

Luis Henrique de Souza Teodoro

Caracterização Funcional do Receptor P2X7 na Glândula Pineal de Rato

São Paulo

2013

Luis Henrique de Souza Teodoro

Caracterização Funcional do Receptor P2X7 na Glândula Pineal de Rato

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

Versão corrigida

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zulma Felisbina da Silva Ferreira

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Souza-Teodoro, Luis Henrique

Caracterização Funcional do Receptor P2X7 na Glândula Pineal de
Rato / Luis Henrique de Souza Teodoro ; orientadora Zulma F. S. Ferreira.
São Paulo, 2013.

111 f.

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

1. Glândula Pineal. 2. Receptor P2X7. 3. ATP. 4. 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). Orientador

"Você é quem decide o que vai ser eterno em você, no seu coração.

Deus nos dá o dom de eternizar em nós o que vale a pena, e

esquecer definitivamente aquilo que não vale..."

- Padre Fábio de Melo

Agradecimentos

Agradeço muito a Universidade de São Paulo, ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia pela oportunidade, suporte e formação. Foram portas abertas que sempre permearão minha memória.

Agradeço imensamente a todos os integrantes do Laboratório de Cronofarmacologia. Sinto-me privilegiado por participar de um grupo tão competente e compromissado, no qual, inclusive, fiz amigos que merecem agradecimentos especiais.

Débora e Eduardo. Agradeço-lhes não apenas pelo suporte técnico conferido, mas por todas as horas que passamos juntos, por todo o apoio que me deram de muitas e variadas formas. Trabalhar com vocês foi uma experiência muito gratificante.

Sanseray. Amigo, sua determinação é admirável e seu apoio foi fundamental. Mas mais importante que isso, perto ou longe, você sempre acreditou em mim. Meu muito obrigado por tudo.

Letícia, Gabriela e Danilo. Agradeço muito ao apoio de vocês e a todos os passos que demos juntos.

Flávia e Adriessa, meninas, vocês são incríveis. Nutro uma admiração formidável pela forma como são aguerridas, pelo sorriso espontâneo, por serem tão solícitas e amigas. Meus dias são muito melhores na companhia de vocês.

Erika. Você sempre foi um exemplo de aplicação. Obrigado por cada palavra que, nas mais diferentes situações, você sempre teve para comigo na certeza de que me ajudariam a crescer. Eu também tenho essa certeza e lhe agradeço muitíssimo!

Daiane e Cláudia. Bem sei o quanto eu devo agradecê-las. Desde o primeiro experimento que acompanhei no laboratório, até o último, sempre pude contar com o apoio de vocês. Sou muito, muito agradecido por todo o suporte, por todo o carinho e por todas as horas de muitas, muitas conversas. Vocês foram fundamentais.

Marina, Camila e Marquinho. Incontáveis serão as memórias que carrego de vocês. Não importa quantas linhas eu escrevesse, seria pouco pra descrever ainda que um pouco do quanto gosto de vocês e da amizade que construímos ao longo desses anos. Eu sei que é pouco, mas deixo aqui meu muito obrigado, na certeza de que ainda terei muitos anos pela frente com vocês para agradecê-los.

Ao Doutor Pedro. Por cada sorriso, por cada experimento, por ser tão solícito, por ser tão competente, por ser tão didático e por uma infinidade de outros bons adjetivos. Obrigado.

A Doutora Regina. A construção de um grupo de pesquisa como este, merecedor de tantos elogios, com certeza passa pelas suas mãos e por suas conquistas na ciência. Mas mais do que isso, por ter sabido exatamente como tirar o melhor de mim em diversas situações e ter me ajudado a crescer, eu lhe agradeço sincera e imensamente.

A Doutora Zulma, minha orientadora. Eu tinha um sonho e este não poderia ser realizado sem a sua participação. Meu muito obrigado por ter acreditado em mim, especialmente por ter acreditado quando eu mesmo duvidei. Minha sincera admiração e eterno obrigado.

Agradeço também ao auxílio da Doutora Patrícia Castelucci, que cordialmente nos auxiliou cedendo o anticorpo para o receptor P2X7.

Ao corpo gestor do colégio em que trabalho, especialmente ao diretor João, as assistentes Rita e Inês, e a secretária Sueli, por todo apoio e compreensão. Jamais teria sido possível sem o suporte de vocês. Aos muitos amigos professores que fiz, sempre dispostos a transformar meu dia em uma tarefa mais simples.

Meu muito obrigado para a família Xavier, que me ampara desde muito novo, como minha segunda família.

Agradeço também a alguns amigos mais do que especiais. Ao meu amigo Confortini, por ter sido um exemplo e excepcional amigo. Rômulo e Deusa, pela integridade, pelo apoio e pela amizade. Leonardo e Luiz Gustavo, por toda a irmandade que contruímos. Vocês todos tem um espaço único no meu coração.

Aos amigos que o esporte me trouxe e que hoje são minha família: Victória, Diogo, Gil, Rogério, Wagner, Juninho, Alessandra, Anízio, Bruna e Mauricio.

Sartorato, por ter me reacendido a fé. E por ser uma inspiração - incorruptível.

Ao meu irmão, pai e mãe. A unicidade do nosso amor é o que me move.

Ao Senhor, por cada dia, por esta vida.

Índice

_Toc368316265

Introdução	1
A glândula pineal	1
Origem, anatomia, histologia, invervação e fotorrecepção	1
Síntese de melatonina.....	3
Sítios de atuação e metabolização da melatonina	6
O eixo imune-pineal	11
O sistema purinérgico	13
Purinas e pirimidinas	13
Receptores purinérgicos	15
Enzimas de metabolização	17
Receptores purinérgicos na glândula pineal	19
O receptor P2X7	23
Características gerais.....	23
Farmacologia do receptor P2X7.....	27
Sinalização intracelular	29
Objetivos.....	35
Materiais e métodos	37
Animais	37
Drogas e reagentes	38
Preparo de soluções	39
Cultura de glândula pineal	40
Cultura primária de pinealócitos	40

Protocolo experimental	40
Determinação do conteúdo de indolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	41
Extração de RNA	43
Síntese da fita de DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa.	43
Desenho dos primers.....	44
RT-PCR	44
Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal	46
Dosagem de TNF	47
Determinação do conteúdo de melatonina por ELISA	47
Análise dos resultados	48
Resultados.....	49
Expressão do RNAm e da proteína do receptor P2X7	49
Efeito da estimulação purinérgica sobre a síntese de melatonina induzida por isoprenalina	51
Estudo com agonistas.....	49
Estudo com antagonistas	52
Estimulação purinérgica e a metabolização de melatonina em glândulas pineais em cultura	54
Mecanismos intracelulares envolvidos na estimulação purinérgica em glândulas pineais em cultura	56
Efeito da adenosina sobre a síntese de melatonina	59
Efeito da estimulação purinérgica sobre a síntese de TNF induzida por LPS	60
Síntese de TNF: estudo com agonistas.....	60
Síntese de TNF: estudo com antagonistas.....	61
Discussão	65
Expressão do RNAm e da proteína do receptor P2X7.....	66

Síntese de indolaminas induzidas por ISO	67
Metabolização de melatonina	70
Mecanismos intracelulares.....	71
Síntese de TNF induzida por LPS.....	75
Conclusões.....	78
RESUMO	79
ABSTRACT	80
Referências bibliográficas	80
Súmula curricular	106

Lista de abreviaturas

5-HTP	5-hidroxitriptofano
NTPDase1	Ectonucleosídeo-trifosfato-disfosfohidrolase 1
NTPDase2	Ectonucleosídeo-trifosfato-disfosfohidrolase 2
NTPDase3	Ectonucleosídeo-trifosfato-disfosfohidrolase 3
NTPDase8	Ectonucleosídeo-trifosfato-disfosfohidrolase 8
6-OH-melatonina	6-hidroximelatonina
AAAD	Descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AA-NAT	Arilaquilamina N-acetiltransferase
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADP	Difosfato de adenosina
AFMK	<i>N-acetyl-N-formil-5-methoxykynuramine</i>
Ag/AgCl	Prata/cloreto de prata
AMK	<i>N-acetyl-5-methoxykynuramine</i>
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BBG	<i>Brilliant Blue G</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
bp	Basis pair
BzATP	2'3'-(benzoil-4-benzoil)-adenosina-5'-trifosfato
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding</i>
CYP450	Citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Corrente contínua
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>Deoxynucleotide</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENPP1	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1
ENPP2	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 2
ENPP3	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 3
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GABA	Ácido gama aminobutírico
Gapdh	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>

HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HIOMT	Hidroxildol O-metiltransferase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
I1	Corrente aguda
I2	Corrente tardia
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IGL	Folheto intergeniculado hipotalâmico
IL	Interleucina
IFN	Intérferon
IP3	Trifosfato de inositol
ISO	Isoprenalina
KCl	Cloreto de sódio
KH2PO4	Fosfato monopotássico
KN62	<i>1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4- phenylpiperazine</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MT	Receptor de melatonina
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO3	Bicarbonato de sódio
NALP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NAS	N-acetilserotoninina
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
NMDG	<i>N-methyl-D-glucamine</i>
NMM	Miosina não-muscular
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OH⁻	Hidroxila
oxiATP	<i>oxidizedATP</i>
p-AA-NAT	Arilaquilamina N-acetiltransferase fosforilada
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerization chain reaction</i>
PDTc	<i>Pyrrolidine dithiocarbamate</i>
Pi	Fósforo inorgânico
PK	Proteína quinase
PL	Fosfolipase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPADS	<i>Pyridoxalphosfato-6-azophenyl-2'-4-disulfonate</i>
PVN	Núcleo paraventricular
RAW 264.7	<i>Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR	<i>Reverse transcription - Polymerization chain reaction</i>
SNC	Sistema nervoso central
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumour necrosis factor receptor</i>
TPOH	Triptofano hidroxilase
UTP	Trifosfato de uracila
UV	Luz ultravioleta

Introdução

A glândula pineal

Origem, anatomia, histologia, invervação e fotorrecepção

A glândula pineal é um órgão neuroendócrino que converte o sinal fótico ambiental em mensagens químicas, provendo informações temporais para o organismo. Descrita em todos os vertebrados, apresenta capacidade fotorreceptora em peixes, anfíbios, répteis e em algumas espécies passariformes, dada sua homologia às células da retina. Em mamíferos, embora ainda apresente marcadores de fotorrecepção (rodopsina e recoverina, por exemplo), a capacidade fotorreceptora é perdida tornando-se subserviente às informações dos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), sede do relógio biológico central (Vollrath, 1981; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Anatomicamente é considerada parte integrante do epitélamo. Em humanos, origina-se de uma evaginação do teto do III ventrículo do diencéfalo e situa-se na porção dorsal do tronco cerebral ligando-se através de um pedúnculo às comissuras habenular e posterior (Arendt, 1995).

Histologicamente a glândula pineal é composta por diversos tipos celulares destacando-se microglia, astrócitos e os pinealócitos, neurônios que sofrem diferenciação durante a ontogênese (Arendt, 1995; Ekstrom e Meissl, 2003; Moller e Baeres, 2002).

Diversas inervações atingem a glândula pineal, como as provenientes do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), do gânglio trigemial, do folheto intergeniculado talâmico (IGL), do núcleo dorsal da rafe e das comissuras habenular e posterior. Todavia, a mais relevante para o metabolismo da glândula é a ineração pós-ganglionar simpática (Kappers, 1960; Reuss, 1999; Leander et al., 1999; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Em mamíferos, a percepção do fotoperíodo é decorrente da sinalização das fibras retino-hipotalâmicas aos NSQs. Os NSQs, através de uma estimulação glutamatérgica comunicam-se com o PVN que, por sua vez, inerva a coluna intermédio-lateral da medula espinal. A partir desta, fibras nervosas eferentes comunicam-se com o gânglio cervical superior que, por meio dos nervos conários, projetam-se para a glândula pineal (Teclemariam-Mesbah et al., 1999; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Durante a fase de claro a alta intensidade luminosa é captada pela retina através do fotopigmento melanopsina presente nas células ganglionares. Este sinal fótico é traduzido em um sinal elétrico que é transmitido pelo nervo óptico retino-hipotalâmico para os NSQs (Kalsbeek, 2000; Provencio et al., 2000). Vias eferentes que se projetam dos NSQs para o PVN liberam o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) que, nesse contexto, desempenha um sinal inibitório sobre a atividade do PVN (Cipolla-Neto et al., 1995;

Teclemariam-Mesbah et al., 1999; Kalsbeek et al., 2000; Sakai et al., 2001).

Síntese de melatonina

Os eventos referentes à biossíntese de compostos indolamínicos pela glândula pineal durante a fase de escuro estão sumarizados na figura 1. O primeiro passo na síntese de melatonina ocorre com a captura do triptofano circulante pelos pinealócitos (Reiter, 1984; Reiter, 1991). Por ação da enzima triptofanohidroxilase (TPOH), este é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Posteriormente, a enzima 5-HTP descarboxilase, membro do grupo das enzimas que atuam descarboxilando aminoácidos aromáticos (AAAD), retira um grupamento carboxila do 5-HTP, formando como subproduto a serotonina (5-HT) (Snyder e Axelrod, 1964). O aumento da atividade da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) gera a N-acetilserotonina (NAS) que é, posteriormente, metilada pela enzima hidroxindol O-metiltransferase (HIOMT) formando a melatonina (Axelrod e Weissbach, 1960; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003).

