). Esta, por sua vez, projeta-se sobre o gânglio cervical superior de onde partem fibras simpáticas que inervam a pineal (Klein & Moore, 1979). O

principal neurotransmissor dessas terminações simpáticas é a noradrenalina, que estimula a síntese de melatonina agindo sobre os adrenoreceptores α e β , presentes na membrana dos pinealócitos (Klein & Weller, 1970). Além do neurotransmissor noradrenalina, as terminações nervosas simpáticas liberam neuromoduladores como o neuropeptídeo Y (NPY), ATP, entre outros (Schon *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 1991; Mikkelsen & Møller, 1999; Mortani-Barbosa *et al.*, 2000).

A existência de uma cotransmissão noradrenérgica-purinérgica na glândula pineal foi funcionalmente evidenciada através de um ensaio que permitiu acessar a importância de ambos os transmissores (noradrenalina e ATP) no metabolismo da glândula pineal. Sob estimulação elétrica transmural dos terminais nervosos que inervam a pineal, a incubação com o antagonista β -adrenérgico propranolol, bloqueou completamente a produção de N-acetilserotonina (NAS), precursor imediato da melatonina, enquanto os antagonistas de receptores P2, PPADS e suramina, bloquearam parcialmente esta produção, apontando para a relevância fisiológica do papel da cotransmissão noradrenérgica-purinérgica neste sistema (Mortani-Barbosa *et al.*, 2000).

3.2 Vias metabólicas de síntese e degradação da melatonina

A melatonina, hormônio mais conhecido da pineal, tem sua síntese iniciada a partir do aminoácido triptofano, proveniente da circulação, que é

hidroxilado pela enzima triptofano-hidroxilase (TPH) formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP), o qual é descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AAAD), gerando assim a serotonina (5-hidroxitriptamina 5-HT). A serotonina pode ser acetilada pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) originando a NAS, que é metilada pela enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT) formando a melatonina (Sugden *et al.*, 1989; para revisão Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Vários componentes desta via, como serotonina, NAS e melatonina apresentam grandes variações circadianas, sendo secretados diretamente para a circulação sanguínea (Chattoraj *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2012).

A melatonina secretada gera diversos metabólitos bioativos. Pelo menos seis enzimas transformam melatonina em diferentes metabólitos. A enzima citocromo P450 (CYP450) converte melatonina a 6-hidroxi-melatonina e também a metaboliza a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). Além desta, as enzimas indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), *horseradish* peroxidase (HRP), mieloperoxidase (MPO) e eosinilperoxidase (EPPO) também convertem melatonina a AFMK. Pela ação da enzima arilamina formamidase (AFM) ou da catalase (CAT), AFMK pode ser metabolizado à outra amina biogênica - N¹-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK). A melatonina é também substrato da enzima melatonina deacetilase formando 5-metoxitriptamina (revisto por Tan *et al.*, 2010).

Além da transformação enzimática, vias pseudoenzimáticas e interações da melatonina com radicais livres também geram AFMK, AMK, ciclo-3-hidroximelatonina, N-nitrosomelatonina e 2-hidroximelatonina tanto em condições *in vitro* como *in vivo* (revisto por Tan *et al.*, 2010).

Durante a fase de claro, na qual não há produção de melatonina, a concentração de serotonina no pinealócito é regulada através da via da monoamina oxidase B (MAO B). A serotonina sob a ação da MAO B é transformada em 5-hidroxi-indolacetaldeído (5-HIAL), e este, por sua vez, sob a ação da enzima aldeído desidrogenase é convertido em ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) ou sob a ação da enzima álcool desidrogenase é transformado em 5-hidroxitriptofol (5-HL). Ambos podem ser O-metilados por ação da HIOMT, formando respectivamente o ácido 5-metoxi-indolacético (5-MIAA) e metoxitriptofol (5-ML) (Klein *et al.*, 1981) (Figura 4).

Figura 4. Vias Metabólicas de síntese e degradação da melatonina. A síntese de melatonina é iniciada a partir do aminoácido triptofano, que é hidroxilado pela enzima TPH formando 5-HTP, o qual é descarboxilado pela enzima AAAD, gerando assim a serotonina, esta pode ser acetilada pela ação da AA-NAT originando a NAS, que é metilada pela HIOMT formando a melatonina. A enzima CYP450 converte melatonina a 6-hidroximelatonina e também a metaboliza a AFMK. As enzimas IDO, HRP, MPO e EPPO também convertem melatonina a AFMK. Pela ação da enzima AFM ou da CAT, AFMK pode ser metabolizado AMK. A melatonina é também substrato da enzima melatonina deacetilase formando 5-MT. Durante a fase de claro, a serotonina sob a ação da MAO B é transformada em 5-HIAL, e este, por sua vez, sob a ação da enzima aldeído desidrogenase é convertido em 5-HIAA ou sob a ação da enzima álcool desidrogenase é transformado em 5-HL. Ambos podem ser O-metilados por ação da HIOMT, formando respectivamente o ácido 5-MIAA e 5-ML (adpatado de Simonneaux & Ribelayga, 2003).

3.3 Controle da Síntese de Melatonina

Na glândula pineal, a ativação dos adrenoreceptores β é essencial para a produção de melatonina. Adrenoreceptores α_1 possuem um ritmo diário, de modo que a maior densidade desses receptores na glândula pineal seja encontrada na transição claro/escuro (Romero & Axelrod, 1974; Panger *et al.*, 1990). A noradrenalina liberada pela estimulação do terminal simpático na glândula pineal na fase de escuro, ativa adrenoreceptores α_1 e β_1 elevando a $[Ca^{2+}]_i$ e a concentração de AMPc, respectivamente (Sugden *et al.*, 1986). A estimulação de adrenoreceptores α_1 potencia o efeito induzido pela estimulação de adrenoreceptores β_1 , mas não é capaz de elevar sozinha os níveis de AMPc (Chik *et al.*, 1988).

O Ca^{2+} e o DAG ativam a PKC, potencializando o aumento do AMPc, pois essa enzima pode fosforilar a AC ou a proteína G_s , ativando-as. O AMPc e o Ca^{2+} são fundamentais para o processo de ativação da enzima AA-NAT (Klein *et al.*, 1983; Chik *et al.*, 1988; Sudgen *et al.*, 1988). A AA-NAT, quando fosforilada pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA), interage com a proteína 14-3-3 formando um complexo protegido contra proteólise proteassomal (Klein *et al.*, 2002).

Em roedores, o aumento do AMPc e, conseqüentemente, a ativação da PKA fazem com que a subunidade catalítica da PKA fosforile o fator de transcrição CREB. Este, por sua vez, se liga ao seu sítio CRE (elementos

responsivos a AMPc) na região promotora do gene da *aa-nat*, induzindo a transcrição seguida da tradução citoplasmática da enzima (Klein, 2007).

Um dos mecanismos de regulação inibitória sobre a AA-NAT envolve a síntese da proteína ICER (repressor induzido por AMPc, do inglês, *inducible cAMP early repressor*). Esta proteína inibe a transcrição do gene da *aa-nat* reduzindo a atividade desta enzima. Esse fator contribui para a queda da atividade da AA-NAT que ocorre no fim da fase de escuro (Stehle *et al.*, 1993).

Por sua vez, a atividade da enzima HIOMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes (Ribelayga *et al.*, 1999a, b; Simonneaux & Ribelayga, 2003). O ritmo circadiano do RNAm da HIOMT é dependente da estimulação adrenérgica, através da ativação do receptor β -adrenérgico, e do aumento na concentração de AMPc. Contudo, o ritmo da atividade da enzima HIOMT parece ser dependente de eventos pós-transcricionais, induzidos por neurotransmissores que aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} (Simonneaux *et al.*, 1999).

Apesar de a glândula pineal ser considerada o principal local de síntese de melatonina, diversos estudos têm mostrado que muitos tecidos e órgãos extra-pineais são capazes de sintetizar melatonina. Estes incluem retina (Iuvone *et al.*, 1983; Zmijewski *et al.*, 2009; Mennenga *et al.*, 1991; Iuvone *et al.*, 2002; Tosini *et al.*, 2007), glândula de Harderian (Djeridane *et al.*, 1998), glândula tireóide de rato (Kvetnoy, 1999; García-Marín *et al.*, 2012), medula óssea (Tan *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 2000), trato gastro-intestinal (Huether *et al.*, 1992; Huether, 1993;

Bubenik, 2002), células epidérmicas (Slominski *et al.*, 1996, 2002; Fischer *et al.*, 2008), ovário (Itoh *et al.*, 1999), testículos (Tijmes *et al.*, 1996) e células imunocompetentes (Carrillo-Vico *et al.*, 2004, 2005; Pontes *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2007).

A melatonina, advinda desta produção extra-pineal, tem sido envolvida num amplo espectro de atividades biológicas apresentando, portanto, através de comunicações autócrina e parácrina, um importante papel na coordenação de eventos intracelulares.

3.4 Atividades Biológicas da Melatonina

Além de seu importante papel na transmissão da informação fótica ambiental, a melatonina atua também, por exemplo, como antioxidante, na modulação da interação cálcio-calmodulina (Benitez-King *et al.*, 1993); na inibição da translocação nuclear de fatores de transcrição (Gilad *et al.*, 1998; Cecon *et al.*, 2010); potencia a produção de interleucina 2 (IL-2), IL-6 e interferon gama em linfócitos e monócitos humanos (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997); entre outros.

Como antioxidante, a melatonina possui capacidade tanto de sequestrar diretamente radicais livres quanto de potenciar a atividade de enzimas antioxidantes. Estes efeitos são gerados também por seus metabólitos, AFMK e AMK, moléculas com maior atividade antioxidante do que a própria melatonina, capazes de reagir diretamente com moléculas reativas como,

espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (para revisão Tan *et al.*, 2007).

Seus efeitos são mediados através da atuação em receptores específicos (MT1 e MT2) acoplados à proteína G que estão localizados na membrana celular. Estes receptores podem estar acoplados a diferentes isoformas da proteína G, variando de acordo com sua localização nas células e tecidos (Dubocovich *et al.*, 2005; Hardeland *et al.*, 2009). A melatonina pode também atuar em um receptor citoplasmático, homólogo a enzima quinona redutase 2 (QR2), denominado MT3 (Nosjean *et al.*, 2000), ou ainda por mecanismos independentes de receptores, ou seja, diretamente com proteínas citosólicas e nucleares, já que possui alto coeficiente de partição óleo-água atravessando facilmente as membranas celulares (Shida *et al.*, 1994).