A liberação de noradrenalina na fenda sináptica ativa os receptores β 1-adrenérgicos dos pinealócitos (Kappers, 1960; Klein e Weller, 1970; Klein, 1983; Klein, 1985; Tobin 2002). Estes receptores quando estimulados ativam a proteína G estimulatória (Gs) que

acarreta na ativação da enzima adenilil ciclase e aumento dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Vanececk et al., 1985). Isso promove a ativação da proteína quinase tipo A (PKA) e consequente fosforilação do fator de transcrição CREB (do inglês, sigla para “*cyclic AMP response element binding*”) que, quando fosforilado se liga à proteína coativadora CBP (do inglês, sigla para “*CREB-binding protein*”). Esse complexo migra para o núcleo onde se liga a regiões promotoras do gene da enzima AA-NAT (Baler, 1997; revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). Para que esta enzima esteja ativa e não seja rapidamente degradada, faz-se necessário um acoplamento com a proteína chaperona 14-3-3 e a fosforilação desse complexo por PKA (Ganguly et al., 2001; Klein, 2007).

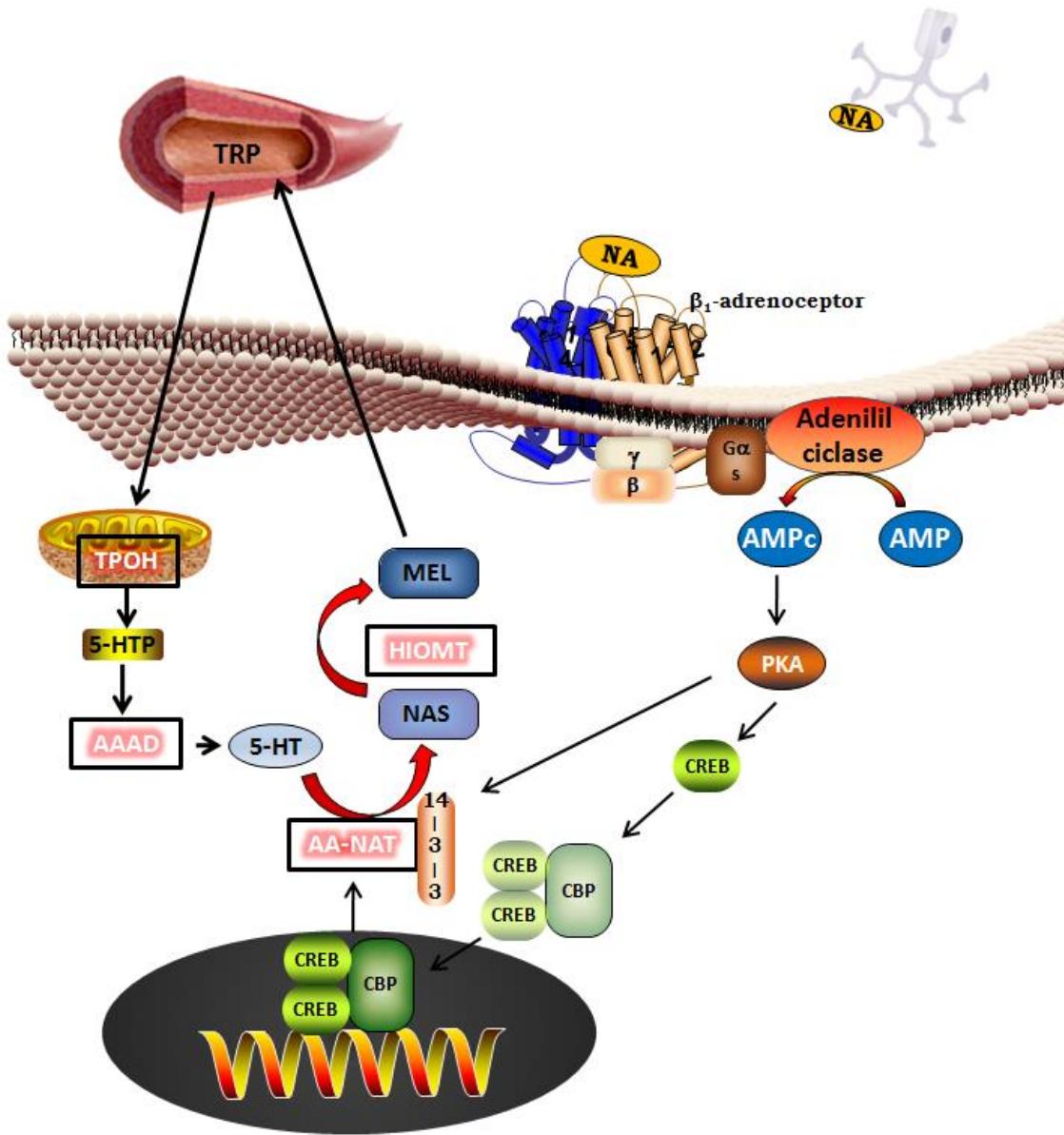


Figura 1 – Durante a fase de escuro, a estimulação β_1 -adrenérgica leva ao desprendimento da subunidade α da proteína Gs, ativando a adenilic ciclase que, por sua vez, atua convertendo AMP em AMPc. Isso leva a ativação de PKA que fosforila CREB, promovendo sua dimerização e ligação com o cofator CBP. Esse complexo migra para o núcleo e promove a transcrição gênica da enzima AA-NAT, que é rapidamente complexada com a chaperona 14-3-3 e fosforilada por PKA, catalisando 5-HT em NAS, que por ação da HIOMT, é convertida em melatonina.

Sítios de atuação e metabolização da melatonina

A melatonina apresenta função cronobiótica, atuando como um *zeitgeber* (do alemão, doador de tempo), levando as informações de tempo a todo o organismo conferindo-lhe assim a capacidade de antecipação às variações ambientais (revisto por Simonneaux e Ribelayga, 2003). Sua ação pode ser desencadeada através dos receptores de membrana MT1 e MT2 e também diretamente em alvos intracelulares devido a sua alta solubilidade como, por exemplo, inibição da interação cálcio-calmodulina e de fatores de transcrição como o *nuclear factor kB* (NF-*kB*) (Benitez-King e Anton-Tay, 1993; Dubocovich, 2007; Nosjean et al., 2000; Cecon et al., 2010).

A melatonina na circulação tem meia vida curta sendo metabolizada no fígado por um complexo de enzimas de origem mitocondrial chamado citocromo P450 (CYP450) (Hardestrand e Poeggeler, 2012). A principal isoforma de CYP450 envolvida na metabolização hepática da melatonina é a CYP1A2, havendo também a participação da CYP1A1 e CYP2C9 (Facciolá et al., 2001). Inicialmente ocorre a hidroxilação da melatonina convertendo-a em 6-hidroximelatonina (6-OH-melatonina) e posterior conjugação com sulfato ou glucuronato para eliminação pela urina (Arendt, 1998; Facciolá et al., 2001). Esta hidroxilação da melatonina pode também ser decorrente da interação direta desta molécula com espécies reativas de oxigênio (ROS), nitrogênio (RNS) ou radicais hidroxila (OH^-). A excreção do precursor NAS é ínfima e, quando ocorre, não

apresenta hidroxilação sendo diretamente eliminada em sua forma conjugada com glucuronato ou sulfato (Ma et al., 2008).

A melatonina também pode sofrer um processo de demetilação por ação da CYP1A1, CYP2C9 e CYP2C19 (Ma et al., 2005; Pandi-Perumal et al., 2006), convertendo-a em seu precursor – e também metabólito – NAS (Facciolá et al., 2001). Uma possível ação da CYP1A2 catalisando melatonina em NAS também é considerada, embora em menor escala (Ma et al., 2005; Pandi-Perumal et al., 2006).

De origem mitocondrial, as CYPs são geneticamente passíveis de atuar em virtualmente todos os tecidos e possuem múltiplos substratos de atuação que não a melatonina. Apresenta expressão em células do sistema nervoso central (SNC) (Meyer, et. al, 2007), na barreira hemato-encefálica (Declèves et al., 2011) e podem estar presentes na glândula pineal podendo agir inespecificamente catalisando a 6-hidroxilação ou a O-demetilação da melatonina, convertendo-a em seus metabólitos, respectivamente, 6-OH-melatonina e NAS (Hardestrand, 2010). A figura 2 resume as principais CYPs que medeiam a catálise de melatonina aqui descrita.

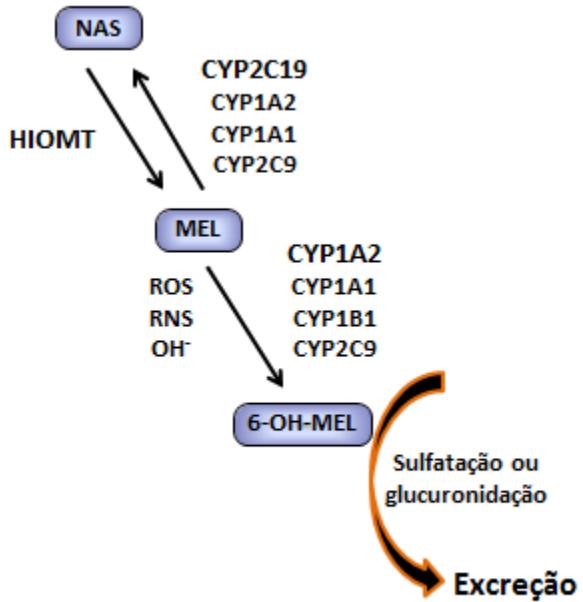


Figura 2 – Complexo de enzimas citocromo P450 (CYP450) envolvidas na metabolização de melatonina. A metabolização de primeira passagem da melatonina ocorre no fígado por ação das CYPs, levando a formação de 6-OH-melatonina, o que sofre, posteriormente, sulfatação ou glucoronidação no leito renal para sua excreção. Todavia, melatonina também pode ser convertida em NAS através de diferentes isoformas de CYPs, como as presentes no SNC.

Contrastando com a pequena participação das CYPs na conversão de indolaminas, os principais metabólitos da melatonina no SNC foram identificados como as quinuraminas AFMK (do inglês, sigla para *N-acetyl-N-formil-5-metoxikynuramine*) e AMK (do inglês, sigla para *N-acetyl-5-methoxykynuramine*) (Hirata et al., 1974). A conversão de melatonina em AFMK era entendida como dependente da atividade da indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Tan et al., 2007). Esta enzima age através da clivagem do anel pirrólico da molécula de

melatonina e tem sua atividade aumentada pela estimulação purinérgica (Hardeland, 2010; Marteau et al., 2005). Todavia, já está descrito na literatura vias que contemplam essa conversão de modo independente da ação da IDO, como a interação com citocromo C, atividade de peroxidases, luz ultravioleta (UV) ou ROS (revisto por Tan et al., 2007).

Por sua vez, a melatonina ainda pode ser alvo de conversões não enzimáticas mediadas por reações de nitrosação, formando os compostos N-nitromelatonina e/ou N-nitrosomelatonina (Tan et al., 2007; Hardeland, 2010). Estes produtos podem ter grande relevância para o SNC na ativação de microglia, níveis tóxicos de ROS e neuroinflamação (Hardeland, 2010). As vias de conversão de melatonina no SNC estão sumarizadas na figura a seguir (figura 3).

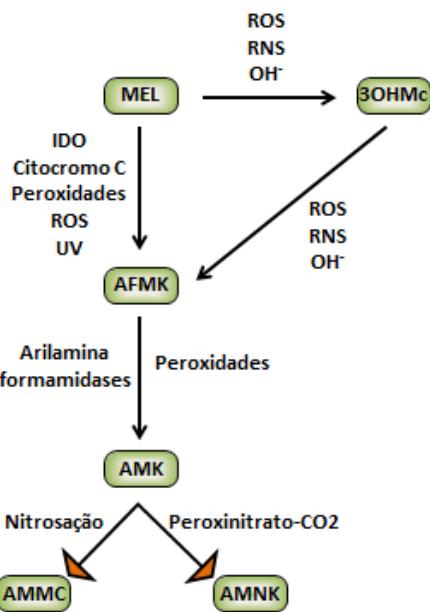


Figura 3 – Vias preferenciais de conversão de melatonina em derivados do AFMK no SNC por ação enzimática e/ou interação com espécies reativas. Melatonina pode levar a formação de AFMK por vias diretas, enzimáticas (IDO e peroxidases) e não-enzimáticas (citocromo C, ROS ou UV), ou indiretas, de acordo com interação de espécies reativas (ROS, RNS ou OH⁻), levando a formação do composto 3OHMc, um intermediário para a formação de AFMK. Formamidases e peroxidases, agindo em AFMK, levam a formação de AMK, que por ação de nitrosação e do peroxinitrato-CO₂ levam, respectivamente, a formação de AMMC (3-acetamidometil-6-metoxicinolinona) e AMNK (N-acetil-5-metoxi-3-nitroquinuramina).

Diversos são os papéis da melatonina e seus metabólitos na fisiologia dos organismos, entretanto, para este estudo, gostaríamos de salientar os eventos que se relacionam com a comunicação entre a pineal e a resposta imune inata como descrita por Markus e colaboradores (2007).

O eixo imune-pineal

A inflamação é um processo fisiológico que consiste em pelo menos duas fases - pró-inflamatória e anti-inflamatória, mediada pela atividade de células imunocompetentes em resposta a fatores endógenos ou exógenos que ofertem perigo à homeostasia. A montagem da resposta inflamatória em mamíferos é um fenômeno sincronizado e sequencial que denota a participação integrada entre a comunicação nervosa e endócrina (Markus et. al., 2007).

Uma das primeiras etapas para a montagem de uma resposta inflamatória demanda o recrutamento de células imunocompetentes advindas de outras localidades através de sinais quimiotáxicos. Este recrutamento celular implica no rolamento seguido da adesão de leucócitos às células endoteliais, permitindo a transmigração dos mesmos (Bienvenu e Granger, 1993). Foi demonstrado que esse processo é influenciado diretamente pelos níveis circulantes de melatontina que atenuam o poder de adesão e rolamento das células imunocompetentes (Lotufo et al., 2001).

A melatonina também pode ser produzida localmente por células imunocompetentes em concentrações bastante elevadas (Carrilo-Vico et al., 2004; Martins et al., 2004; Pontes et al., 2006), o que, em células mononucleares de humanos, é um estímulo positivo para a síntese de citocinas pró-inflamatórias como intérferon (IFN) tipo γ , as interleucinas (IL) tipo 2 e 6 (Garcia-Mauriño et al., 1997).

Uma vez que a glândula pineal é um órgão circunventricular (Duvernoy e Risold, 2007), a liberação de mediadores inflamatórios atinge a pineal através da circulação modulando a função neuroendócrina desta glândula. Foi demonstrado que a glândula pineal possui receptores TLR4 (do inglês, sigla para *toll-like receptor*, subtipo 4) capazes de reconhecer lipopolissacarídeo (LPS, endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram-negativas) e receptores de TNF do tipo 1 (TNFR1). O estímulo de LPS em glândulas pineais em cultura leva à produção de TNF que, ativando seus receptores na pineal levam a uma translocação nuclear de NF-κB e diminuição da síntese de NAS e melatonina (da Silveira Cruz-Machado et al., 2010; Carvalho-Sousa et al., 2011). Inversamente, corticosterona agindo em receptores de 12llicocorticoides também presentes na pineal, tem um efeito oposto potenciando a produção de melatonina (Ferreira et al., 2005; Fernandes et al., 2009).

Outras citocinas também são apontadas como capazes de alterar a função da glândula pineal, como a IL-6 e o TGF-β (do inglês, sigla para “*transforming growth factor*” β), que tem seus níveis transcricionais aumentados quando o tecido é estimulado com noradrenalina (Tsai et al., 2001). IFNγ, por sua vez, pode atuar modulando positiva ou negativamente os níveis de melatonina de acordo com a concentração (Withyachumnarnkul et al., 1990), podendo agir diretamente nos pinealócitos ou mesmo na inervação simpática (Withyachumnarnkul et al., 1991).

Se por um lado os níveis de melatonina circulante diminuem durante um quadro injuriante, localmente ocorre um aumento da síntese de melatonina por células do sistema imune (Pontes et.al., 2006). Este é um mecanismo importante para o desenvolvimento da fagocitose uma vez que o bloqueio dos receptores de melatonina inibe a fagocitose mediada por células mononucleares do colostro de humanos (Pires-Lapa et.al., 2013).

Portanto, pelo fato de se encontrar fora da barreira hematoencefálica e responsiva a diferentes ligantes presentes na circulação, como os DAMPs (do inglês, sigla para *damage-associated molecular patterns*) e PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*), a glândula pineal configura-se como um sensor participante na montagem da resposta inflamatória (Markus et al., 2007). Recentemente a literatura vem demonstrando uma importante participação da sinalização purinérgica na regulação de processos fisiológicos e, principalmente, na modulação de respostas inflamatórias como apresentamos a seguir.

O sistema purinérgico

Purinas e pirimidinas

No começo do século XX iniciam-se as demonstrações de que purinas, como adenina, guanina, cafeína e xantina, apresentam ações como mediadores extracelulares. Tal assunção começou com a

observação de um modelo cardíaco de mamíferos em que foi observada uma diminuição da frequência cardíaca e da pressão arterial a partir da estimulação purinérgica (Drury e Györgyi, 1929).

Em meados do mesmo século as pesquisas na área avançaram apontando que o trifosfato de adenosina (ATP) compunha o conteúdo de vesículas sinápticas, como demonstrado pioneiramente por Dowdall e colaboradores (1974) em vesículas colinérgicas. A hipótese de uma mesma célula nervosa liberando mais de um tipo de transmissor (Burnstock, 1976) foi recebida com ceticismo, sendo aceita como uma exceção a casos específicos. No entanto, hoje, a cotransmissão sináptica, purinérgica ou não, é sabidamente entendida e aceita como o padrão da comunicação química neuronal.

Sugere-se que o ATP estocado em vesículas seja proveniente do contingente livre produzido pela fosforilação oxidativa. Todavia, como essa molécula é altamente carregada e hidrofílica e, portanto, incapaz de atravessar membranas biológicas por difusão, foi levantada a hipótese de que haveriam mecanismos que auxiliassem nesse processo (Sperlágh e Vizi, 1996).

Investigações iniciais a respeito da vesiculação de ATP foram realizadas e apontavam para a existência de um transportador que realizasse essa função (Stadler e Fenwick, 1983; Schläfer et al., 1994). Maiores especificações a respeito desse transportador permaneceram inconclusivas até pouco tempo, quando o grupo de pesquisa de Sawada e colaboradores (2008) encontrou uma proteína

candidata a permutar o ATP citoplasmático para o interior da vesícula sináptica – a SLC17A9.

Hoje é sabido que o ATP é o principal componente purinérgico de vesículas sinápticas variando suas concentrações entre 1 e 200mM (Stjarne, 1989). No citoplasma a concentração de ATP varia entre 2 e 5 mM que podem ser liberado através de vários mecanismos: por transportadores ABC, canais de conexina, canais de panexina, canais aniônicos, apoptose e necrose/lise celular além de uma importante participação de liberação de ATP mediada pelo receptor P2X7 (Branda-Burch et al., 2012).

Receptores purinérgicos

Foi com os trabalhos de Bunrstock (1976^a; 1976b; 1976c) que foi postulado que purinas e pirimidinas agem como mediadores da atividade neuronal por meio da ativação de diferentes grupos de receptores, classificados como P1 e P2 (Burnstock, 1978).

Os receptores P1 são receptores metabotrópicos ativados por adenosina (Burnstock, 1978; Klotz, 2000) e são subdivididos em A1, A2a, A2b e A3. Os subtipos A1 e A3 são receptores acoplados a proteína Gi/0 e A2a e A2b a proteína Gs (revisto por Landolt et al., 2012).

Os receptores P2, por sua vez, possuem como agonistas endógenos os nucleotídeos di e trifosfatados e, mediante suas características de estrutura molecular e sinal de transdução, são

subdivididos em duas grandes famílias: P2Y e P2X (Burnstock e Kennedy, 1985; Abbracchio e Burnstock, 1994; Burnstock e Ralevic, 1998). A família de receptores P2Y correspondem a receptores metabotrópicos e respondem a agonistas purinérgicos di e trifosfatados. Estão caracterizados oito tipos de receptores desta família: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (Abbracchio et al., 2003). Na via de transdução o acoplamento à Gq ou Gs é característico dos receptores P2Y_{1,2,4,6,11}, enquanto o acoplamento a Gi/0 é característico dos receptores P2Y_{12,13,14} (Harden et. al, 2010). Apesar de serem receptores metabotrópicos, a literatura também descreve a participação da estimulação de receptores P2Y como capazes atuar no fechamento de alguns canais trocadores de potássio (K⁺) ou mesmo na modulação de canais voltagem-dependente de Na⁺ e Ca⁺² (Hille, 1994; Maurice et al., 2001; Dolphin, 2003).

Os receptores P2X são receptores ionotrópicos, que apresentam dois domínios transmembrânicos, hétero- ou homodiméricos, com uma alça extracelular onde se encontram os sítios de ligação para ATP, antagonistas e moduladores, apresentando-se como um trímero (Ennion et al., 2000; Jiang et al., 2000; Khakh et al., 2001; Khakh e North, 2006; Browne et al., 2010; Coddou, 2011). São descritos sete tipos de receptores P2X caracterizados como P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7. Ao serem estimulados, esses receptores permitem a passagem de cátions, como o influxo de Ca⁺² e Na⁺ e o efluxo de K⁺ de modo não seletivo e a favor do gradiente de

concentração (Browne et al., 2010; Young, 2010; Coddou, 2011; Khakh et al., 2011).

Enzimas de metabolização

O ATP extracelular pode ser alvo de ectoenzimas que hidrolisam nucleotídeos multifosfatados, convertendo-o em suas moléculas precursoras e permitindo a ativação de diferentes receptores purinérgicos (Shirley et al., 2009). Existem diferentes enzimas que realizam essa hidrólise, variando em relação à sua estrutura, substrato e produto final da catálise, conforme sumarizadas na figura 4: ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDase1,2,3,8), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP1,2,3), ecto-5'-nucleotidase e a fosfatase alcalina (para revisão Zimmermann et al., 2012).

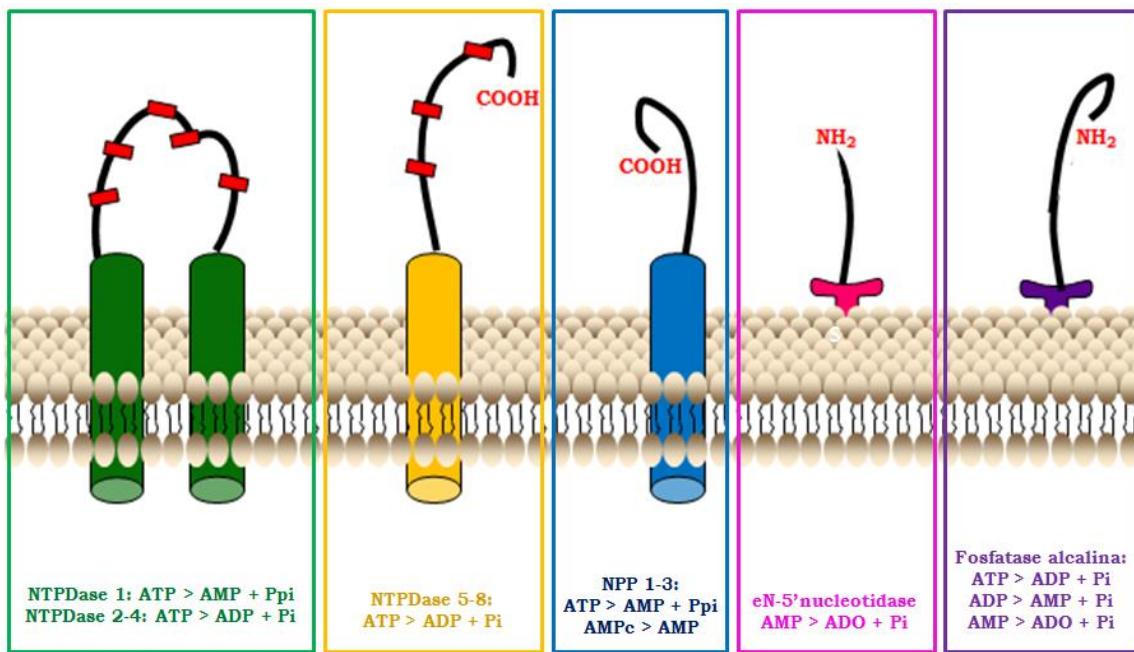


Figura 4 – Ectoenzimas que hidrolisam ATP. NTPDase 1 hidrolisa preferencialmente ATP em AMP + Ppi, enquanto outras subtipos de NTPDase agem preferencialmente convertendo ATP em ADP + Pi. As NPPs também realizam a hidrólise de purinas, mas apresentam diferente conformação proteica. A eN-5' nucleotidase promove a conversão de AMP em ADO + Pi. Por sua vez, as fosfatas alcalinas podem agir em qualquer produto de purina.

Além das ectoenzimas, conversores extracelulares de nucleotídeos promovem a troca de um grupamento fosfato (Pi) de uma molécula trifosfatada, como a uracila trifosfato (UTP), para uma molécula difosfatada, como o ADP, levando a formação de ATP. O mesmo pode ocorrer no sentido inverso, transformando, por exemplo, ATP em um UTP pelo mesmo processo (Zimmerman, 2001).

Receptores purinérgicos na glândula pineal

Em 1987, experimentos *in vivo* realizados por Gharib e colaboradores (1987) demonstraram que animais tratados com adenosina exibiam níveis elevados de melatonina. Posteriormente, Sarda e colaboradores (1989) demonstraram que a glândula pineal respondia aos análogos de adenosina que indicavam a presença de receptores A2. Outro grupo de pesquisa demonstrou que pinealócitos estimulados com adenosina apresentam níveis aumentados de AMPc, um efeito que também foi sugerido como dependente da ativação de A2 (Nikodijevic e Klein, 1989). Posteriormente, foi demonstrado que os efeitos decorrentes de adenosina na glândula pineal eram mediados pelo receptor A2b (Gharib et al., 1991). No entanto, a literatura mostrou-se controversa nesta área. Trabalhos reiteraram as demonstrações de que adenosina aumenta os níveis de AMPc, mas que isso não refletia no aumento na síntese de melatonina (Nonaka et al., 1991; Nordio et al., 1991).

A respeito da participação dos receptores purinérgicos na síntese de indolaminas, nosso grupo de pesquisa demonstrou não apenas um aumento do conteúdo de NAS mediado por adenosina, mas também a capacidade da glândula pineal a responder a estimulação purinérgica via receptores P2 (Ferreira et al., 1994).

A hipótese da liberação de ATP e noradrenina foi funcionalmente evidenciada em nosso modelo através de um ensaio

que permitiu acessar ambos os transmissores 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 NAS, enquanto que os antagonistas de receptores P2, PPADS (do inglês, sigla para “*pyridoxalphosfato-6-azopheny-2'-4-disulfonate*”) e suramina, bloquearam parcialmente esta produção, apontando para a relevância fisiológica do papel da cotransmissão noradrenérgica-purinérgica neste sistema (Mortani-Barbosa et al., 2000). Em trabalhos subsequentes, identificamos que o aumento dos níveis de NAS mediado pela estimulação purinérgica é dependente da ativação de receptores P2Y1 (Ferreira e Markus, 2001; Petrilli, 2012).