3.5 Receptores Purinérgicos na Glândula Pineal

A capacidade de pinealócitos em cultura gerarem adenosina a partir de ATP extracelular sugeriu a presença de ectoenzimas e a existência de um sistema purinérgico funcional na pineal (Nikodjevic & Klein, 1989). Ensaios de ligação com radioligantes adenosinérgicos em membranas de pineais de rato, demonstraram a existência de sítios de ligação seletivos para estes receptores nestas preparações (Sarda *et al.*, 1989).

Funcionalmente, as evidências de um papel para a adenosina na fisiologia da pineal foi demonstrada através do acúmulo dos segundos mensageiros

AMPC e monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) em pinealócitos de rato estimulados com concentrações crescentes de adenosina e dos análogos (R)N6-fenilisopropiladenosina (R-PIA), 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) e 2-cloroadenosina (2-Cl-adenosina). A natureza estimulatória desta resposta, a potência relativa dos agonistas testados e o efeito de antagonistas seletivos corroboraram o envolvimento do receptor A_{2B} na pineal (Nikodijevic & Klein, 1989; Gharib *et al.*, 1992).

Em glândulas pineais em cultura a estimulação de receptores de adenosina pelo análogo NECA aumentou o acúmulo de AMPC de maneira similar à observada com a estimulação β -adrenérgica por isoproterenol (ISO). Esta resposta foi potenciada pela estimulação simultânea com ISO e NECA. Enquanto os níveis de AMPC induzidos por ISO foram associados a um aumento na atividade da AA-NAT e síntese de melatonina, o aumento dos níveis intracelulares deste segundo mensageiro induzido pela estimulação do análogo NECA não aumentou a atividade da AA-NAT e nem os níveis de melatonina (Nonaka *et al.*, 1991). Contudo, em pinealócitos isolados, o análogo NECA (100 μ M) potenciou o efeito estimulatório de ISO (3 μ M) sobre a produção de melatonina pela pineal, efeito este bloqueado por antagonista clássico de receptor para adenosina e consistente com a ativação de receptor A_{2B} (Nicholls *et al.*, 1997).

In vivo, a administração de ISO elevou a atividade da AA-NAT e síntese de melatonina, contudo, a administração do análogo NECA não alterou nenhum

destes parâmetros analisados (Nordio *et al.*, 1992) em contraste com outro estudo no qual a administração de NECA resultou em um aumento nos níveis do precursor NAS e de melatonina 2 a 4 horas após a administração intraperitoneal durante a fase de claro (Gharib *et al.*, 1989).

A presença de receptores A_{2B} e A_3 foi também demonstrada em células tumorais da pineal de ratos, onde o receptor A_{2B} estaria acoplado positivamente à enzima AC e ao receptor A_3 acoplado negativamente à enzima AC e acoplado a PLC (Suh *et al.*, 2001). Estas células tumorais também possuem receptores $P2Y_1$ e $P2Y_2$ acoplados à PLC (Suh *et al.*, 1997). Um acoplamento seletivo dos receptores purinérgicos e adrenérgicos neste modelo tem sido sugerido, uma vez que, a estimulação do receptor $P2Y_1$ não apresentou nenhum efeito sobre o acúmulo de AMPc induzido por ISO, enquanto a estimulação do receptor $P2Y_2$ levou à inibição do acúmulo de AMPc induzido por ISO (Suh *et al.*, 2001).

A presença de receptores P2 em glândulas pineais de rato mantidas em cultura foi caracterizada por nosso grupo. Em glândulas estimuladas com noradrenalina, o aumento na produção de NAS, nas glândulas e nos meios de incubação, foram potenciados por ATP e seu análogo não hidrolisável adenosina parnitrofenilfosfato (AMP-PNP) de maneira dependente de concentração. Suramina, antagonista P2, bloqueou o efeito do ATP, mas não o da adenosina, também testada neste estudo. Estes resultados constituíram os primeiros achados de que a glândula pineal de ratos possui receptores P2, que

quando estimulados, potenciam a produção de NAS induzida por noradrenalina, não tendo efeito por si só (Ferreira *et al.*, 1994).

De acordo com a seletividade a agonistas e mecanismos de transdução estes receptores foram caracterizados como receptores P2Y₁. Os agonistas 2-metil ATP (2MeSATP), 2-cloroATP (2-ClATP), adenosina 5'-O-2-tiodifosfato (ADPβS), ATP e ADP, mas não UTP, potenciaram a produção de NAS induzida por noradrenalina de maneira dependente da concentração. O agonista 2MeSATP não induziu o acúmulo de AMPc, nem inibiu sua formação em glândulas estimuladas por forskolin. A inibição da PLC pelo composto U73122 bloqueou o efeito potenciador do agonista 2-MeSATP, efeito não observado na presença de seu análogo inativo U73343. Finalizando esta caracterização, o efeito potenciador do agonista 2-MeSATP foi bloqueado na presença do antagonista PPADS (tabela 1) (Ferreira & Markus, 2001).

As respostas funcionais da estimulação de receptores P2Y₁ na pineal também foram avaliadas através da técnica de microfisiometria. Na presença do quelante de Ca²⁺ BAPTA, a velocidade de acidificação extracelular induzida por ADP é inibida, bem como na presença dos antagonistas seletivos P2Y₁, adenosina 3', 5'-bifosfato (A3'P5'P) e adenosina 3'-fosfato-5'-fosfosulfato (A3'P5'PS) (Ferreira *et al.*, 2003).

Deste modo, na glândula pineal de ratos, o ATP, coliberado com noradrenalina do terminal nervoso simpático, potencia a produção do precursor NAS de maneira dependente de concentração, efeito este mediado

por receptores P2Y₁. A estimulação destes receptores ativa uma proteína G_q ligada à estimulação da PLC, gerando IP₃ e DAG. O IP₃, atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação do Ca²⁺ desses estoques, tendo como consequência um aumento da [Ca²⁺]_i. O Ca²⁺ e o DAG ativam a PKC, que potencia o aumento do AMPc já induzido pela estimulação β-adrenérgica. Este efeito pode ocorrer pela fosforilação da AC ou da proteína G_s. O Ca²⁺ tem um papel potenciador da síntese do AMPc intracelular também por atuar através do complexo cálcio/calmodulina na ativação da AC (Tzavara *et al*, 1996).

Portanto, a participação do sistema purinérgico na fisiologia da glândula pineal sugere um papel complexo para estas moléculas. Tendo em vista a existência de relatos tão conflitantes em relação à regulação da produção de melatonina, seu precursor NAS e os eventos intracelulares desencadeados, buscamos nesta dissertação investigar os efeitos da co-estimulação purinérgica sobre a produção de melatonina propriamente dita aprofundando esta investigação sobre os mecanismos moleculares envolvidos na estimulação dos receptores P2Y₁ caracterizados na pineal.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a participação da estimulação do receptor purinérgico P2Y₁ sobre a produção de melatonina induzida pela estimulação β -adrenérgica. Para tanto, avaliamos:

- ✓ A produção de melatonina e N-acetilserotonina em glândulas pineais em cultura e em pinealócitos isolados estimulados com o agonista β -adrenérgico isoproterenol (0,1 μ M) na ausência ou na presença de concentrações crescentes do agonista ADP (0,01 mM - 1 mM);
- ✓ O mecanismo molecular envolvido através da análise da translocação nuclear dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B em glândulas pineais em cultura estimulados com ADP (1 mM);
- ✓ A expressão gênica e a atividade enzimática das enzimas AA-NAT e HIOMT envolvidas na biossíntese de melatonina após estimulação por ADP (0,01 - 1 mM);
- ✓ Estudo com o antagonista seletivo de receptores P2Y₁- A3'P5'P

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 210g, provenientes do biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, mantidas em sala com temperatura e umidade controladas, recebendo água e ração *ad libitum*. O ciclo claro/escuro empregado foi o de 12/12 h (luzes acesas às 06h30 e apagadas às 18h30), sendo o horário de acender das luzes, considerado como Zeitgeber Time zero (ZT 0). Em todos os experimentos os animais foram sacrificados por decapitação, em ZT 3, e as glândulas pineais foram imediatamente colocadas em cultura ou armazenadas a -80°C. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação previa da Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação (CEA) do Instituto de Biociências (protocolo 106/2010, anexo 1).

2. Drogas e Reagentes

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

- ✓ Amersham Biosciences (Reino unido): [¹²⁵I]-2-iodomelatonina.
- ✓ Beker (Brasil): água estéril para injeção.
- ✓ Bio-Rad (Richmond, CA, EUA): acrilamida; SYBR Green.

- ✓ Calbiochem (Darmstadt, Alemanha): NP40 (Nonidet-P40)
- ✓ Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA): estreptomicina, glutamina, penicilina.
- ✓ Hoeschst (Brasil): ácido ascórbico.
- ✓ INRA (França): anticorpo originado de coelho específico para melatonina (R19540).
- ✓ Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA, EUA): ditiotreitól (DTT), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), dNTP mix, PCR 5x, Superscript III RT, DNase I, T4 polinucleotídeo quinas, Primers (senso e antisenso) para *aa-nat* (5'-AGCGCGAAGCCTTTATCTCA-3' e 5'-AAGTGCCGGATCTCATCCAA-3'), *hiomt* (5'-AGCGCCTGCTGTT CATGAG-3' e 5'-GGAGCGTGAGAGGTCAAAG-3') e 14-3-3 (5'-TGATCGGGATCTGGTGTA-3' e 5'-TCCACCATTTCGTCGTATCG-3'); Primers (senso e antisenso) para 18S: (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' e 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3').
- ✓ Merck (Brasil): A3'P-5'P - adenosina-3', 5'-bifosfato; acetato de sódio; ácido cítrico; ácido clorídrico; ácido perclórico; álcool etílico; EDTA (do inglês, ethylenediaminetetracetic acid dissodium salt); metanol; metabisulfito de sódio;
- ✓ Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy TidesR Adenosine 5'- triphosphate, [γ -32P].

- ✓ Promega (Madison, WI, EUA): oligonucleotídeo consenso para NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'); AP-1 (5'-CGTTGATGAGTCAGCCG GAA-3').
- ✓ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA): anticorpos para as subunidades de NF- κ B p50 (sc-114X); RelA (sc-109X).
- ✓ Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA): poli (dIdC) double strand; glicerol; bisacrilamida (N'-methylenebisacrylamide); N-acetilserotonina (NAS); melatonina (MEL); HEPES; meio de cultura BGJb; (-) arterenol bitartarato de sódio (noradrenalina); corticosterona; isoproterenol bitartarato de sódio; adenosine 5'-difosfato (ADP); Pirrolidina ditiocarbamato (PDTC).