A estimulação destes receptores ativa uma proteína Gq que leva à estimulação da fosfolipase C (PLC) com geração de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃, atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação de Ca²⁺ desses estoques, tendo como consequência um aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ (Ferreira et al., 2003). O Ca²⁺ e o DAG ativam a PKC, que potencia o aumento do AMPc já induzido pela estimulação β -adrenérgica. Este efeito pode ocorrer através da fosforilação da adenilil ciclase ou da proteína Gs. O Ca²⁺ tem um papel potenciador da síntese do AMPc intracelular também por atuar

através do complexo cálcio/calmodulina na ativação da adenilil ciclase (Tzavara et al., 1996).

Surpreendentemente, apesar do precursor da melatonina estar aumentado mediante a estimulação dos receptores P2Y₁, nosso grupo de pesquisa observou nestes ensaios uma redução no conteúdo de melatonina por mecanismos que ainda precisam ser esclarecidos, uma vez que não foram observadas alterações no perfil da atividade enzimática das enzimas AA-NAT e HIOMT (Petrilli, 2012).

Os eventos decorrentes da cascata de reações a partir da ativação de receptores P2Y₁ que modulam a função pineal estão sumarizados na figura a seguir.

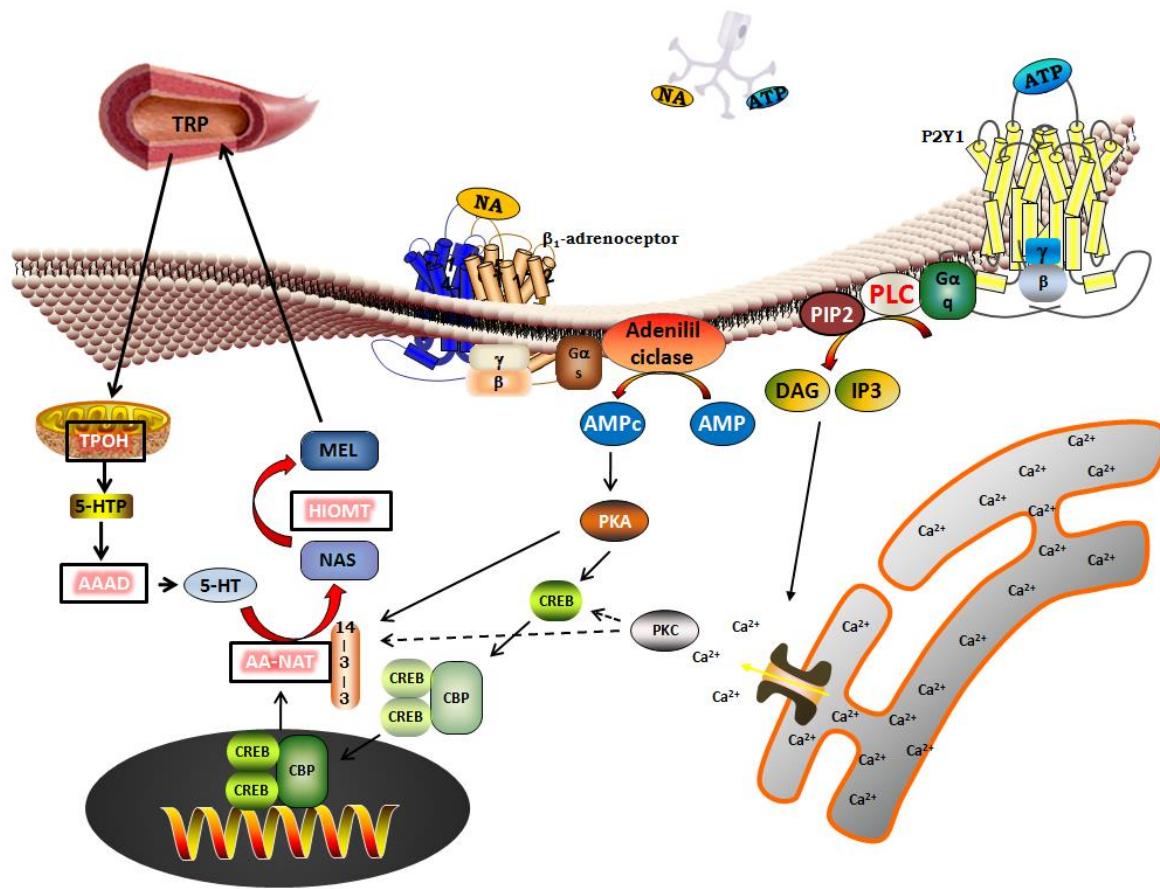


Figura 5 – Durante a fase de escuro, a estimulação β_1 -adrenérgica leva ao desprendimento da subunidade α da proteína G_s, ativando a enzima adenilil ciclase que, por sua vez, atua convertendo AMP em AMPc. Isso leva a ativação de PKA que fosforila CREB, promovendo sua dimerização e ligação com o cofator CBP. Esse complexo migra para o núcleo e promove a transcrição gênica da enzima AA-NAT, que é rapidamente complexada com a chaperona 14-3-3 e fosforilada pela PKA, catalisando 5-HT em NAS e posterior conversão em melatonina pela enzima HIOMT. A ativação de receptores P2Y₁ ativa a PLC, levando a formação de DAG e IP₃, que levam a um aumento dos níveis de Ca⁺² e ativação da PKC.

Recentemente nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que as enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares estão expressas na glândula pineal com uma variação temporal de sua transcrição e de sua atividade catalítica que se encontram aumentadas na fase de escuro, sugerindo que diferentes receptores purinérgicos podem ser ativados ao longo do dia na pineal (Ornelas et al., 2013).

Com as demonstrações de que a glândula pineal responde a estimulação purinérgica e que a melatonina é um importante componente para a função imunocompetente, buscamos avaliar, como objetivo deste trabalho, a expressão e a funcionalidade do receptor P2X7 em nosso modelo, receptor com importante papel na montagem de respostas inflamatórias (Junger, 2011).

O receptor P2X7

Características gerais

Primeiramente descrito por Buisman e colaboradores (1998), o receptor P2X7 foi clonado a partir do cérebro de ratos e intitulado receptor P2Z sendo posteriormente identificado como um subtipo de receptor P2X (Di Virgilio, 1995; Surprenant et al., 1996). Em humanos, o gene do receptor P2X7 se encontra no braço longo do cromossomo 12 (12q24.31), apresenta 53kB de comprimento e dista 23kB do gene do receptor P2X4 (Khak et al., 2001; North, 2002; Wiley et al., 2011). Sua região promotora apresenta sítios de ligação

de interesse para processos celulares como a mitogênese e apoptose, além de um sítio de ligação para NF-kB (Wiley et al., 2011). Em roedores e em humanos, sua estrutura apresenta 595 aminoácidos, sendo o mais extenso dos receptores purinérgicos (Volonté et al. 2012).

Em decorrência da ativação do receptor, é gerada uma corrente aguda (I1), que permite o influxo não-seletivo de cátions como Ca^{+2} e Na^+ , o efluxo de K^+ (Browne et al., 2010; Young, 2010) e uma possível permuta de Cl^- (Egan et al., 2006; Burnstock, 2008), respeitando as diferenças dos respectivos gradientes eletroquímicos.

Em caso de uma estimulação continuada ou em função de um estímulo mais potente, ocorre uma corrente tardia (I2) e ainda mais acentuada do que a primeira, momento no qual o receptor permite novamente a passagem de íons, além de possibilitar também a permuta de moléculas de alto peso molecular, como os corantes YO-PRO1, brometo de etídio, ou o íon orgânico NMDG (do inglês, sigla para *N-methyl-D-glucamine*), permitindo a passagem de moléculas de até 900Da (Sperlág et al., 2006; Burnstock, 2008).

Em ensaios de ativação do receptor P2X7 com bloqueadores da atividade de canais panexina-1, foi demonstrada uma inibição da passagem de moléculas alto peso molecular, mas não de I2, suscitando que ocorre uma subserviência da abertura de canais de panexina-1 pela atividade do P2X7 e que esse fenômeno é independente da geração de corrente elétrica (Yan et al., 2008; Marques-da-Silva

et al., 2011). Outros estudos apontam que os canais de panexina são permeáveis aos corantes catiônicos, mas não aos aniônicos, sendo que a passagem destes é atribuída a uma estrutura chamada poro Z (Schachter et al., 2008, revisto por Pelegrin, 2011).

De acordo com os novos componentes desse complexo e observando os resultados da cristalografia acerca dos sítios de ligação para ATP (Kawate et al., 2009), foi proposto um novo modelo para esse sistema.

Na ausência de ATP, o receptor se encontra simétrico e fechado. Quando a primeira molécula de ATP se liga ao sítio de ativação há uma mudança conformacional, levando o receptor para um estado assimétrico fechado. A ligação de uma segunda molécula de ATP leva o canal a um estado conformacional assimétrico aberto, permitindo a primeira corrente ionotrópica e diminuindo a afinidade da ligação de uma terceira molécula de ATP. Quando ocorre a ligação de uma terceira molécula de ATP o receptor atinge um novo estado, o simétrico aberto (Yan et al., 2010). Neste estado, ocorre o desprendimento das miosinas não musculares (MNN) permitindo o tráfego pelos canais de panexina-1 e poro Z.

Os eventos de ativação do P2X7R estão sumarizados na figura a seguir.

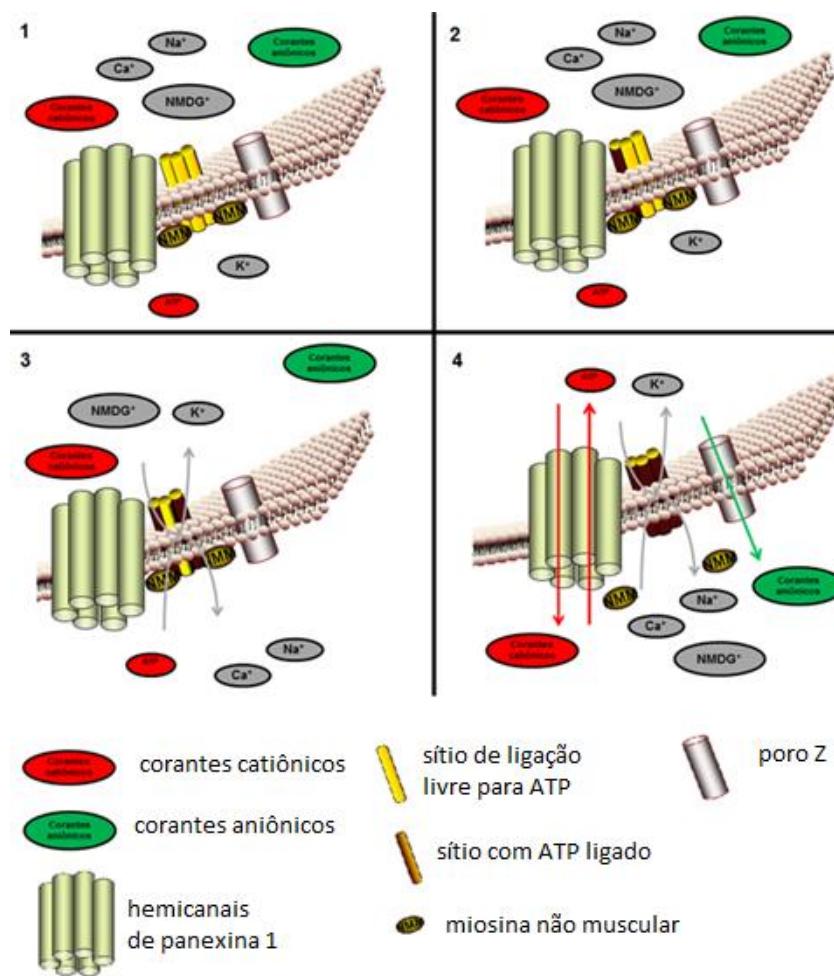


Figura 6 – Eventos da ativação do receptor P2X7. No momento 1, as concentrações extra e intracelular dos compostos dispostos encontram-se em seus níveis basais, de modo que os sítios de ligação para ATP estão vazios. Estado simétrico fechado. No momento 2, tem-se a ligação de uma molécula de ATP no sítio do receptor P2X7, mas não há permuta iônica, muito embora já ocorra uma mudança conformacional do receptor. Estado assimétrico e fechado. No momento 3, com a ligação de duas moléculas de ATP, ocorre a abertura do receptor e a permuta iônica de compostos de baixo peso molecular (I1). Estado assimétrico aberto. No momento 4, com a ligação da terceira molécula de ATP, tem-se uma corrente iônica sustentada (I2) e o desprendimento das NMM e a abertura dos canais de panexina-1 e do poro Z, permitindo a passagem de compostos de alto peso molecular. Estado simétrico aberto.

Farmacologia do receptor P2X7

Uma notória característica do receptor P2X7 em relação aos demais receptores P2 é que sua ativação não ocorre em concentrações inferiores a 100 µM de ATP (Sperlágh et al., 2006; Khakh e North, 2012), de modo que, classicamente, a literatura distingue seus efeitos pela utilização de elevadas concentrações de ATP da ordem de 1 mM ou superior (Jacobson, et al., 2002; Donnelly-Roberts e Jarvis 2007, Donnelly-Roberts et al., 2009). Tais concentrações são requeridas para que, em pH neutro ou fisiológico, haja suficiente formação de ATP⁻⁴, que é o ligante endógeno deste receptor (Gordon, 1986; Spérlagh et al., 2006; Coddou et al., 2011).

Uma das alternativas para a ativação do receptor P2X7 em ensaios experimentais vem sendo a utilização do análogo sintético 2'3'-(benzoil-4-benzoil)-adenosina-5'-trifosfato (BzATP), agonista mais potente deste receptor (Donnelly-Roberts et al., 2009). Outros agonistas comuns para os receptores P2, diferentes de ATP ou BzATP, apresentam nula ou baixíssima afinidade para ativar o receptor P2X7, embora a estimulação prolongada com agonistas menos potentes também seja uma dos possíveis mecanismos de ativação (North e Surprenant, 2000; Sperlágh et al., 2006; Donnelly-Roberts et al., 2009; Khakh e North, 2012).

O antagonismo do receptor P2X7 é outra questão que merece destaque. Esse campo até pouco tempo carecia de bloqueadores seletivos, difíceis de obter visto que há grande diferença de resposta

entre os modelos rato, camundongo e humano (Virginio, et al., 1997; Bianchi et al., 1999; Hibell et al., 2001). Bloqueadores comuns a outros subtipos de receptores P2, como suramina e o PPADS (do inglês, sigla para *pyridoxalphosfato-6-azophenyl-2'-4'-disulfonate*) exibem pouca ou nenhuma ação sobre o receptor P2X7 (Jacobson et al., 2002), o que também pode ser utilizado para caracterizar seu efeito. Antagonistas comumente utilizados que apresentam relativa potência e seletividade são o *Brilliant Blue G* (BBG), *1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazine* (KN62), e o ATP 2',3'-dialdeído (oxiATP) (Volonté et.al, 2012).

O BBG é um antagonista não-competitivo, trinta a cinquenta vezes mais seletivo em ratos do que em humanos ou em camundongos (Hibell et al., 2000; Jiang et al., 2000), que oferece baixa toxicidade e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Iwamaru et al., 2012). O KN62, outro antagonista não-competitivo, foi o primeiro antagonista seletivo a ser identificado e é mais potente em humanos do que em ratos (Gargett e Wiley, 1997). A utilização de oxiATP (do inglês, sigla para *oxidizedATP*), um inibidor irreversível, demanda uma incubação prévia maior (até 2h) e cautela por ser citotóxico, interferindo com vias de sinalização comuns à inflamação (Murgia et al., 1993; Sperlágh et al., 1998; Beigi et al., 2003; Di Virgilio et al., 2003). Recentemente, antagonistas mais específicos, com atividade competitiva, vem sendo estudados e desenvolvidos (Wiley et al., 2011).

Sinalização intracelular

Muito além da permuta iônica, diversos são os eventos intracelulares desencadeados pela ativação do receptor P2X7 como, por exemplo, a ativação de PKC, uma via comum a funções normalmente atribuídas a receptores metabotrópicos (Bradford e Soltoff, 2002; Wiley et al., 2011).

Uma das principais distinções do receptor P2X7 é a presença de uma porção C-terminal composta por uma cadeia de 239 aminoácidos, o que é entre duas e dez vezes maior do que a observada nos demais receptores P2X, (Sperlágħ et al., 2006). Esta porção está associada a diversas características biofísicas do receptor (Roger et al., 2010), inclusive funções topogênicas, exercendo controle sobre o tráfego para a membrana e sua estabilização (Denlinger et al., 2003; Smart et al., 2003; Becer et al., 2008). Sítios de fosforilação e defosforilação na porção C-terminal, além de correlações com o metabolismo de lipídios, também são conhecidos e descritos (Costa-Junior, 2011).

Interessantemente, Denlinger e colaboradores (2001) demonstraram a presença de diversos domínios de interesse de vias relacionadas à inflamação, como um sítio para LPS, entre os resíduos 573 e 590. Ensaios específicos demonstraram que o LPS de fato se liga a esse sítio, o que demanda a internalização do LPS (Denliger et al., 2001). A esse respeito, sabe-se que o TLR4 é internalizado para deflagrar parte de sua cascata de reações a partir de sua ligação com

LPS (Kagan et al., 2008; Tanimura et al., 2008). Além disso, em macrófagos é possível encontrar LPS intracelularmente disposto tanto em organelas como no citoplasma (Mathison e Ulevitch, 1979; Kitchens et al., 1998).

Nesse contexto, a interação entre o receptor P2X7 e acometimentos inflamatórios é alvo de diversos estudos. Hoje, entende-se que para o desencadear apropriado da resposta inflamatória é necessária a somação de sinais PAMPs e DAMPs, como o ATP. A utilização dessa molécula como uma forma de alerta de perigo é excelente, dadas conjecturas de sua baixa concentração extracelular, alta concentração citoplasmática/vesicular e sua ubiquidade nos diferentes modelos celulares (Khakh e North, 2006; Ferrari et al., 2006; Di Virgilio, 2007; Junger, 2011)

Há mais de vinte anos já é conhecida a ativação de fosfolipase D (PLD) em macrófagos murinos por um mecanismo independente do influxo ou da elevação dos níveis intracelulares de cálcio (El-Moatassim e Dubyak, 1992). A participação do receptor P2X7 em processos de defesa intracelular é conhecida, visto que ratos *knockout* para o receptor apresentam forte inaptidão em combater uma infecção celular induzida pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG), um mecanismo dependente da fusão de lisossomos com fagossomos e da atividade de PLD (Fairbairn et al., 2001).

A relação do receptor em questão com a montagem da resposta inflamatória também pode ser observada em macrófagos RAW 264.7,

que, quando estimulados com LPS, liberam ATP e NO. Além disso, essa liberação de NO foi inibida pelo antagonismo do receptor P2X7 (Sperlágh et al., 1998). Tais dados refletem um possível papel dos PAMPs, como o LPS, em promoverem a ativação de receptores purinérgicos por induzirem a liberação de ATP autocrinamente (Wiley et al., 2011).

A capacidade do LPS de ativar a translocação dos dímeros de NF- κ B pela via clássica está bem estabelecida (Beg et al., 1995; Sun e Ley, 2008; da Silveira Cruz-Machado et al., 2010), o que é um elemento regulador da montagem da resposta inflamatória (Wiley et al., 2011). A capacidade do receptor P2X7 em ativar a via do NF- κ B também já foi demonstrada (Ferrari et al., 1997). Esse é um processo chave envolvido na habilidade deste receptor em promover a maturação e a liberação de IL-1 β e IL-18 (Ferrari et al., 2006). Mais recentemente foi demonstrado em células HEK 293 que o receptor P2X7 é capaz de ativar NF- κ B por uma sinalização dependente de Myd88 (do inglês, sigla para "myeloid differentiation primary response gene 88") (Liu et al., 2011).

Estes parecem ser degraus da cascata decorrente da ativação do receptor que inclui também a ativação de NALP3 (do inglês, sigla para *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*) que recruta o adaptador proteico chamado ASC (do inglês, sigla para *apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain*), deflagrando na ativação do inflamossoma

(Mariathasan et al., 2004). Essa cascata leva a maturação de pró-caspase 1 em caspase 1, o que é um evento dependente do efluxo de K⁺ e essencial para a maturação das interleucinas (Piccini et al., 2008).

Existe também uma alça de regulação no sentido oposto. Em macrófagos de murinos, o pré-tratamento com LPS aliado a estimulação purinérgica leva a ativação de caspase 1 por um mecanismo dependente do efluxo de K⁺ e independente de Ca⁺², culminando na translocação de NF-kB, uma vez que a utilização de inibidores dessa via impediu a ativação de caspase 1 (Kahlenberg e Dubyak, 2004; Kahlenberg et al., 2005).

Em relação à produção de citocinas, a sinalização decorrente do receptor P2X7 leva a ativação de MAPKs por um mecanismo dependente de Ca⁺², promovendo um aumento de RNAm e síntese *de novo* de TNF na microglia de ratos, sem requerer um pré-tratamento com LPS, configurando o ATP como um estímulo absoluto para esse fenômeno (Hide et al., 2000). Em trabalhos posteriores, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a síntese de TNF dependente do receptor P2X7 se constitui em um fator neuroprotetor (Suzuki et al., 2004). Interessantemente, a literatura aponta que a síntese de TNF induz a uma expressão aumentada do receptor P2X7 (Zou et al., 2012).

É interessante observar que a modulação purinérgica sobre a produção de citocinas pode variar de acordo com o modelo celular.

Em astrócitos corticais, por exemplo, a produção de TNF, induzida pela estimulação por LPS, é inibida pela estimulação por ATP e BzATP (Kurcher e Neary, 2005) semelhante ao observado em macrófagos peritoniais (Haskó et al., 2000). A esse respeito, a utilização de antagonistas do receptor P2X7 inibindo a síntese de citocinas é observada em modelos *in vitro* (Clark et al., 2010) e *in vivo* (Gourine et al., 2005).

Apesar de seus efeitos bem estabelecidos com relação à morte celular, a estimulação do receptor P2X7 antagonicamente tem também participação relevante em múltiplos processos favoráveis a viabilidade celular, como no crescimento de células HEK tumorais (Adinolfi et al., 2012), diferenciação em células embrionárias (Glaser et al., 2012) e na proliferação e ativação celular em microglia (Monif et al., 2009; Monif et al., 2010) e células T (Yip et al., 2009).

Interessantemente, a capacidade de monócitos e de macrófagos de fagocitar partículas não opsonizadas é mediada pelo receptor P2X7 em associação com as NMM, como as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, vivas ou mortas, por um mecanismo independente da formação de poro ou do tráfico iônico (Gu et al., 2010). A participação no processo de fagocitose é também observada mesmo quando o receptor encontra-se em sua forma inativa, sem ser estimulado por ATP ao se observar que o receptor P2X7 se comporta como um sequestrador de espécies reativas, característica dual deste

receptor uma vez que sua ativação leva a liberação de ROS, por exemplo, em microglia (Gu et al., 2011; Bartlett et al., 2013).

A expressão do receptor P2X7 é virtualmente ubíqua, com grande incidência em neurônios e células de defesa em geral e importante papel no SNC através da modulação em microglia (Bianco et al., 2006; Junger, 2011; Volonté et al., 2012; Wiley et al., 2011).

Por fim, o levantamento teórico aqui realizado intentou demonstrar a relevância do receptor P2X7 e da melatonina como autênticos mediadores da montagem da resposta inflamatória em diferentes contextos e, como objetivo deste trabalho, buscamos, portanto, caracterizar a expressão e a função do receptor P2X7 sobre a síntese de indolaminas e de TNF na glândula pineal.

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o receptor P2X7 na glândula pineal de rato através da análise de duas respostas funcionais: a síntese de indolaminas e a produção de TNF pela glândula pineal. Para tanto, avaliamos:

- ✓ A presença de transcritos *P2rx7* na glândula pineal;
- ✓ A expressão proteica do receptor P2X7 em pinealócitos isolados;
- ✓ A produção de melatonina e seu precursor N-acetilserotonina em glândulas pineais em cultura estimuladas com isoprenalina na ausência e na presença de concentrações crescentes dos agonistas ATP e BzATP;
- ✓ A produção de melatonina em glândulas pineais em cultura pré-tratadas com os antagonistas suramina e KN62 e então estimuladas com isoprenalina na ausência e na presença de ATP;
- ✓ O efeito da estimulação purinérgica sobre a metabolização de melatonina em glândulas pineais em cultura;
- ✓ Os mecanismos intracelulares envolvidos na estimulação purinérgica em glândulas pineais em cultura;
- ✓ O efeito da adenosina sobre a síntese de melatonina;

- ✓ A produção de TNF em glândulas pineais em cultura estimuladas com concentrações crescentes de ATP e BzATP;
- ✓ A produção de TNF em glândulas pineais em cultura estimuladas com LPS e então com concentrações crescentes de ATP e BzATP;
- ✓ A produção de TNF em glândulas pineais em cultura pré-tratadas com os antagonistas BBG e KN62 e então estimuladas com LPS.

Material e métodos

Animais

Foram utilizadas ratos (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas pré-púberes, de 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 06h e apagadas às 18h), sendo o horário de acender das luzes, considerado como *Zeitgeber Time zero* (ZT 0). Na fase de claro, lâmpadas fluorescentes proviam cerca de 200lux às gaiolas. Em todos os experimentos os animais foram sacrificados por decapitação e as glândulas pineais foram imediatamente colocadas em cultura ou armazenadas a -80°C. Os procedimentos foram realizados segundo as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Drogas e reagentes

- ✓ 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.
- ✓ Invitrogen Life Technology (Carlsbad, USA): anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluoróforo FITC; ditiotreitol (DTT); DNase; dNTP Mix; fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); RNase; T4 polinucleotídeo quinase, TRIzol.
- ✓ Merck (Brasil): acetato de sódio; ácido cítrico; ácido clorídrico; ácido perclórico; ácool etílico; clorofórmio, EDTA (do inglês, sigla para *ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt*); metanol; metabissulfito de sódio;
- ✓ Perkin Elmer (Boston, MA, EUA): Easy TidesR Adenosine 5'-triphosphate.
- ✓ Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA): poli (dIdC) double strand; glicerol; bisacrilamida (N,N'-methylenebisacrylamide); N-acetilserotonina (NAS); melatonina; HEPES; meio de cultura BGJb; isoprenalina; adenosine 5'- triphosphate (ATP); Pirrolidina ditiocarbamato

(PDTC); 2'3'-(benzoyl-4-benzoyl)-adenosina-5'-trifosfato (BzATP); brilliant blue G (BBG); 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4phenylpiperazine (KN62).