3. Preparo de Drogas

Soluções estoque de NAS (1 mM) e melatonina (1 mM) foram preparadas em 0,1 M de ácido clorídrico acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% EDTA dissódico. Os estoques permaneceram congelados a -20°C até o uso por um período inferior a 30 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 isoproterenol (10 mM) foram preparadas em ácido clorídrico 0,01 M. As diluições foram realizadas em solução aquosa de ácido ascórbico (50 mg/L).

As demais drogas utilizadas e listadas acima foram, quando necessário, diluídas em água deionizada purificada por sistema Milli-Q (Millipore®).

4. Cultura de Glândula Pineal

A cultura de glândulas pineais foi realizada segundo protocolo proposto por Parfitt *et al.* (1976) e modificado por Ferreira *et al.* (1994). As pineais recém removidas dos animais foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (TPP®), uma 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 a temperatura de 37°C em atmosfera com 95% de saturação de O₂ e 5% de CO₂ por 48 horas. O meio foi trocado após 24 h. e no momento anterior ao tratamento. Decorridas 48 h., as glândulas foram submetidas à estimulação e incubadas por 5 h. de acordo com os protocolos experimentais. Após o tratamento em cultura, as glândulas pineais foram imediatamente armazenadas a -80°C para posterior análise da expressão gênica das enzimas AA-NAT e HIOMT bem como da translocação nuclear dos fatores de transcrição AP-1 e NF-κB. Os meios de cultura foram armazenados a -20°C para posterior dosagem do conteúdo de NAS e melatonina.

5. Cultura de Pinealócitos

Os pinealócitos foram preparados conforme técnica descrita por Simonneaux *et al.* (1999). As glândulas pineais foram retiradas de grupos de 5-10 animais e colocadas em meio de dissociação contendo (mM): NaCl 137,3;

KCl 5; NaH₂PO₄ 0,7; ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES) 25; albumina fetal bovina (BSA, 1 g/L) e glicose (1,8 g/L), pH 7,4. A seguir foram incubadas em meio de dissociação modificado complementado com cisteína (1mM), EDTA (0,5 mM), DNase 0,01% e papaína (2 U/mL). Este meio de dissociação modificado foi incubado previamente por 10 min. a 37°C para ativação da papaína com cisteína. Após a primeira incubação, o sobrenadante com células dissociadas foi removido, centrifugado (240 x g, 5 min.) e ressuspenso em meio contendo inibidor de tripsina

(0,1 mg/mL), BSA (0,1 mg/mL) e DNase (0,01%). O tecido não dissociado foi mais uma vez incubado com meio de dissociação fresco por mais 10 min. e tratados como descrito até a completa dissociação. O *pool* de células dissociadas foi finalmente centrifugado por 10 min. a 107 g e ressuspenso na densidade de 70000 células/mL em meio DMEM acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro fetal bovino (10%). As células dispersas foram colocadas em placas e mantidas à 37°C, 5% CO₂, *overnight*. Decorrido este período, os pinealócitos isolados foram submetidos à estimulação e incubados por 5 h. de acordo com os protocolos experimentais para a análise da atividade enzimática das enzimas AA-NAT e HIOMT bem como do conteúdo de melatonina.

6. Dosagem de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O conteúdo de NAS e melatonina presentes no meio de cultura foi determinado por HPLC (Waters System, Milford, MA, EUA). O sistema cromatográfico foi composto por uma bomba Waters® 1525µ operada isocraticamente em temperatura ambiente, uma coluna de fase reversa Resolve C18 (partícula esférica de 5 µm; 3,9x150 mm) (Waters System, Milford, MA, EUA) e um detector eletroquímico Waters® 2465 operado em modo DC (corrente contínua), controlado pelo programa computacional Empower (Waters System, Milford, MA, EUA). A fase móvel para a dosagem de NAS (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 10% pH 3,7) e para a dosagem de 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 0,95 mL/min. e 0,50 mL/min., respectivamente. O potencial do detector foi ajustado para +0,90 V versus eletrodo de referência Ag/AgCl. Para a realização da análise, 20 µL do meio de cultura ou de padrões para cada analito foi injetado diretamente no sistema cromatográfico.

7. Dosagem radioimunológica de melatonina

A concentração de melatonina nos meios de cultura de pinealócitos dispersos estimulados com isoproterenol (1 µM) na ausência ou na presença de ADP (0,01 - 1 mM) foi determinada em duplicatas de 25 µL utilizando anticorpo específico para melatonina produzida por coelho (R19540; diluição

final de 1/40000) e [125 I]-2-iodo melatonina (Barassin *et al.*, 1999). As amostras e a curva padrão foram incubadas com 200 μ L de anticorpo e 100 μ L do hormônio marcado por 18 horas. A precipitação do anticorpo ligado foi feita com a adição de 500 μ L de anticorpo anti-coelho (produzido por cabra) por 15 min. em gelo seguido de centrifugação por 15 min. (3000 x g; 4°C). A radioatividade foi quantificada por contador gama (Packard®) e o limite de sensibilidade do método foi de 0,5 pg/tubo. As diluições foram todas feitas em tampão de tricina 0,1 mol/L contendo 0,9% de NaCl e 0,01% de gelatina.

8. Extração de proteína nuclear

Para a extração de proteína nuclear, as glândulas pineais obtidas após o cultivo foram homogeneizadas individualmente em 100 μ L de tampão de lise (HEPES 10 mM, 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, foram adicionados 7 μ L de NP40 (10%). Após breve agitação em vortex e incubação em gelo por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas (12000 x g; 1 min.; 4 °C) e o sobrenadante, correspondente a fração citoplasmática do extrato, descartado. O *pellet* formado foi ressuspensão em 50 μ L do mesmo tampão de lise e seguiu-se uma nova centrifugação (12000 x g; 1 min.; 4°C). Novamente o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 20 μ L de tampão de extrato nuclear (HEPES 10 mM, KCl 0,5 M, EDTA 1 mM pH 8,0, glicerol 10%,

DTT 1 mM e PMSF 0,1 mM). Após incubação de 15 min. em gelo, sob agitação, as amostras foram centrifugadas (20000 x g; 5 min.; 4°C) e o sobrenadante contendo o extrato protéico nuclear foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. A quantificação do conteúdo de proteína no extrato nuclear foi realizada a 280 nm no espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

9. Ensaio de Eletromobilidade em Gel (EMSA)

Os extratos de proteína (5 µg) foram primeiramente incubados com tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0, 4% glicerol e 1 µg de poli (dIdC) por 20 min. a temperatura ambiente, e em seguida adicionou-se 1 µL de uma sonda de oligonucleotídeo dupla-fita correspondente ao consenso para NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Promega, Madison, WI, EUA) ou AP-1 (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'; Promega, Madison, WI, EUA) marcada com o radioisótopo ³²P. Os extratos foram incubados com a sonda (cerca de 30.000 c.p.m.) por 30 min. a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 2µL de tampão de corrida (Tris HCl 250 mM pH 7,5, 4% glicerol) e as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida não-desnaturante, 6% de acrilamida: bisacrilamida (37,5:1). Após a eletroforese (150 V, 1h. 30min.) em tampão 0,25x de Tris-borato/EDTA (TBE), o gel foi seco a vácuo (Gel Dryer Vacuum System – Fisher Biotech, Wembley, Australia), exposto ao filme XAR-5

(Kodak , Rochester, NY, EUA) em cassete apropriado por 48 h. a -80°C . Após esse período, o filme foi revelado por imersão em solução reveladora (Kodak , Rochester, NY, EUA; 5 min.) e fixadora (Kodak , Rochester, NY, EUA; 10 min.). As autoradiografias foram quantificadas através do software Image J.

10. Ensaio de supershift

As subunidades de NF- κ B presentes nos extratos nucleares de glândulas pineais tratadas ou não com ADP (1 mM, 1 min.) foram identificadas através do ensaio de EMSA. Foram utilizados 6 μg de proteína de um pool de 4 extratos de cada grupo experimental. Neste ensaio foram adicionados anticorpos específicos para subunidades de NF- κ B: RelA e p50 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 45 minutos) antes da incubação dos extratos com a sonda consenso para NF- κ B- ^{32}P . As demais etapas que se seguiram foram realizadas conforme o protocolo de EMSA descrito anteriormente.

11. Extração de RNA

O RNA total de cada glândula pineal foi extraído utilizando-se 1 mL de Trizol, seguido de 200 μL de clorofórmio. Após agitar manualmente vigorosamente por 15 segundos, os tubos foram mantidos por cerca de 3 min. a temperatura ambiente e centrifugados (12000 $\times$ g; 15 min.; 4°C), separou-se a fase aquosa que contém o RNA. O RNA foi precipitado com 400 μL de isopropanol por 10 min. a temperatura ambiente, seguido de centrifugação (12000 $\times$ g; 10 min.; 4°C). O sobrenadante foi removido, o *pellet* lavado duas

vezes com 500 µL de etanol 75%, centrifugado (7500 x g; 5 min.; 4 °C) e o excesso de etanol evaporado a temperatura ambiente por cerca de 10 min. Após esse período, o material foi ressuspense em 10 µL de água estéril para injeção (RNase free) e tratado com DNase conforme instruções do fabricante. Resumidamente, a cada amostra foi adicionado tampão 10x DNase I (1 µL) e DNase I (1 U/µL). As amostras foram incubadas por 15 min. a temperatura ambiente e, para inativação da DNase foi acrescentado EDTA (25 mM) seguido de incubação a 65 °C por 10 min. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop®).

12. Síntese da fita de DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa

A síntese de cDNA, a partir de RNA total (0,5 µg) e random primer foi realizada utilizando-se SuperScript III. A mistura de RNA, random primer (50 ng) e dNTP mix (10 mM) foi incubada inicialmente a 65°C por 5 min. Imediatamente após a incubação, foi transferido para cuba com gelo, adicionando-se tampão PCR 5x (4 µL), DTT (0,1 M) e Superscript III RT (200 U/ µL), finalizando um volume de 20 µL. A mistura foi homogenizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min. a 25°C, 50°C por 55 min., sendo a reação inativada a 70°C por 15 min. O cDNA produzido foi utilizado nos ensaios de PCR ou estocado a -20°C até o uso. Reações na ausência de transcriptase reversa foram realizadas como controle negativo para avaliar possível contaminação genômica das amostras analisadas.