Preparo de soluções

Soluções estoque de NAS (1mM) e melatonina (1mM) 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 de isoprenalina (0,1 μ M) foram preparadas em ácido clorídrico 0,01M. As diluições foram realizadas em solução aquosa de ácido ascóbico (50mg/L).

O LPS foi preparado na concentração de 1 mg/mL em solução aquosa. Os estoques permaneceram congelados a -20 °C até o uso e por período inferior a 60 dias. No momento do uso o LPS foi diluído em meio de cultura BGJb (veículo).

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

Cultura de glândula pineal

As culturas de glândulas pineais foram realizadas segundo protocolo proposto por Parfitt e colacoradores (1976) e modificado por Ferreira e colaboradores (1994). As pineais extraídas dos animais foram dispostas em placas de cultura de 24 poços, sendo uma glândula por poço em 200 µl de meio de cultura BGJb, pH7,4, acrescido de glutamina (2 mM), penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e foram 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 horas e no momento anterior ao tratamento. Decorridas 48 horas, as glândulas foram submetidas à estimulação e incubadas de acordo com os protocolos experimentais.

Cultura primária de pinealócitos

A cultura de pinealócitos foi realizada conforme método proposto por Ferreira e colaboradores (2003). Após a obtenção, as pineais foram cortadas em pequenas partes e seguiu-se dissociação enzimática com tripsina (0,25%, 37 ° C, 15 min), seguida por dispersão mecânica realizada na presença de 0,3% de inibidor de tripsina em solução contendo (mmol/L): NaCl 120, KCl 5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,2, glicose 12 e 0,1% w/v albumina bovina. Após centrifugação (1000 g, 15 min) as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%, inativado por calor), penicilina

(100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). A viabilidade celular e o número total de células foram estimados pela exclusão por azul de Trypan. A taxa de sobrevivência celular em cada procedimento foi 95% ou maior. Lâminas de 8 poços (Lab-Tek chamber slide, Nalge Nunc International, Nova York, EUA) foram tratadas com poli-L-lisina por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem dos poços com PBS as células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^5$ /poço) e mantidas em estufa (37 °C, 5% CO₂) por 18 horas.

Protocolo experimental

A estimulação das culturas de glândulas pineais e de pinealócitos dispersos foi realizada com a pipetagem de 10 µL de cada fármaco de interesse, de acordo com o ensaio em questão, de modo que o volume final por poço correspondesse 200 µL, garantindo as concentrações experimentais estipuladas.

Em relação ao conteúdo indolaminas, a incubação de isoprenalina ocorreu separadamente ou concomitantemente com os agonistas purinérgicos, de modo a ficarem incubados por 5h. Acerca da avaliação do conteúdo de TNF, a incubação de LPS ocorreu separadamente ou concomitantemente com os agonistas purinérgicos, de modo a ficarem incubados por 3h.

Para os ensaios em que foram utilizados antagonistas, a incubação destes foi realizada uma hora antes das estimulações

supracitadas, tanto para as avaliações de indolaminas quanto para as avaliações de TNF.

Determinação do conteúdo 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® 1525 μ operada isocraticamente em temperatura ambiente, uma coluna de fase reversa Resolve C18 (partícula esférica de 5 μ m; 3,9x150mm) (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 NAS (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 10% pH 3,7) e a fase móvel para melatonina (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 25%, pH 3,7) fluiu com fluxo de 0,95 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 μ L do meio de cultura ou de padrões para cada analito foram injetados diretamente no sistema cromatográfico.

Extração de RNA

O RNA total de cada glândula pineal foi extraído utilizando-se 900 μ L de TRIzol, seguido de 200 μ L de clorofórmio. Após agitar manualmente vigorosamente por 15 segundos, os tubos foram mantidos por cerca de 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugados (12000 x g; 15 min.; 4°C), separando-se a fase aquosa que contem o RNA. O RNA foi precipitado com 400 μ L de isopropanol por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação (12000g; 10 min; 4 °C). O sobrenadante foi removido, o *pellet* lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 75%, centrifugado (7500g; 5min; 4 °C) e o excesso de etanol evaporado a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Após esse período, o material foi ressuspenso em 12 μ L de água estéril para injeção (RNase *free*). A determinação da quantidade de RNA foi feita por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop®).

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

A síntese de cDNA, a partir de RNA total (0,5 μ g) foi realizada utilizando a mistura de 12 μ L RNA, 1 μ L random primer (50 ng – Invitrogen Life) e 1 μ L dNTP mix (10mM, Invitrogen Life). Esta foi incubada inicialmente a 65°C por 5 minutos. Imediatamente após a

incubação, foi transferido para cuba com gelo, adicionando-se 4 µL de tampão PCR 5x (Invitrogen Life), 1µL DTT (0,1M Invitrogen Life) e 1 µL Superscript III RT (200U/µL- Invitrogen Life), finalizando um volume de 20µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 minutos a 25°C, 50°C por 55 minutos, sendo a reação inativada a 70°C por 15 minutos. Um controle negativo contendo todos os componentes da reação exceto a enzima SuperScript III foi realizado para excluir a possibilidade de contaminação de DNA nas amostras de RNA. O cDNA produzido foi estocado a 20°C até ser utilizado nos ensaios de RT-PCR.

Desenho dos primers

Foram desenhados uma sequência senso e anti-senso de oligonucleotídeo iniciadores (primers) para os genes do P2X7 (5'- -3') e para gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (Gapdh) (5'- -3'), utilizado como controle interno. As sequências dos genes foram desenhadas de maneira que o produto amplificado possuísse em torno de 100 pares de bases (100 bp). Cada sequência do par de oligonucleotídeo teve aproximadamente 20 bp, com porcentagem entre 50-55 % de bases guanina e citosina (G e C). Também buscou-se obter temperaturas de desnaturação e associação que fossem próximas entre as duas sequências, senso e anti-senso.

A fim de garantir a especificidade de amplificação de única região do DNA, os fragmentos dos oligonucleotídeos foram analisados no banco de dados de gene (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio dos Softwares BioEdit Sequence Alignment Editor e Annhyb 4.946 e sintetizados pela Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil.

RT-PCR

Para a realização da reação de RT-PCR, preparou-se uma solução composta por 17 µl de água MiliQ, 5 µl de Buffer 10x, 1 µl de primer senso (10 µM), 1 µl de primer anti-senso (10µM), 25 µl Top Taq Master Mix Kit (Qiagen Quality). As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient- Eppendorf) em ciclos de: 5 minutos a 94°C (1x); 1 min a 94 °C, 30 seg a 60 °C, 15 seg a 72 °C (40x) e 5 min a 72 °C (1x). Os produtos de DNA resultantes (10µl) foram aplicados em gel de agarose (2%) contendo brometo de etídio (10 µg/µl). O padrão de peso molecular de escala de 100 pares de base de DNA (Quick-Load® 100 bp DNA Ladder- Uniscience, São Paulo, Brasil) foi utilizado como referência. Após a eletroforese a 90V por 25 a 30 minutos, os resultados foram visualizados em transiluminador UV e fotografados digitalmente.

Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal

Após protocolo de cultura primária de pinealócitos, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% gelado por 10 min e permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS em temperatura ambiente. Foi realizado bloqueio com albumina bovina (fração V) 1% e glicina (0,3 M) por 60 minutos, com o objetivo de minimizar a ligação do anticorpo a sítios não específicos. Para avaliar a presença constitutiva do receptor P2X7, foram utilizadas culturas de células sem tratamento que foram incubadas com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-P2X7 (1:200) por 18 horas a 4 °C. Para a avaliação de p-AA-NAT, os pinealócitos foram tratados com isoprenalina (0,1 µM, 5 h) na ausência ou na presença de ATP (1 mM) com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-p-AA-NAT (1:500) por 18 horas a 4°C.

Seguiu-se com a incubação do anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao fluoróforo FITC (1:200) por 1h em temperatura ambiente. O núcleo celular foi marcado com 4'', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 300µM, 5 minutos) a temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em tampão de bloqueio descrito acima. Os controles negativos foram realizados com a omissão do anticorpo primário. A marcação imuno-positiva foi observada usando microscópio confocal (Zeiss, Baden-Wurttemberg, Alemanha) com a objetiva de imersão em óleo (40X),

sendo utilizado o laser de argônio para a excitação do fluoróforo FITC com comprimento de onda de 488nm e filtro de emissão em 505. O laser enterprise foi utilizado para excitação do marcador DAPI no comprimento de onda de 364nm e a emissão verificada com filtro de 435–485nm. Foram obtidas 4 imagens de cada poço selecionadas aleatoriamente e a quantificação da fluorescência relativa foi realizada através do software Image J.

Dosagem de TNF

O conteúdo de TNF presente no meio de cultura de glândulas pineais incubadas com LPS ($0,1\mu\text{g}/\text{mL}$) na ausência ou na presença de ATP (0,001 – 3mM), BzATP (0,001 - 300 μM), BBG (0,001 - 10 μM) ou KN62 (50 - 100 μM), de acordo com os protocolos experimentais, foi quantificado por ELISA (do inglês, sigla para *enzyme-linked immunosorbent assay*; rat TNF-alpha ELISA ready-set-go kit, cat. 88-7340, eBioscience, San Diego, CA, EUA).

Determinação do conteúdo de melatonina por ELISA

O conteúdo de melatonina em dispersão celular foi quantificado por ELISA (Melatonin ELISA, IBL, Hamburgo, Alemanha) conforme especificações do fabricante.

Análise dos resultados

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) ou em porcentagem do controle, sendo a análise estatística entre dois grupos realizada por teste *t student* e a avaliação entre dois ou mais grupos realizada pela análise de variância (ANOVA) com *post test* de Tukey, por meio do software GraphPad Prism® versão 5.00 (GraphPad Software®).

Resultados

Expressão do RNAm e da proteína do receptor P2X7

Para determinarmos a expressão do gene que codifica o receptor P2X7 na glândula pineal de ratos, o RNAm foi isolado de pineais de animais de sacrificados na fase de claro e analisado por RT-PCR. O produto amplificado apresentou-se sob a forma de banda única, com tamanho dos fragmentos correspondentes ao produto esperado conforme o desenho dos oligonucleotídeos. O gene *Gapdh* foi utilizado como controle interno (figura 7). Nenhum fragmento foi detectado no controle negativo (ausência de cDNA). O controle negativo da transcrição reversa, reação realizada sem a transcriptase reversa, demonstrou a ausência de contaminação por DNA genômico (dados não mostrados).

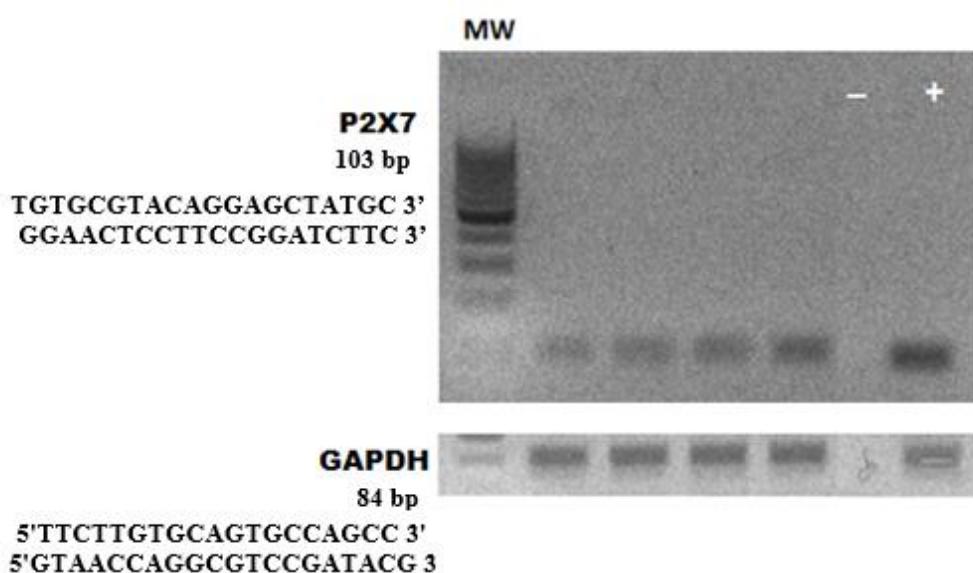


Figura 7 – Produto de amplificação da reação de RT-PCR dos transcritos *P2rx7* e *Gapdh* na glândula pineal de ratos. O RNAm foi isolado de glândulas pineais de animais sacrificados durante a fase de cloro. O controle negativo foi realizado na ausência de cDNA e o controle positivo realizado com DNA genômico de rato. O transcrito *Gapdh* foi utilizado como controle interno. MW: Marcador de peso molecular.

A síntese da proteína do receptor foi analisada em pinealócitos dispersos por meio de marcação imunofluorescente com anticorpo contra o receptor P2X7. Sua expressão proteica foi constitutivamente encontrada em praticamente todas as células observadas (figura 8). O controle negativo foi realizado na ausência do anticorpo primário.

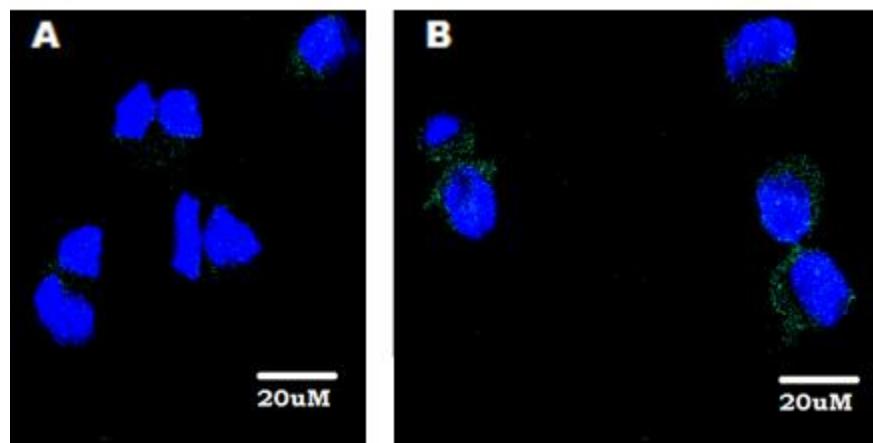


Figura 8 – Imagens representativas de imunocitoquímica obtidas por microscopia confocal da expressão proteica constitutiva do receptor P2X7 em pinealócitos dispersos. (A) Controle negativo. (B) Marcação positiva para o receptor P2X7 em verde. Núcleos marcados com DAPI. Barra de escala: 20 μ m.

Efeito da estimulação purinérgica sobre a síntese de melatonina induzida por isoprenalina

Estudo com agonistas

Para avaliar a funcionalidade do receptor P2X7, glândulas pineais em cultura foram estimuladas com o agonista β -adrenérgico isoprenalina (ISO, $0,1\mu\text{M}$, 5h) na ausência ou na presença do agonista purinérgico ATP (0,01 – 3mM). A estimulação com ATP levou a um aumento dependente de concentração na produção de NAS e a uma diminuição dependente de concentração no conteúdo de melatonina nos meios de incubação (figura 9).

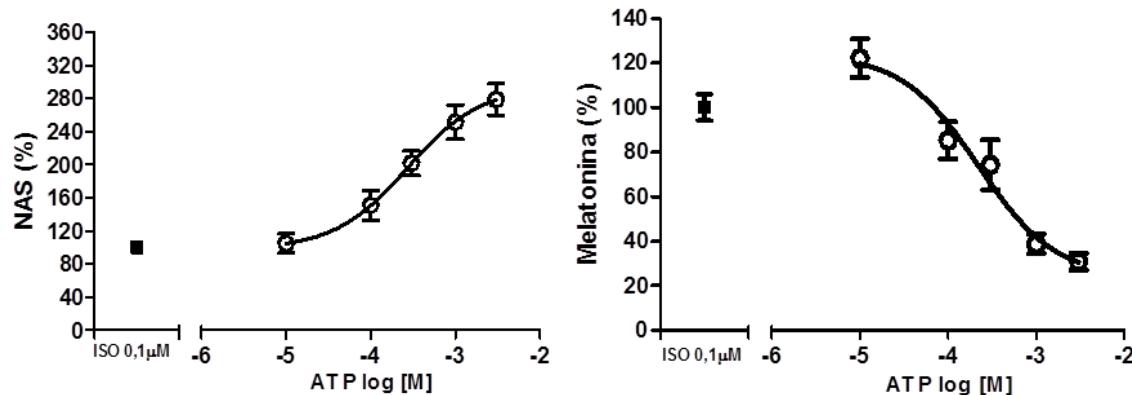


Figura 9 – Curva concentração-efeito ao ATP (0,01 – 3mM, 5h) sobre a síntese de indolaminas induzida por isoprenalina (ISO, $0,1\mu\text{M}$, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de ISO na ausência ou na presença de ATP. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 6 a 9 glândulas por ponto e estão expressos em porcentagem do conteúdo de indolaminas induzido por ISO (NAS: $23,99 \pm 1,62 \text{ ng}/200\mu\text{L}$ e melatonina: $62,93 \pm 5,12 \text{ ng}/200\mu\text{L}$).

A estimulação com o agonista BzATP (30 – 300 μ M) na síntese de indolaminas induzida por ISO (0,1 μ M, 5h) na presença do agonista purinérgico também levou a diminuição no conteúdo de melatonina, não alterando o conteúdo de NAS nos meios de incubação (figura 10).

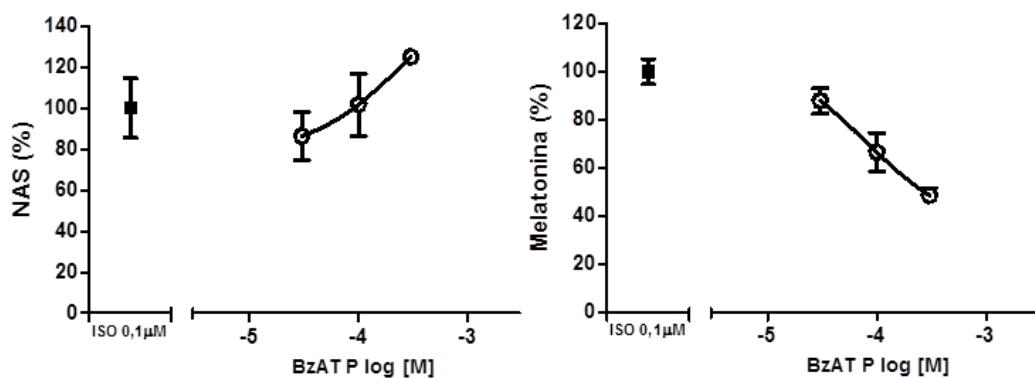


Figura 10 – Curva concentração-efeito ao BzATP (30 – 300 μ M, 5h) sobre a síntese de indolaminas induzida por ISO (0,1 μ M, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de ISO na ausência ou na presença de BzATP. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 3 a 6 glândulas por ponto e estão expressos em porcentagem do conteúdo de indolaminas induzido por ISO (NAS: 26,57 \pm 3,85ng/200 μ L e melatonina: 66,78 \pm 3,32ng/200 μ L).

Estudo com antagonistas

O efeito da suramina (100 μ M, 1h antes), clássico antagonista de receptores P2 que exibe pouca afinidade pelo receptor P2X7, foi

testado sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais induzida por ISO ($0,1 \mu\text{M}$, 5h) na ausência ou na presença de ATP (1 mM).

O tratamento com suramina não alterou o conteúdo de melatonina induzido por ISO e também não reverteu a inibição mediada pela estimulação purinérgica (figura 11).

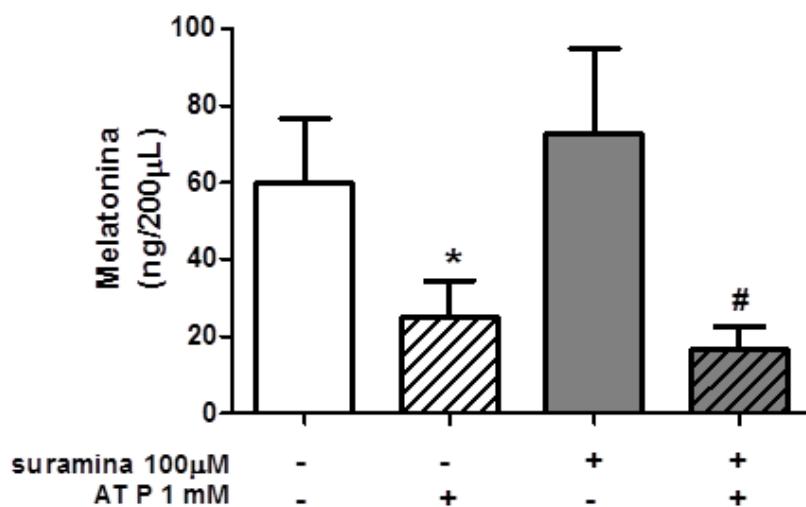


Figura 11 – Efeito do antagonista suramina ($100\mu\text{M}$, 1h antes) sobre a síntese de indolaminas induzida por ISO ($0,1\mu\text{M}$, 5h) na ausência ou presença de ATP (1mM, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de ISO na ausência ou na presença de suramina e/ou ATP. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 3 a 6 com * $<0,05$ versus ISO e # $<0,05$ versus ISO + suramina.

O efeito do KN62 (50 e $100 \mu\text{M}$, 1 h antes), antagonista seletivo do receptor P2X7, também foi testado sobre a síntese de indolaminas

em cultura de glândulas pineais induzida por ISO ($0,1 \mu\text{M}$, 5h) na presença de ATP (1 mM).

Como observado anteriormente, a estimulação purinérgica com ATP reduziu o conteúdo de melatonina induzido por ISO. A utilização de KN62 100 μM reverteu parcialmente a inibição do conteúdo de melatonina mediado pela estimulação purinérgica (figura 12).

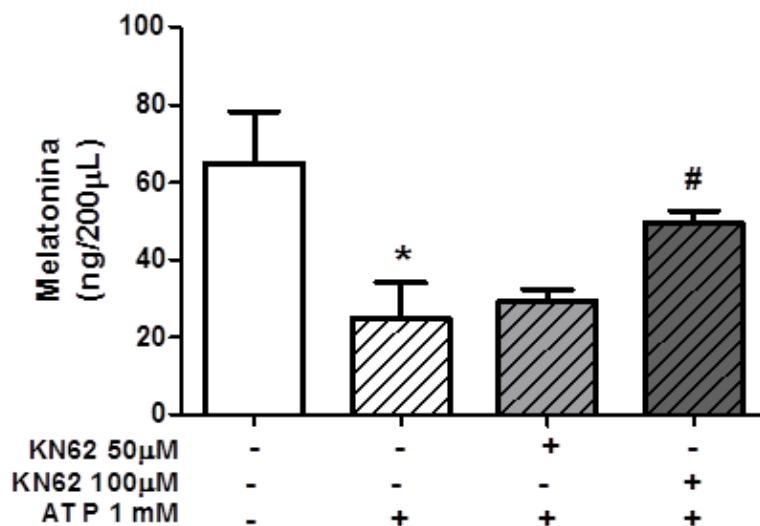


Figura 12 – Efeito do antagonista KN62 (50 – 100 μM , 1h antes) sobre a síntese de indolaminas induzida por ISO ($0,1\mu\text{M}$, 5h) na presença de ATP (1mM, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de ISO na ausência ou na presença de KN62 e/ou ATP. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 3 a 4 glândulas por grupo com * $p<0,05$ versus ISO e # $<0,05$ versus ISO + ATP 1mM.

Estimulação purinérgica e a metabolização de melatonina em glândulas pineais em cultura

Uma vez que a estimulação purinérgica com ATP leva a um aumento do precursor NAS e a uma diminuição de melatonina, investigamos a hipótese do envolvimento de uma ativação de enzimas que metabolizam a melatonina. Para tanto, glândulas pineais em cultura foram estimuladas com melatonina ($1 \mu\text{M}$, 5h), concentração semelhante à induzida pela estimulação com ISO ($1 \mu\text{M}$, 5h), na ausência ou na presença dos agonistas ATP (1 mM) ou BzATP ($200 \mu\text{M}$) e os conteúdos de NAS e melatonina analisados nos meios de incubação.

Os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas no conteúdo de melatonina entre os tratamentos realizados (figura 13). Não houve níveis detectáveis do precursor NAS.

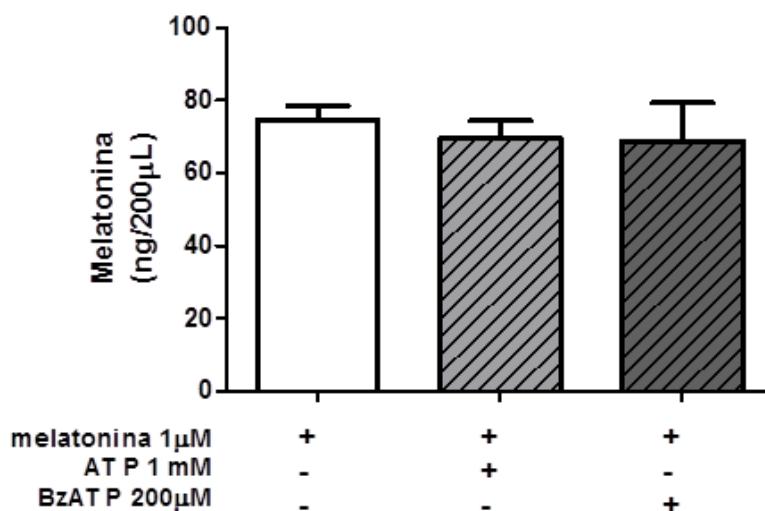


Figura 13 – Efeito da estimulação purinérgica sobre a metabolização de melatonina. Pineais em cultura foram incubadas com melatonina ($1\text{ }\mu\text{M}$, 5h) na ausência ou na presença de ATP (1mM) ou BzATP (200 μM). Os dados representam a média \pm e.p.m. de 5 a 6 glândulas por grupo.

Mecanismos intracelulares envolvidos nos efeitos da estimulação purinérgica em glândulas pineais em cultura

Para investigar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos observados pela ativação do receptor P2X7 sobre a síntese de melatonina induzida por ISO, analisamos a participação da enzima PLC, a fosforilação da enzima AA-NAT e o fator de transcrição NF- κ B.

A participação da PLC foi avaliada em glândulas pineais estimuladas com ISO ($0,1\text{ }\mu\text{M}$, 5h) na presença do bloqueador de PLC (U73122, $1\text{ }\mu\text{M}$, 1h antes) e na ausência ou na presença de ATP (1 mM). A pré-incubação com U73122 não alterou os conteúdos de NAS e melatonina induzidos por ISO. Sobre o conteúdo de NAS reverteu a potenciação observada na presença de ATP mas não reverteu a inibição de melatonina mediada pela estimulação purinérgica (figura 14).