13. RT-PCR em tempo real

Para determinar a expressão gênica das enzimas AA-NAT e HIOMT, os cDNAs construídos (1 µL) foram incubados com os respectivos *primers* senso e antisenso (300 nM) na presença de *iQ SYBR GreenSupermix* (mix 2x, 50% do volume final; 12,5 µL) que contém, dentre outras substâncias, a iTaq DNA polimerase. A expressão gênica da proteína ribossomal 18S também foi analisada, pelo mesmo procedimento, utilizando-se *primers* específicos (50 nM) o que possibilitou a normalização interna dos dados. Neste ensaio o fluoróforo *SYBR Green* intercala-se ao DNA dupla-fita formando um complexo capaz de emitir fluorescência. A reação em cadeia da polimerase, responsável pela amplificação da expressão dos genes alvos, foi acompanhada em tempo real utilizando-se o aparelho *iCycler* (BioRad Laboratories®). Os sete primeiros minutos da etapa de desnaturação (95°C) foram seguidos por 40 ciclos de amplificação (10 seg. de desnaturação a 95°C e 1 min. de anelamento e elongação a 60°C). Como uma forma de se averiguar a amplificação de produtos inespecíficos utiliza-se *melting curves*, as quais são feitas ao final do experimento e analisadas para cada amostra. Durante essa fase, a temperatura é baixada 1°C a intervalos de tempo determinados e o pico de fluorescência é obtido em cada poço, numa temperatura que coincide com o T_m (do inglês, *melting temperature*) do produto esperado. Produtos inespecíficos formam picos de fluorescência em T_ms diferentes na curva. Em todos os ensaios foram

incluídos controles negativos com água e RNA de pineais que não foram incubados com a transcriptase reversa.

Os *primers* (senso e antisenso) para *aa-nat* e *hiomt* utilizados foram, respectivamente: 5'-AGCGCGAAGCCTTTATCTCA-3', 5'-AAGTGCCGGATCTCATCCAA-3', 5'-AGCGCCTGCTGTTCATGAG-3', 5'-GGAAGCGTGAGAGGTCAAAGG-3'. Os *primers* (senso e antisenso) para a 18S foram: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' e 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'. A concentração do RNAm foi calculada usando-se o valor do *threshold cycle* (Ct) da amplificação dos genes alvo. A quantificação relativa foi feita pela formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ onde $\Delta\Delta C_t$ representa a diferença entre os ciclos normalizada pela referência interna (18S) e um calibrador (glândulas não estimuladas por isoproterenol).

14. Ensaio de atividade enzimática da AA-NAT

A atividade da enzima AA-NAT foi determinada por ensaio radiométrico. Os pinealócitos dispersos foram sonicados (4°C) em 100 µL de tampão de fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,8) contendo 0,35 mM de acetil coenzima A. 40 µL dos homogenatos foram incubados (37°C por 20 min.) com triptamina (10 mM) e (¹⁴C)-acetil coenzima A (10 mM; atividade específica final de 44 mCi/mmol) em um volume final de 80 µL. O produto radioativo da reação (¹⁴C -N-acetilserotonina) foi extraído com 1 mL de clorofórmio gelado e saturado com ar. As amostras foram colocadas em um recipiente de cintilação por 18 horas, até que seu conteúdo evaporasse. Ao final, 3,5 mL de líquido de

cintilação foram adicionados aos tubos e a radioatividade de cada tubo foi determinada em um contador β (Beckman ®).

15. Ensaio de atividade enzimática da HIOMT

A atividade da enzima HIOMT foi também determinada por ensaio radiométrico. Os pinealócitos dispersos foram sonicados (4°C) em 100 μ L de tampão de fosfato de sódio (0,05 M; pH 7,9). 50 μ L do sobrenadante foram então incubados (37°C por 30 min.) com N-acetilserotonina (1 mM) e 14 C-S-adenosyl-L-methionine (43,8 μ M; atividade específica final de 52,7 mCi/mmol) em um volume final de 100 μ L. A reação foi interrompida com a adição de 200 μ L de tampão de borato de sódio (12,5 mM; pH 10) e 1 mL de clorofórmio. Os tubos foram então centrifugados por 5 min. (13000 $\times$ g; 4 °C) e o produto radioativo da reação (14 C melatonina) foi extraído com 800 μ L de clorofórmio. As amostras foram colocadas em um recipiente de cintilação por 18 h., até que seu conteúdo evaporasse. Ao final, 3,5 mL de líquido de cintilação foram adicionados aos tubos e a radioatividade foi determinada em um contador β (Beckman ®).

16. Análise dos resultados

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm). A comparação entre dois grupos foi realizada através do teste “t” de Student e, a comparação de mais de dois grupos através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. A probabilidade de 5% ($p < 0,05$) foi

considerada como diferenças significativas entre os grupos. Toda a análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism® versão 5.00 (GraphPad Software©).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de NAS e melatonina induzidas por isoproterenol em glândulas pineais em cultura

Glândulas pineais em cultura foram estimuladas com o agonista β -adrenérgico isoproterenol (0,1 μ M, 5h) na ausência ou na presença do agonista seletivo para o receptor P2Y₁, ADP (0,01 - 1 mM). Em glândulas estimuladas com isoproterenol, à estimulação purinérgica com ADP levou a um aumento concentração dependente da produção de NAS (Figura 5A), enquanto a produção de melatonina foi reduzida (Figura 5B).

Figura 5. Curva concentração-efeito ao ADP (0,01 - 1 mM) na produção de NAS (A) e melatonina (B) nos meios de incubação de glândulas estimuladas com isoproterenol (ISO, 0,1 μ M). Os dados representam média $\pm$ epm de 7 - 8 glândulas por ponto, obtidos de 3 culturas diferentes.

2. Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de melatonina induzida por isoproterenol em pinealócitos

A produção de melatonina foi também avaliada em pinealócitos isolados estimulados com isoproterenol (ISO, 1 μ M) na ausência ou na presença de ADP (0,01 - 1 mM) por 5 horas.

Em pinealócitos dispersos, o tratamento com ADP (0,01 - 1 mM) também levou à inibição da produção de melatonina de maneira dependente de concentração em células estimuladas com isoproterenol (Figura 6) assim como observado anteriormente em glândulas em cultura.

Figura 6. Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de melatonina em pinealócitos isolados. Os pinealócitos foram estimulados com isoproterenol (ISO, 1 μ M) na ausência ou presença de ADP (0,01 - 1 mM) por 5 horas. Valores representam média $\pm$ epm; n = 3-4 poços por ponto.

3. Mecanismo molecular envolvido na estimulação de receptores purinérgicos P2Y₁ na glândula pineal

Considerando a grande diversidade de transdução de sistemas operados por receptores purinérgicos e a presença constitutiva dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B na pineal (Carter, 1997; Cecon *et al.*, 2010), investigamos o mecanismo molecular dos efeitos da estimulação dos receptores P2Y₁ em extratos nucleares de glândulas pineais estimuladas com ADP (1 mM) através da técnica de EMSA. A via do fator de transcrição NF- κ B foi também funcionalmente avaliada através da utilização de pirrolidina ditiocarbamato (PDTC - 12,5 μ M), inibidor da atividade do NF- κ B, em glândulas em cultura estimuladas com ADP (1 mM).

3.1 Proteína Ativadora 1 (AP-1)

A análise do fator de transcrição AP-1 foi realizada em extratos nucleares de glândulas pineais em cultura estimuladas com ADP (1 mM) por diferentes tempos (0,5 - 5 min.). A análise quantitativa do filme auto-radiográfico exposto ao gel obtido no ensaio das amostras submetidas à técnica descrita de EMSA, revelou um aumento significativo na translocação nuclear do fator de transcrição AP-1 à 0,5 minuto de estimulação, sendo o aumento máximo detectado após 1 minuto, mantendo um platô de translocação até 5 minutos, tempo máximo utilizado neste estudo (Figura 7).

Figura 7. Decurso temporal da translocação nuclear do fator de transcrição AP-1 em extratos nucleares de pineais em cultura estimuladas com ADP. Glândulas pineais de ratos cultivadas por 48 horas foram estimuladas com ADP (1 mM) nos tempos 0,5, 1, 2 e 5 min. Os valores representam média $\pm$ epm do 3-4 glândulas por ponto. * $p < 0,05$ vs glândulas não estimuladas.

3.2 Fator de transcrição NF- κ B

3.2.1 Decurso temporal

Realizamos a seguir um decurso temporal da translocação nuclear de NF- κ B em glândulas pineais sob estimulação purinérgica. Para tanto, glândulas pineais em cultura (48 h) foram estimuladas com ADP (1 mM) por diferentes tempos (0,5 - 5 min.). Confirmando dados anteriores de nosso laboratório, pineais de rato em cultura apresentam atividade constitutiva dos dímeros p50/p50 e p50/RelA (Carvalho-Sousa *et al.*, 2011). Não houve alteração significativa na translocação nuclear de NF- κ B em nenhum dos tempos utilizados neste estudo (Figura 8).

Figura 8. Decurso temporal da translocação nuclear de complexos NF-κB p50/p50 e p50/RelA em extratos nucleares de glândulas pineais em cultura estimuladas com ADP. Glândulas pineais de ratos cultivadas por 48 horas foram estimuladas com ADP (1 mM) nos tempos 0,5, 1, 2 e 5 min. **A** - Gel representativo de EMSA caracterizando os complexos p50/p50 e p50/RelA identificados através de *supershift* (SS) na presença de anticorpos específicos. **B** - Análise gráfica através do Programa Image J mostrando a banda de retardo (SS) correspondente às subunidades testadas. **C** - Gel representativo de EMSA de extratos nucleares de pineais estimuladas por ADP nos tempos 0,5, - 5 min. **D** - Análise densitométrica do decurso temporal da translocação nuclear dos complexos NF-κB/DNA em pineais estimuladas por ADP nos tempos especificados. Os valores representam média ± epm de 7 glândulas por ponto.

3.2.2 Estudo funcional - Efeito de PDTC sobre a produção de NAS e melatonina induzida por isoproterenol

Para verificar o envolvimento do NF- κ B sobre a produção de NAS e melatonina, avaliamos o efeito do inibidor da atividade da via do NF- κ B, PDTC sobre a produção destas indolaminas induzida por isoproterenol. Glândulas pineais em cultura foram previamente incubadas com PDTC (12,5 μ M) por 30 min. e então com isoproterenol (0,1 μ M) na ausência ou na presença de ADP (1 mM) por 5 horas. Como observado anteriormente, a estimulação purinérgica de glândulas pineais em cultura com ADP, levou a uma potenciação da produção de NAS, induzida por isoproterenol, e a uma inibição da produção de melatonina. Estes efeitos observados sobre o conteúdo de NAS e de melatonina não foram alterados em glândulas pré-tratadas com PDTC (Figura 9).

Figura 9. Efeito de PDTC sobre o conteúdo de NAS e melatonina nos meios de incubação de glândulas estimuladas com isoproterenol na ausência e na presença de ADP. Glândulas pineais em cultura foram pré-tratadas com PDTC (12,5 μ M, 30 min.) e estimuladas com isoproterenol (ISO, 0,1 μ M), na ausência e na presença de ADP (1 mM) por 5 horas. Os dados representam media $\pm$ epm de 4 glândulas por ponto. * $p < 0,05$ vs glândulas estimuladas apenas com isoproterenol.

4. Expressão gênica das enzimas AA-NAT e HIOMT na glândula pineal de ratos

A seguir avaliamos a expressão do RNAm das enzimas AA-NAT e HIOMT na glândula pineal de ratos através da técnica quantitativa de RT-PCR em tempo real. Uma curva de diluição de cDNA revelou a alta eficiência de amplificação das reações (dados não mostrados), sendo *18S* o gene *housekeeping* de escolha.

Glândulas pineais cultivadas por 48 horas foram estimuladas com isoproterenol (0,1 μ M), na ausência e presença de ADP (0,01 – 1 mM), por 5 horas. O tratamento com ADP não foi capaz de alterar a expressão de *aanat* (Figura 10A) e *hiomt* (Figura 10B) quando comparado ao grupo tratado com isoproterenol.

Figura 10. Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção dos transcritos *aa-nat* e *hiomt*. Glândulas pineais em cultura estimuladas com isoproterenol (ISO, 0,1 μ M) na ausência e na presença de ADP (0,01 – 1 mM) por 5 horas tiveram a quantidade do RNAm dos genes *aa-nat* e *hiomt* determinados por RT-PCR em tempo real. Os valores foram normalizados a partir de glândulas não estimuladas (basal). **A** - Produção do transcrito *aa-nat*. **B**- Produção do transcrito *hiomt*. Os valores representam media $\pm$ epm, n = 7-8 glândulas por ponto.

5. Atividade enzimática das enzimas AA-NAT e HIOMT em pinealócitos isolados

A atividade das enzimas AA-NAT e HIOMT foi então avaliada em pinealócitos isolados, funcionalmente validados pela produção de melatonina como apresentado no item 2, e estimulados por 5 horas com isoproterenol (1 μ M) na ausência ou presença de ADP (0,01 - 1 mM). Os produtos radioativos dos ensaios de atividade enzimática das enzimas AA-NAT (14 C-N-acetilserotonina) e HIOMT (14 C-melatonina) foram determinados por contador β . O tratamento com ADP não foi capaz de alterar a atividade da enzima AA-NAT quando comparado com o grupo tratado com isoproterenol (Figura 11A), bem como a atividade da enzima HIOMT (Figura 11B).

Figura 11. Efeito da estimulação purinérgica sobre a atividade das enzimas AA-NAT e HIOMT. Glândulas pineais em cultura estimuladas com isoproterenol (ISO, 1 μ M), na ausência ou presença de ADP (0,01 - 1 mM) por 5 horas. **A** - Atividade enzimática da AA-NAT. **B** - Atividade enzimática da HIOMT. Os valores representam a média $\pm$ epm; n = 3-4 poços por ponto.

6. Efeito do antagonista seletivo A3'P-5'P sobre a produção de NAS e melatonina induzida por isoproterenol

O efeito do antagonista seletivo do receptor P2Y₁ foi testado sobre a produção de NAS e melatonina induzida por isoproterenol. Glândulas pineais em cultura foram previamente incubadas com A3'P-5'P (0,01 – 1 mM) por 1 hora e então com isoproterenol (0,1 µM), na ausência ou na presença de ADP (1 mM) por 5 horas.

Como observado anteriormente, a estimulação purinérgica com ADP (1 mM) potenciou a produção de NAS induzida por isoproterenol em glândulas pineais em cultura. O tratamento com o antagonista A3'P-5'P (1mM) não teve efeito sobre o conteúdo de NAS em glândulas estimuladas apenas com isoproterenol mas, inibiu, de maneira dependente de concentração, o efeito potenciador da estimulação purinérgica com ADP sobre a produção de NAS induzida por isoproterenol (Figura 12).

Figura 12 – Efeito do antagonista A3’P5’P sobre o conteúdo de NAS nos meios de incubação de glândulas estimuladas com isoproterenol na ausência e na presença de ADP. Glândulas pineais em cultura foram pré-tratadas com A3’P5’P (0,01 – 1 mM, 1 hora) e estimuladas com isoproterenol (ISO, 0,1 µM) na ausência e na presença de ADP (1 mM) por 5 horas . Os dados representam media ± epm de 4 glândulas por ponto. * p<0,05 significativamente diferente de glândulas estimuladas apenas com isoproterenol; # p<0,05 significativamente diferente de glândulas estimuladas apenas com isoproterenol e ADP.

Sobre o conteúdo de melatonina, contudo, a presença do antagonista seletivo A3’P-5’P (0,01 - 1 mM) em glândulas pineais estimuladas com isoproterenol (0,1 µM) e ADP (1 mM) não levou à reversão do efeito inibitório observado com a estimulação purinérgica (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do antagonista A3'P5'P sobre o conteúdo de melatonina nos meios de incubação de glândulas estimuladas com isoproterenol na ausência e na presença de ADP. Glândulas pineais em cultura foram pré-tratadas com A3'P5'P (0,01 - 1 mM, 1 hora) e estimuladas com isoproterenol (ISO, 0,1 µM) na ausência e na presença de ADP (1 mM) por 5 horas. Os dados representam média ± epm de 4 glândulas por ponto. * p<0,05 significativamente diferente de glândulas estimuladas apenas com isoproterenol.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As ações das purinas no sistema nervoso central e periférico têm sido reconhecidas por muitos anos e a sinalização purinérgica tem emergido como uma forma de comunicação celular com o objetivo de integrar a atividade funcional entre diferentes tipos celulares no SNC e órgãos periféricos (para revisão Burnstock *et al.*, 2011). O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da estimulação dos receptores P2Y₁ sobre a produção de melatonina pela glândula pineal de rato.

A via biossintética da melatonina foi analisada por meio da medida do acúmulo do precursor NAS, produto da ação da enzima AA-NAT sobre a serotonina, e da melatonina propriamente dita, formada sob a ação da enzima HIOMT sobre o substrato NAS (para revisão Simonneaux & Ribelayga, 2003). Nossos resultados em glândulas pineais em cultura ou pinealócitos dispersos confirmam os efeitos da estimulação β -adrenérgica na regulação desta via biossintética na pineal. A estimulação com isoproterenol induziu a produção do precursor NAS e de melatonina.

Confirmando dados anteriores de nosso Grupo, a co-estimulação dos receptores P2Y₁ pelo agonista ADP resultou na potenciação da produção de NAS induzida pela estimulação β -adrenérgica (Ferreira & Markus, 2001). Contudo, o conteúdo de melatonina foi inibido nestas mesmas condições.

A NAS, intermediário químico natural na biossíntese de melatonina, apresenta um padrão de distribuição cerebral diferente da distribuição de serotonina e melatonina, sugerindo que esta tenha funções distintas além da relacionada exclusivamente ao seu papel como molécula precursora da melatonina. De fato, diversos estudos demonstram que a NAS apresenta um importante papel na regulação do humor podendo também apresentar atividade antidepressiva. Estudos adicionais demonstram que a NAS estimula a proliferação de células neuroprogenitoras e previne alguns dos efeitos negativos da privação de sono. Os efeitos antidepressivos e as ações neurotróficas da NAS são devidos em parte por sua capacidade de ativar o receptor TrkB da família de receptores tirosina quinase de maneira rítmica e dependente de concentração (Jang *et al.*, 2010; Sompolet *et al.*, 2011). Evidências indicam também que a NAS apresenta propriedades neuroprotetoras sobre a degeneração induzida pela luz em células fotoreceptoras da retina (Tosini *et al.*, 2012). Os dados obtidos no presente trabalho reforçam este conceito de que, em determinadas situações, o controle da produção de NAS e melatonina seja feito de forma integrada, porém diferenciada. As implicações fisiológicas desta modulação diferencial sobre a função pineal e para o organismo como um todo ainda precisam ser melhor avaliadas, contudo, com o presente trabalho fica claro o papel da ativação purinérgica nesta modulação.

Investigando os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos da estimulação purinérgica na glândula pineal, realizamos os ensaios para

determinar a atividade dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, vias de transdução presentes na pineal e com papel caracterizado na mediação dos eventos intracelulares envolvidos na regulação da via biossintética da melatonina na glândula pineal (Baler & Klein, 1995; Cecon *et al.*, 2010).

A glândula pineal de ratos expressa *immediate early genes* como c-fos, c-jun, junB, junD, NGFI-A, e Fra-2, cujas proteínas correspondentes formam homo ou heterodímeros caracterizando o fator de transcrição AP-1 (Baler & Klein, 1995; Carter, 1997). A atividade de ligação do fator AP-1 também apresenta variação circadiana na glândula pineal de ratos que depende da expressão das proteínas Fra-2, c-Jun, e Jun-D determinada pelo NSQ (Guillaumond *et al.*, 2000).

Observamos um aumento significativo na translocação nuclear do fator de transcrição AP-1 aos 30 segundos de estimulação, sendo o aumento máximo detectado após 1 minuto, mantendo um platô de translocação até 5 minutos, tempo máximo utilizado neste estudo. Desta forma, os níveis diferenciais deste fator de transcrição no núcleo dos pinealócitos após estimulação purinérgica, sugere constituir-se num mecanismo regulatório sobre a glândula pineal tal como observado com a estimulação β -adrenérgica sobre a atividade deste fator (Carter, 1994).

Glândulas pineais apresentam a via NF- κ B ativada constitutivamente, sob a forma de um ritmo diário com níveis nucleares crescentes ao longo da fase de claro até atingir valores máximos no final desta fase. Assim que se inicia o

escuro, há uma redução abrupta no conteúdo nuclear de NF- κ B que é mantido ao longo de toda a fase de escuro ambiental (Cecon *et al.*, 2010).

Para avaliar se a ligação do ADP com o receptor P2Y₁ envolve a ativação da cascata de sinalização que leva à translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B, realizamos a análise da medida da translocação nuclear de NF- κ B, por meio do ensaio de EMSA. Por esta metodologia, extratos nucleares de glândulas pineais em cultura estimuladas por ADP parecem não apresentar aumento da translocação nuclear de NF- κ B quando estimuladas por ADP nos tempos 0,5 – 5 minutos.

Para confirmar o não envolvimento desta via de sinalização utilizamos o composto PDTC. Conforme comentado, este composto impede a ligação do NF- κ B às regiões promotoras do gene após a entrada no núcleo celular (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1993; Wolchok *et al.*, 1994; De Plaen *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008). Neste estudo, as glândulas pineais foram pré-tratadas com PDTC e então estimuladas com isoproterenol, na presença ou na ausência de ADP. O pré-tratamento com PDTC não apresentou efeito sobre o conteúdo de NAS ou melatonina em glândulas pineais estimuladas por ADP, confirmando que a via de sinalização do NF- κ B não participa da resposta evocada por ADP na pineal. Corroborando estes dados, a estimulação de receptores P2Y por ADP em células da microglia, não levou à ativação de NF- κ B (Ferrari *et al.*, 1997).

Os efeitos observados sobre o conteúdo de melatonina e seu precursor NAS após a estimulação purinérgica nos levou a investigar a regulação das

enzimas envolvidas na biossíntese destas indolaminas na pineal. Apesar do início da produção de melatonina ser controlada pelo aumento da expressão e da atividade da enzima AA-NAT durante a fase de escuro, a enzima HIOMT pode ser considerada como a enzima limitante da síntese de melatonina (Liu & Borjigin, 2005). Deste modo, moléculas que sejam capazes de alterar a atividade desta enzima têm o potencial de alterar a quantidade de melatonina que será produzida pela glândula pineal. De fato, apesar de regulada de forma menos marcante que a AA-NAT, muitos trabalhos vem demonstrando que a atividade e expressão da enzima HIOMT pode ser regulada por diferentes neurotransmissores (para revisão ver Simmoneaux & Ribelayga, 2003). Este é o caso, por exemplo, do NPY que apresenta um efeito estimulatório sobre a atividade da HIOMT, potenciando a síntese de melatonina através de um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Ribelayga *et al.*, 1997).

Portanto, na tentativa de identificar o possível mecanismo pelo qual o ADP associado ao isoproterenol estaria provendo a inibição da síntese de melatonina em glândulas pineais, foram realizadas análises de expressão gênica, bem como análises da atividade das enzimas envolvidas na síntese de melatonina. Em nossos experimentos, tanto o efeito estimulatório sobre a produção de NAS quanto o inibitório sobre a produção de melatonina observados pela associação do ADP ao isoproterenol, não mostraram dependência às alterações da expressão gênica ou da atividade enzimática das enzimas AA-NAT ou HIOMT.

A dissociação entre a atividade enzimática na via biossintética da melatonina e sua produção tem sido evidenciada em alguns estudos e, outros fatores têm sido incluídos na modulação da produção de melatonina. O conceito de que baixos níveis de estresse é benéfico ao organismo é hoje bem aceito e, diversos trabalhos demonstraram que sob estas condições ocorre aumento dos níveis plasmáticos de melatonina bem como aumento da atividade da enzima AA-NAT (Stokkan *et al.*, 1991; Couto-Moraes *et al.*, 2009). Contudo, se o estresse for intenso e o consumo de melatonina exceder a síntese, os níveis endógenos de melatonina caem rapidamente mas a atividade da AA-NAT permanece inalterada ou aumentada (Wu *et al.*, 1987, 1988; Ueck *et al.*, 1988; Troiani *et al.*, 1988; 1988b). Wu e colaboradores (1987) observaram que a injeção de isoproterenol em ratos durante o dia leva a uma potenciação tanto da atividade da AA-NAT e da HIOMT quanto dos níveis de melatonina. Quando estes animais foram submetidos a nado forçado, estes níveis elevados de melatonina caíram rapidamente mas a atividade da AA-NAT e da HIOMT continuaram elevadas. Corroborando estes achados, os dados pontuados nesta dissertação indicam uma queda na produção de melatonina pela glândula pineal sem alteração na atividade das enzimas envolvidas em sua biossíntese, AA-NAT e HIOMT.

É interessante notar a demonstração de oscilações circadianas no acúmulo extracelular de ATP no NSQ de ratos *in vivo* e em culturas primárias de astrócitos com uma periodicidade de aproximadamente 24h e pico no final da

fase de escuro (Womac *et al.*, 2009). Considerando a presença de astrócitos na pineal e a liberação de ATP por estas células, a relevância funcional deste ritmo nos níveis extracelulares de ATP no NSQ pode indicar uma possível participação da sinalização purinérgica na comunicação parácrina na pineal, envolvendo glia-pinealócito na regulação da produção de melatonina.

Diante dos dados apresentados, uma hipótese que se levanta é da participação purinérgica na indução da metabolização da melatonina produzida, resultando em um declínio nos níveis desta indolamina mesmo após a sua síntese e liberação pela glândula pineal.

Sabe-se que a metabolização da melatonina plasmática ocorre principalmente no fígado onde é convertida a 6-hidroximelatonina, seguida de conjugação com sulfato ou glucoronato e excreção pela urina (Tan *et al.*, 1999). No sistema nervoso central uma parte da melatonina pode ser oxidada a AFMK possivelmente através de clivagem oxidativa do anel indólico catalisada pela enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), seguida de deformilação formando AMK, por ação da enzima formamidase, assim como ocorre no metabolismo do triptofano (Hirata *et al.*, 1974). Em células dendríticas de humanos foi demonstrado que o ATP leva à supra-regulação do mRNA e da proteína da enzima IDO possivelmente através de receptores P2Y₁₁ (Marteau *et al.*, 2005).

Considerando que os receptores P2Y_{1, 2, 4, 6, 11} ativam, em parte, os mesmos mecanismos de transdução, ou seja, estimulação da enzima PLC e formação de IP₃ e DAG, com subsequente mobilização de [Ca²⁺]_i através do acoplamento

com a proteína $G_{q/11}$, podemos considerar a possibilidade desta via alternativa de metabolização da melatonina estar ativa na via $P2Y_1$, por um mecanismo semelhante ao descrito anteriormente, levando à diminuição dos níveis de melatonina detectados em pineais em cultura sob estimulação purinérgica.

Para avaliarmos se de fato esta via alternativa de degradação da melatonina estaria ativa e se o receptor $P2Y_1$ estaria participando desta regulação, utilizamos o antagonista seletivo $A3'P-5'P$ para bloquear o receptor $P2Y_1$ e avaliar a produção de NAS e melatonina induzida por isoproterenol. Nossos resultados demonstraram que o efeito potenciador do ADP sobre a produção de NAS induzida por isoproterenol é revertido na presença do antagonista seletivo $A3'P-5'P$. Sobre a produção de melatonina, contudo, o efeito inibitório observado com a estimulação purinérgica não foi revertido. Estes resultados apontam para um mecanismo diferencial de modulação da produção de NAS e melatonina no qual o receptor $P2Y_1$ estaria atuando apenas sobre a regulação da produção de NAS, sendo a produção de melatonina controlada por fatores independentes da ativação deste receptor.

Desta forma, independente do mecanismo pelo qual esta produção tenha sido alterada, demonstramos na presente dissertação que a sinalização purinérgica na pineal pode modular os níveis de melatonina por fatores que independem do controle transcripcional e da atividade das enzimas AA-NAT e HIOMT. Este trabalho, portanto, abre novas perspectivas ao estudo dos

mecanismos regulatórios e modulatórios diferenciais que os neurotransmissores podem exercer sobre a produção de melatonina e seus metabólitos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Em glândulas pineais em cultura estimuladas com o agonista β -adrenérgico isoproterenol, a estimulação purinérgica por ADP levou a um aumento na produção de NAS, precursor imediato da melatonina, de maneira dependente de concentração;
2. Sobre o conteúdo de melatonina, a estimulação por ADP levou a uma diminuição da produção desta indolamina de maneira dependente de concentração, em glândulas pineais em cultura e em pinealócitos dispersos estimulados com isoproterenol;
3. A atividade de fatores de transcrição em extratos nucleares de glândulas pineais em cultura estimuladas com ADP revelou um aumento significativo na translocação nuclear do fator de transcrição AP-1 sem alteração na translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B nos tempos analisados;
4. O pré-tratamento com PDTC não alterou o conteúdo de NAS e melatonina em glândulas estimuladas com isoproterenol e ADP;
5. A expressão gênica ou a atividade das enzimas AA-NAT e HIOMT induzidas pelo tratamento com isoproterenol não foi alterada na presença da co-estimulação purinérgica por ADP;
6. O tratamento com o antagonista seletivo de receptores P2Y₁, A3'P-5'P, bloqueou o efeito potenciador da estimulação purinérgica com ADP sobre

a produção de NAS induzida por isoproterenol, mas, não reverteu o efeito inibitório observado sobre os níveis de melatonina;

7. Estes resultados confirmam a presença de receptores P2Y₁ na glândula pineal de ratos e apontam para um mecanismo diferencial de modulação da produção de NAS e melatonina. Esses receptores quando estimulados potenciam o efeito da estimulação simpática sobre a produção de NAS. Os níveis de melatonina, contudo, podem ser modulados por outros fatores.

RESUMO

A biossíntese de MEL pela pineal envolve a conversão da serotonina a NAS pela enzima AA-NAT, seguida demetilação da NAS pela enzima HIOMT gerando a MEL. A ativação β -adrenérgica é essencial e a co-estimulação de receptores P2Y₁ potencia a produção de NAS induzida por noradrenalina. Neste trabalho avaliamos o efeito da estimulação de receptores P2Y₁ sobre a produção de MEL induzida pela estimulação β -adrenérgica. A co-estimulação purinérgica com ADP, levou a potenciação da produção de NAS induzida por ISO e a inibição do conteúdo de MEL de maneira dependente de concentração. Em extratos nucleares de pineais estimuladas com ADP, a translocação nuclear de AP-1 foi observada, não havendo alteração significativa na translocação nuclear dos dímeros NF- κ B p50/p50 e p50/RelA. PDTC, inibidor de NF- κ B, não alterou o conteúdo de NAS e MEL em pineais em cultura estimuladas com ISO e ADP. A expressão gênica e a atividade enzimática de AA-NAT e HIOMT não foram alteradas pela co-estimulação com ISO e ADP. O bloqueio seletivo dos receptores P2Y₁ por A3'P5'P inibiu de maneira dependente de concentração o efeito potenciador do ADP sobre a produção de NAS induzida por ISO, mas não reverteu a inibição observada nos níveis de melatonina. Estes resultados apontam para um mecanismo diferencial de modulação da produção de NAS e MEL abrindo novas perspectivas ao estudo dos mecanismos regulatórios da produção de MEL e seus metabólitos.

ABSTRACT

The biosynthesis of MEL by the pineal gland involves the conversion of serotonin to NAS by the enzyme AA-NAT, followed by methylation of NAS by the enzyme HIOMT generating MEL. The activation of β -adrenergic receptors is essential and the co-stimulation of P2Y₁ receptors potentiates noradrenaline-induced NAS production. In this study we evaluated the effect of P2Y₁ receptors stimulation on the production of MEL synthesis induced by β -adrenergic stimulation. Purinergic co-stimulation with ADP potentiated ISO-induced NAS production and inhibited melatonin content in a concentration dependent manner. In nuclear extracts from stimulated pineal glands with ADP, the nuclear translocation of AP-1 was observed, with no significant change in the nuclear translocation of the NF- κ B dimers p50/p50 and p50/RelA. PDTC, an inhibitor of NF- κ B, did not alter the content of NAS and MEL in cultured pineal glands co-stimulated with ISO and ADP. ISO and ADP co-stimulation did not alter the transcript and enzyme activity of AA-NAT and HIOMT. The selective blockade of P2Y₁ receptors by A3'P5'P inhibited, in a concentration-dependent manner, the potentiating effect of ADP on ISO-induced NAS production but did not change the inhibition observed on MEL levels. These results suggest a differential mechanism on the modulation of NAS and MEL production opening new perspectives to the study of the regulatory mechanisms involved in the biosynthesis of MEL and its metabolites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA, Cattabeni F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 48:1038-45, 1995.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58:281-341, 2006.
- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445 – 475, 1994.
- Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1072:129-57, 1991.
- Arendt J. In: Melatonin and the mammalian pineal gland. 1ª Edição. Ed. Chapman & Hall, Londres, 1 – 35, 1995.
- Baler R, Klein DC. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J Biol Chem.* 270:27319-25, 1995.
- Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53:201-207, 1993.
- Bowser DN, Khakh BS. Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol.* 129(6):485-491, 2007.
- Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci.* 47: 2336–2348, 2002.
- Burnstock G. Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci (Elite Ed).* 3:896-900, 2011.

- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87(2):659-797, 2007a.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 64:1471-1483, 2007b.
- Burnstock G. Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Symp.* 276:26-48, 2006.
- Carrillo-Vico A., Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garciamaurino S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18: 537-539, 2004.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, Guerrero JM. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:992-1000, 2005.
- Carter DA. A daily rhythm of activator protein-1 activity in the rat pineal is dependent upon trans-synaptic induction of JunB. *Neuroscience.* 62:1267-78, 1994.
- Carter DA. Rhythms of cellular immediate-early gene expression: more than just an early response. *Exp Physiol.* 82(2):237-44, 1997.
- Carter MD, Calcutt MW, Malow BA, Rose KL, Hachey DL. Quantitation of melatonin and n-acetylserotonin in human plasma by nanoflow LC-MS/MS and electrospray LC-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 47: 277-85, 2012.
- Carvalho-Sousa CE, da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK, Fernandes PA, Pinato L, Muxel SM, Cecon E, Markus RP. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2:10, 2011.

- Cecon E, Fernandes PA, Pinato L, Ferreira ZS, Markus RP. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int.* 27:52-67, 2010.
- Chattoraj A, Liu T, Zhang LS, Huang Z, Borjigin J. Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 10:237-43, 2009.
- Chik CL, Ho AK, Klein DC. Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. *Endocrinology.* 122: 702-708, 1988.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 28:193-202, 2000.
- Couto-Moraes R, Palermo-Neto J, Markus RP. The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann N Y Acad Sci.* 1153:193-202, 2009.
- da Silveira Cruz-Machado S, Pinato L, Tamura EK, Carvalho-Sousa CE, Markus RP. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One.* 7(7):e40142. Epub 2012.
- de Plaen IG, Han XB, Liu X, Hsueh W, Ghosh S, May MJ. Lipopolysaccharide induces CXCL2/macrophage inflammatory protein-2 gene expression in enterocytes via NF-kappaB activation: independence from endogenous TNF-alpha and platelet-activating factor. *Immunology.* 118: 153-63, 2006.
- Djeridane Y, Vivien-Roels B, Simonneaux V, Miguez JM, Pévet P. Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. *J Pineal Res.* 25:54-64, 1998.
- Dubocovich ML & Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 27(2): 101-10, 2005.

- Ferrari D, Wesselborg S, Bauer MK, Schulze-Osthoff K. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol.* 139:1635-43, 1997.
- Ferreira ZS & Markus RP. - Characterization of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur. J. Pharmacol.* 415: 151-156, 2001.
- Ferreira ZS, Cipolla-Neto J & Markus RP. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Brit. J. Pharmacol.* 112: 107-110, 1994.
- Ferreira ZS, Fernandes PACM, Duma D, Assreuy J, Avellar MCW & Markus RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappaB. *J Pineal Res.* 38: 182-188, 2005.
- Ferreira ZS, Garcia CRS, Spray DC, Markus RP. P2Y1 receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology.* 69: 33-37, 2003.
- Fischer TW, Slominski A, Zmijewski MA, Reiter RJ, Paus R. Melatonin as a majorskin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp Dermatol.* 17:713-30, 2008.
- Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther.* Mar;109(3):297-324, 2006.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53:527-552, 2001.
- García-Marín R, de Miguel M, Fernández-Santos JM, Carrillo-Vico A, Utrilla JC, Morillo-Bernal J, Díaz-Parrado E, Rodríguez-Prieto I, Guerrero JM, Martín-Lacave I. Melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptor in rat thyroid cells. *Histol Histopathol.* 27(11):1429-38, 2012.
- Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear

- receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 159:574-81, 1997.
- Gharib A, Delton I, Lagarde M, Sarda N. Evidence for adenosine A2b receptors in the rat pineal gland. *Eur. J. Pharmacol.* 225(4):359-360, 1992.
- Gharib A, Reynaud D, Sarda N, Vivien-Roels B, Pévet P, Pacheco H. Adenosine analogs elevate N-acetylserotonin and melatonin in rat pineal gland. *Neurosci. Lett.* 106(3):345-349, 1989.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.* 12:685-93, 1998.
- Guillaumond F, Sage D, Deprez P, Bosler O, Becquet D & Francois-Bellan AM. Circadian binding activity of ap-1, a regulator of the arylalkylamine n-acetyltransferase gene in the rat pineal gland, depends on circadian fra-2, c-jun, and jun-d expression and is regulated by the clock's zeitgebers. *J. Neurochem.* 75:1398-1407, 2000.
- Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors*, 35(2): 183-192, 2009.
- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 132:344-362, 2008.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin." *J. Biol. Chem.* 249:1311-1313, 1974.
- Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 51:945-53, 1992.

- Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. 49:665-70, 1993.
- Itoh MT, Ishizuka B, Kuribayashi Y, Amemiya A, Sumi Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol. Hum. Reprod*. 5:402-408, 1999.
- Iuvone PM, Brown AD, Haque R, Weller J, Zawilska JB, Chaurasia SS, Ma M, Klein DC. Retinal melatonin production: role of proteasomal proteolysis in circadian and photic control of arylalkylamine N-acetyltransferase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43:564-72, 2002.
- Iuvone PM, Besharse JC. Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogs. *Brain Res*. 273:111-9, 1983.
- Jang SW, Liu X, Pradoldej S, Tosini G, Chang Q, Iuvone PM, Ye K. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:3876-81, 2010.
- Jiang Y, Chen G, Zheng Y, Lu L, Wu C, Zhang Y, Liu Q, Cao X. TLR4 signaling induces functional nerve growth factor receptor p75NTR on mouse dendritic cells via p38MAPK and NF-kappa B pathways. *Mol Immunol*. 45: 1557-66, 2008.
- Klein DC, Auerbach DA, Namboodiri MAA, Weller GHT. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In: Reiter RJ. *The Pineal Gland*. Boca Raton: CRC Press, 1981.
- Klein DC, Ganguly S, Coon S, Weller JL, Obsil T, Hickman A & Dyda F. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 365-373, 2002.

- Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174: 245-262, 1979.
- Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:599-603, 1983.
- Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in n-acetyltransferase. *Science.* 169: 1093-1095, 1970.
- Klein DC. The pineal gene expression party: who's the surprise guest? *Endocrinology.* 148:1463-1464, 2007.
- Köles L, Gerevich Z, Oliveira JF, Zadori ZS, Wirkner K, Illes P. Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 377(1):1-33, 2008.
- Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J.* 31:1-12, 1999.
- Liu T, Borjigin J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J. Pineal Res.* 39:91-96, 2005.
- Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood.* 106:3860-3866, 2005.
- Mennenga K, Ueck M, Reiter RJ. Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J Pineal Res.* 10:159-64, 1991.
- Mikkelsen JD, Møller M. Neuropeptide Y in the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Tech.* 46:239-256, 1999.
- Møller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 309:139-50, 2002.

- Mortani Barbosa EJ, Ferreira ZS, Markus RP. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol.* 401:59-62, 2000.
- Naranjo MC, Guerrero JM, Rubio A, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Carrascosa-Salmoral MP, Jiménez-Jorge S, Arellano MV, Leal-Noval SR, Leal M, Lissen E, Molinero P. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cell Mol Life Sci.* 64(6):781-90, 2007.
- Nicholls J, Skene DJ, Hourani SM. Use of a newly developed technique to isolate rat pinealocytes and study the effects of adenosine agonists on melatonin production. *J Pineal Res.* 23(3):164-8, 1997.
- Nikodijevic O & Klein DC. Adenosine stimulates adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate accumulation in rat pinealocytes: evidence for a role for adenosine in pineal neurotransmission. *Endocrinology.* 125: 2150 -2157, 1989.
- Nonaka KO, Reiter RJ, Withyachumnarnkul B, Stokkan KA, Lerchl A. Adenosine effects on the rat pineal gland in vitro: cyclic adenosine monophosphate levels, N-acetyltransferase, and thyroxine type II 5'-deiodinase activities and melatonin production. *J Pineal Res.* 11:1-6, 1991.
- Nordio M, Conte D, Nonaka KO, Reiter RJ, Isidori A. Failure to stimulate melatonin synthesis in the rat pineal gland with an adenosine analog. *Psychoneuroendocrinology.* 17(2-3):249-54, 1992.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275(40):31311-7, 2000.
- Panger B, Panger A, Reiter RJ. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm.* 81: 17-29, 1990.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhatsky A, North RA. Quantal release of ATP in mouse cortex. *J. Gen. Physiol.* 129(3):257-65, 2007.

- Parfitt A, Weller JL, Klein DC. Beta-adrenergic blockers decrease adrenergically stimulated n-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. *Neuropharmacology*. 15:353-358, 1976.
- Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*. 41: 136-141, 2006.
- Provêncio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosc*. 20: 600-605, 2000.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev*. 50:413-492, 1998.
- Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J. Biol. Rhythms*. 14:105-115, 1999b.
- Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology*. 140:1375-1384, 1999a.
- Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res*. 777:247-250, 1997.
- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch*. 452:486-500, 2006.
- Romero JA, Axelrod J. Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. *Science*. 184: 1091-1092, 1974.

- Ryseck RP, Hirai SI, Yaniv M, Bravo R. Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature*. 334:535-537, 1988.
- Sabirov RZ, Okada Y. ATP release via anion channels. *Purinergic Signal*. 1:311-328, 2005.
- Sarda N, Gharib A, Reynaud D, Ou L, Pacheco H. Identification of adenosine receptor in rat pineal gland: evidence for A-2 selectivity. *J Neurochem*. 53:733-737, 1989.
- Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Lamph WW, Verma IM. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature*. 336:692-695, 1988.
- Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron. Glia. Biol*. 3(3):199-208, 2007.
- Schon F, Allen JM, Yeats JC, Allen YS, Ballesta J, Polak JM, Kelly JS, Bloom SR. Neuropeptide Y innervation of the rodent pineal gland and cerebral blood vessels. *Neurosci Lett*. 57:65-71, 1985.
- Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res*. 16(4): 198-201, 1994.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev*. 55:325-395, 2003.
- Simonneaux V, Rodeau JL, Calgari C, Pévet P. Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. *Eur J Neurosci*. 11:725-8, 1999.
- Slominski A, Baker J, Rosano TG, Guisti LW, Ermak G, Grande M, Gaudet SJ. Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin/melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. *J Biol Chem*. 271: 12281-12286, 1996.

- Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniewski A, Slugocki G, McNulty J, Kauser S, Tobin DJ, Jing C, Johansson O. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J.* 16: 896-898, 2002.
- Sompol P, Liu X, Baba K, Paul KN, Tosini G, Iuvone PM, Ye K. N-acetylserotonin promotes hippocampal neuroprogenitor cell proliferation in sleep-deprived mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8844–8849, 2011.
- Sperlágh B, Vizi ES. Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Semin. Neurosci.* 8(4):175–186, 1996.
- Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, 365: 314–320, 1993.
- Stokkan KA, Reiter RJ, Nonaka KO, Lerchl A, Yu BP, Vaughan MK. Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain Res.* 545:66–72, 1991.
- Sugden AL, Sugden D, Klein DC. Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J. Biol. Chem.* 261:11608-11612, 1986.
- Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 45:922-32, 1989.
- Suh BC, Kim TD, Lee JU, Seong JK, Kim KT. Pharmacological characterization of adenosine receptors in PGT-beta mouse pineal gland tumour cells. *Br. J. Pharmacol.* 134:132-42, 2001.
- Suh BC, Son JH, Joh TH, Kim KT. Two distinct P2 purinergic receptors, P2Y and P2U, are coupled to phospholipase C in mouse pineal gland tumor cells. *J. Neurochem.* 68(4):1622-32, 1997.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Broto L, Reiter RJ. The changing biological roles of

- melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 85:607-23, 2010.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta.*1472:206-214. 1999.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 42:28-42, 2007.
- Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids.* 61(2):65-8, 1996.
- Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J.* 21:3866-71, 2007.
- Tosini G, Ye K, Iuvone PM. N-Acetylserotonin: Neuroprotection, Neurogenesis, and the Sleepy Brain. *Neuroscientist.* 2012.
- Troiani ME, Reiter RJ, Tannenbaum MG, Puig-Domingo M, Guerrero JM, Menendez-Pelaez A. Neither the pituitary gland nor the sympathetic nervous system is responsible for eliciting the large drop in elevated rat pineal melatonin levels due to swimming. *J. Neural Transm.* 74:149-160, 1988a.
- Troiani ME, Reiter RJ, Vaughan MK, Oaknin S, Vaughan GM. Swimming depresses nighttime melatonin content without changing N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology.* 47:55-60, 1988b.

- Tzavara, E.T., Pouille, Y., Defer, N. & Hanoune, J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 11208-11212, 1996.
- Ueck M, Troiani ME, Reiter RJ. Transient reduction in pineal melatonin levels but not N-acetyltransferase activity in rats forced to swim for 15 minutes at night. *Neuroendocrinol Lett*. 10:81-89, 1988.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*. 9:2723-35, 1995.
- von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptorsubtypes. *Pharmacol Ther*. 110(3):415-32, 2006.
- Wolchok JD, Goodman AR, Vilcek J. Activation of NF-kappa B may be necessary but is not sufficient for induction of H-2 antigens by TNF in J558L murine myeloma cells. *J. Leukoc Biol*. 55: 7-12, 1994.
- Womac, A.D.; Burkeen, J.F.; Neuendorff, N; Earnest, D.J.; Zoran, M.J. Circadian Rhythms of Extracellular ATP Accumulation in SCN Cells and Cultured Astrocytes. *Eur J Neurosci*. 30(5): 869-876, 2009.
- Wu WT, Reiter RJ, Troiani ME, Vaughan GM. Elevated daytime rat pineal and serum melatonin levels induced by isoproterenol are depressed by swimming. *Life Sci*. 41:1473-1479, 1987.
- Zhang ET, Mikkelsen JD, Møller M. Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res*. 265:63-71, 1991.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol*. 9(8):945-953, 2007.

- Ziegler-Heitbrock HW, Sternsdorf T, Liese J, Belohradsky B, Weber C, Wedel A, Schreck R, Bäuerle P, Ströbel M. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J. Immunol.* 151: 6986-6993, 1993.
- Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* 276:113-28; discussion 128-30, 233-7, 275-81, 2006.
- Zmijewski MA, Sweatman TW, Slominski AT. The melatonin-producing system is fully functional in retinal pigment epithelium (ARPE-19). *Mol Cell Endocrinol.* 307: 211-216, 2009.

SÚMULA CURRICULAR

Nome: Camila Lopes Petrilli

Data de nascimento: 27/12/1984

Local de nascimento: São Paulo – SP, Brasil

Endereço eletrônico: camipetrilli@msn.com

Formação Acadêmica/Titulação

2009 – 2012: Mestrado em Fisiologia.

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

Título da dissertação: Regulação da atividade da glândula pineal por estimulação purinérgica.

Orientação: Profa. Dr^a Zulma F. S. Ferreira.

Bolsa: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo N^o **2009/12307-8**, vigência: 08/2010 – 10/2011); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, vigência: 11/2009 – 07/2010).

2005 – 2008: Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

Instituição: UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências e Letras de Assis.

Título da iniciação científica: Sono e Qualidade de Vida de Deficientes Visuais.

Orientação: Prof^a. Dr^a Miriam Mendonça Morato de Andrade

Resumos Apresentados em Anais de Eventos Internacionais

FERREIRA, Z. S.; PETRILLI, C. L.; Mori, D.P.; Souza-Teodoro, L.H.; Souza, G.; Garcia, L. D A.; MARKUS, R. P. Purinergic stimulation differentially modulates pineal gland activity. In: Faseb Summer Research Conference-Melatonin receptors Actions and Therapeutics, 2011, Snowmass Village. **Anais da FASEB Summer Research Conference-Melatonin receptors Actions and Therapeutics, 2011.**

Resumos Apresentados em Anais de Eventos Nacionais

GARCIA, L.D., PETRILLI, C.L., TEODORO, L.H.S., MARKUS, R.P., FERREIRA, Z.S. DIFFERENTIAL EFFECTS OF PURINERGIC STIMULATION ON MELATONIN BIOSYNTHETIC PATHWAY IN THE RAT PINEAL GLAND. In: 3º Encontro do Clube Brasileiro de Purinas, 2012, Ouro Preto, MG. **Anais do 3º Encontro do Clube Brasileiro de Purinas, 2012.**

PETRILLI, C. L.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. DUAL MODULATORY ROLE OF PURINERGIC RECEPTOR STIMULATION ON PINEAL GLAND ACTIVITY. In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2011, Rio de Janeiro. **Anais do XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2011.**

Mori, D.P.; PETRILLI, C. L.; Garcia, L. D A.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. CIRCADIAN EXPRESSION OF P2Y1 RECEPTORS IN THE RAT PINEAL GLAND IMPACT ON THE MODULATION OF PINEAL GLAND ACTIVITY. In: 2º Encontro do Clube Brasileiro de Purinas, 2011, Rio de Janeiro. **Anais do 2º Encontro do Clube Brasileiro de Purinas, 2011.**

PETRILLI, C. L.; SOUSA, C. E. C.; MUXEL, S. M.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. P2Y1 RECEPTORS STIMULATION ON RAT PINEAL GLANDS: EFFECTS ON NUCLEAR FACTOR KAPPA B PATHWAY (NFKB) AND INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS). In: 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica

Experimental, 2010, Ribeirão Preto. **Anais do 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010.**

PETRILLI, C. L.; MARTINS, J. M.; SOUSA, C. E. C.; PINATO, L.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. IMMUNOLOCALIZATION OF P2Y1 RECEPTOR IN THE RAT PINEAL GLAND.. In: 1º Encontro do Clube Brasileiro das Purinas: Sinalização Purinérgica e Implicações Terapêuticas, 2010, Águas de Lindóia. **Anais do 1º Encontro do Clube Brasileiro das Purinas: Sinalização Purinérgica e Implicações Terapêuticas, 2010.**

SOUSA, C. E. C.; FERNANDES, P. A. C. M ; TAMURA, E. K. ; **PETRILLI, C. L.;** MARKUS, R. P. TNF induces iNOS expression by pineal cells through a mechanism dependent of NFkB. In: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. **Anais do 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia, 2009.**

Outras Atividades Acadêmicas Relevantes

Atividades Didáticas

2011: Estágio supervisionado realizado dentro do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE), referente a atividades didáticas junto à disciplina BIF0217 - Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptação da Comunicação e Integração, ministrada no curso de graduação em Ciências Biológicas da USP, com supervisão do Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier.

2011: Aula ministrada no VIII Curso de Inverno: Tópicos em Fisiologia Comparativa, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo: Bases Cronobiológicas da Fisiologia: Estudo de Casos. Petrilli, C. L.; Franco, D.

2010: Estágio supervisionado do aluno Rodrigo Teodoro Monteiro participante do VII Curso de Inverno: Tópicos em Fisiologia Comparativa. Projeto: Avaliação da influência da atividade purinérgica na síntese de melatonina mediada por glicocorticóide. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/016/2010
Ref. 2010.1.132.41.3

São Paulo, 22 de abril de 2010.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 20/04/2010, **APROVOU** o Projeto "Regulação da atividade da glândula pineal por glicocorticóides mediada por estimulação purinérgica" – **Protocolo 106/2010**, de sua responsabilidade (Colaboradoras: Camila Lopes Petrilli e Débora Aparecida Moura).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Eleonora Trajano

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

Ilma. Sra.

Prof. Dra. ZULMA FELISBINA DA SILVA FERREIRA

Departamento de Fisiologia BUSP.