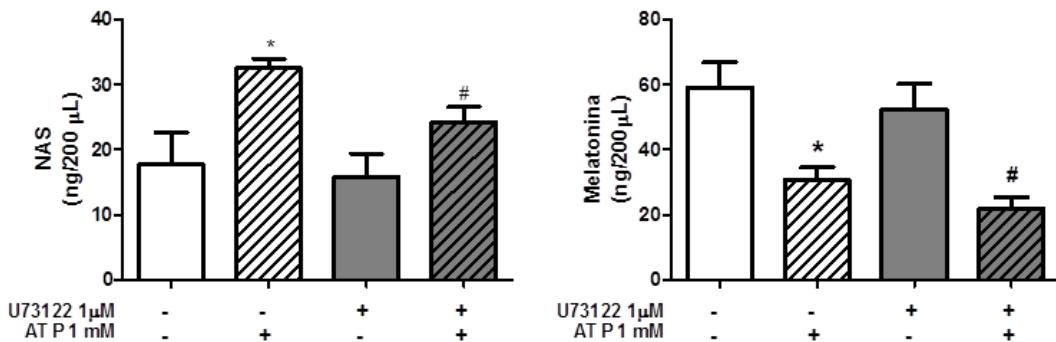


Figura 14 – Efeito de U73122 (1 μ M, 1h antes) sobre a síntese de indolaminas induzida por ISO (0,1 μ M, 5h) na ausência ou na presença de ATP (1mM, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de ISO na ausência ou na presença de U73122 e/ou ATP. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 4 a 6 glândulas por grupo com * $p<0,05$ versus ISO e # $p<0,05$ versus ISO + U73122.

Para avaliar os efeitos da ativação do receptor P2X7 sobre a fosforilação da enzima AA-NAT (p-AA-NAT), pinealócitos dispersos foram estimulados com o agonista ISO (0,1 μ M, 5 h) na ausência ou na presença de ATP (1 mM, 5 h) e então submetidos à imunocitoquímica com marcação fluorescente com o anticorpo contra a enzima p-AA-NAT.

Os ensaios demonstraram a expressão de p-AA-NAT no citoplasma e, interessantemente, no núcleo dos pinealócitos (figura 15). Todavia, não foram observadas diferenças significativas na intensidade de marcação entre os tratamentos (dados não mostrados).

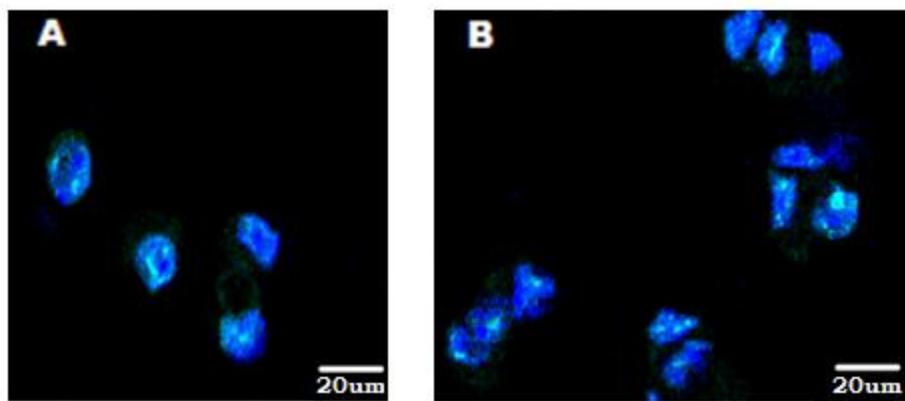


Figura 15 – Imagens representativas de imunocitoquímica obtidas por microscopia confocal da expressão da enzima p-AA-NAT em pinealócitos dispersos. (A) Tratamento com ISO (0,1 μ M, 5h) e (B) tratamento com ISO e ATP (1mM, 5h). Marcação positiva para p-AA-NAT em verde. Núcleos marcados com DAPI. Barra de escala: 20 μ m.

O efeito da ativação do receptor P2X7 sobre o fator de transcrição NF-κB foi avaliado em cultura de glândulas pineais estimuladas com ISO (0,1 μ M, 5 h), na ausência ou na presença da pré-incubação com o bloqueador da translocação nuclear do NF-κB (PDTC 12,5 μ M, 48 h antes) e na ausência ou na presença de ATP (1 mM, 5 h).

Na presença de PDTC, os conteúdos de NAS e melatonina induzidos por ISO foram aumentados. Por sua vez, a estimulação com ATP, isoladamente ou com PDTC, aumentou o conteúdo de NAS e reduziu o conteúdo de melatonina (figura 16).

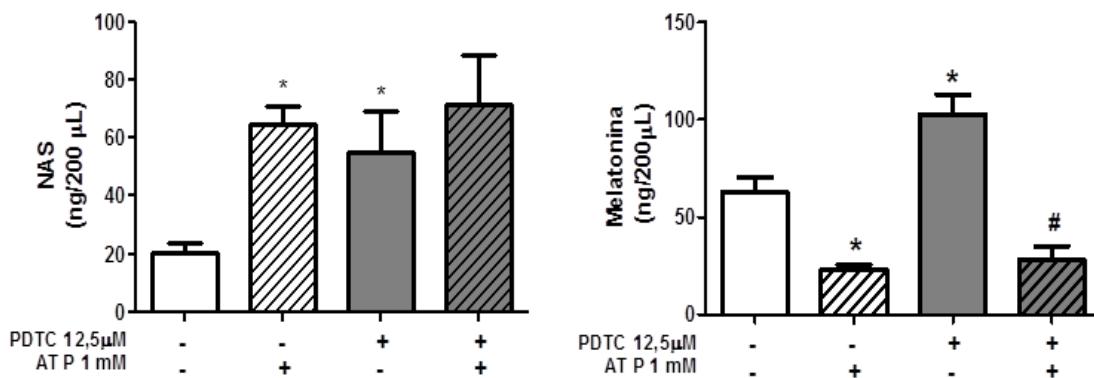


Figura 16 – Efeito do PDTC (12,5μM, 48h antes) sobre a síntese de indolaminas induzida por ISO (0,1μM, 5h) na ausência ou na presença de ATP (1mM, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de PDTC e ISO na ausência ou na presença de ATP. Os dados representam a média±e.p.m. de 4 a 6 glândulas por grupo com *p<0,05 versus ISO, #p<0,05 versus ISO + PDTC 12,5μM.

Efeito da adenosina sobre a síntese de melatonina

Considerando a existência de hidrólise de ATP pela cascata de ectonucleotidases identificadas nesta glândula (Nikodijevic e Klein, 1989; Ornelas et al., 2013), realizamos o estudo da estimulação purinérgica com adenosina (0,1 – 1 mM) sobre a produção de melatonina induzida por ISO (0,1 μM, 5 h) em cultura de glândulas pineais.

A estimulação com adenosina levou a um aumento dependente de concentração na síntese de melatonina induzida por ISO (Figura 17).

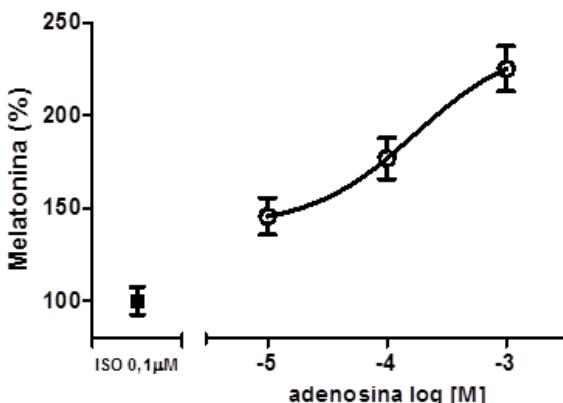


Figura 17 – Curva concentração-efeito a adenosina (0,01 – 1mM, 5h) na síntese de melatonina induzida por ISO (0,1 μ M, 5h) em cultura de glândulas pineais. O ensaio foi realizado com a incubação de ISO na ausência ou na presença de adenosina. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 3 a 4 glândulas por ponto, expressos em porcentagem do conteúdo de melatonina induzida por ISO ($55,17 \pm 4,09$ ng/200 μ L).

Efeito da estimulação purinérgica sobre a síntese de TNF induzida por LPS

Em diversos modelos de estudo o receptor P2X7 apresenta-se envolvido em acometimentos de injúria (Wiley et al., 2011), nos quais sua ativação pode desencadear a síntese de citocinas (Ferrari et al., 2006; Hide et al., 2000). Em nosso modelo, no entanto, o decurso temporal (1 – 5h) da incubação de glândulas pineais na presença de ATP (0,1 – 3mM) ou BzATP (10 – 300 μ M) não apresentou níveis detectáveis de TNF em nenhuma das concentrações testadas.

A partir das demonstrações do nosso grupo de pesquisa acerca do eixo imune-pineal (Markus et al., 2007) que demonstra, dentre outras características, a capacidade da glândula de sintetizar TNF via ativação de TLR4 (Cruz-Machado et al., 2010), buscamos avaliar a participação do receptor P2X7 na fisiopatologia da glândula pineal induzida por LPS, visto que ambos são protagonistas na montagem da resposta inflamatória.

Síntese de TNF: estudo com agonistas

Glândulas pineais em cultura foram estimuladas com LPS ($0,1\mu\text{g/mL}$, 3h) na ausência ou na presença de ATP (0,01 – 3mM). A estimulação purinérgica levou a uma redução dependente de concentração do conteúdo de TNF induzido por LPS (figura 18).

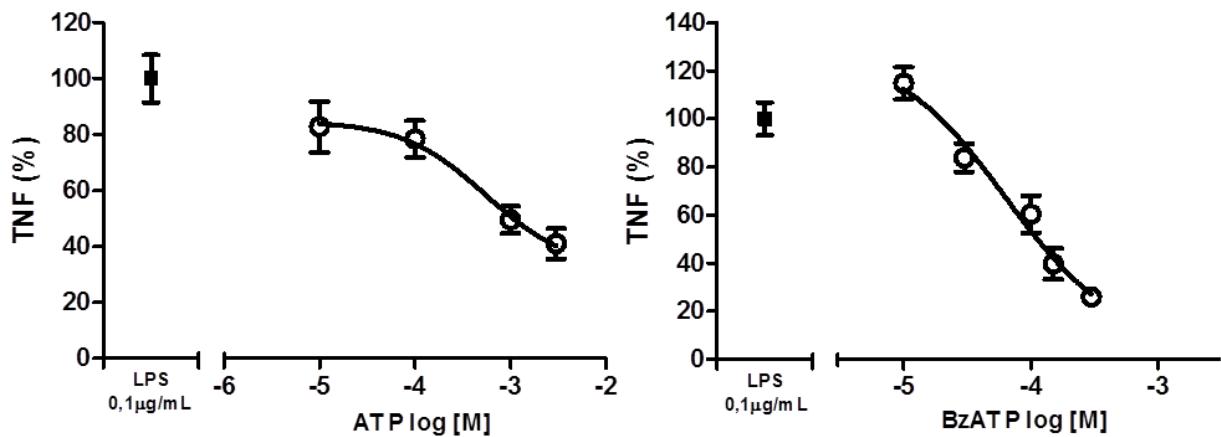


Figura 18 – Curva concentração-efeito ao ATP (0,01 – 3mM) ou ao BzATP (10 – 300 μ M) sobre a síntese de TNF induzida por LPS (0,1 μ g/mL, 3h) em cultura de glândulas pineais. Os dados representam a média \pm e.p.m. de 4 a 7 glândulas por ponto e estão expressos em porcentagem do conteúdo de TNF induzidos por LPS: (53,62 \pm 4,25pg/200 μ L) para o ensaio com ATP e (38,63 \pm 2,82pg/200 μ L) para o ensaio com BzATP.

Síntese de TNF: estudo com antagonistas

Glândulas pineais em cultura foram pré-incubadas com o antagonista do receptor P2X7 BBG (0,001 – 10 μ M, 1h antes) e estimuladas com LPS (0,1 μ g/mL, 3h). A estimulação com BBG levou a uma redução dependente de concentração no conteúdo de TNF induzido por LPS (figura 19).

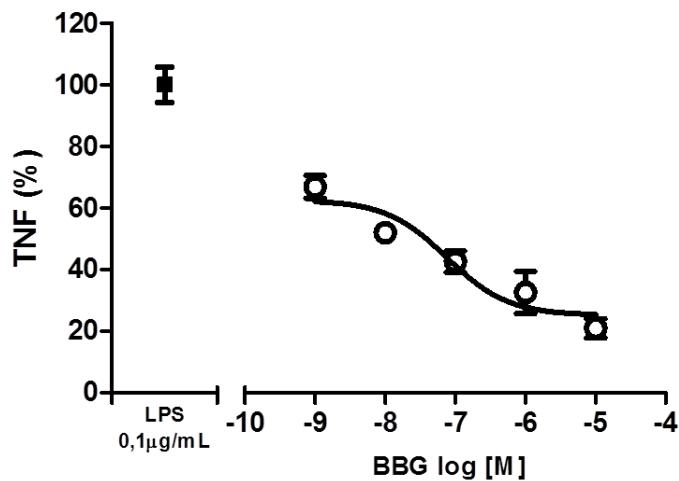


Figura 19 – Curva concentração-efeito ao BBG (0,001 – 10 μ M, 1h antes) sobre a síntese de TNF induzida por LPS (0,1 μ g/mL, 3h) em cultura de glândulas pineais. Os dados estão representados como média \pm e.p.m. de 3 a 5 glândulas por ponto e expressos em porcentagem de TNF induzido por LPS ($56,21 \pm 4,34$ pg/200 μ L).

O efeito de outro antagonista do receptor P2X7, KN62 (50 e 100 μ M, 1h antes) também foi testado sobre a síntese de TNF induzida por LPS (0,1 μ g/mL, 3h) em cultura de glândulas pineais. O conteúdo de TNF induzido por LPS não foi alterado com a pré-incubação de KN62 na menor concentração mas foi reduzido na presença da concentração 100 μ M (figura 20).

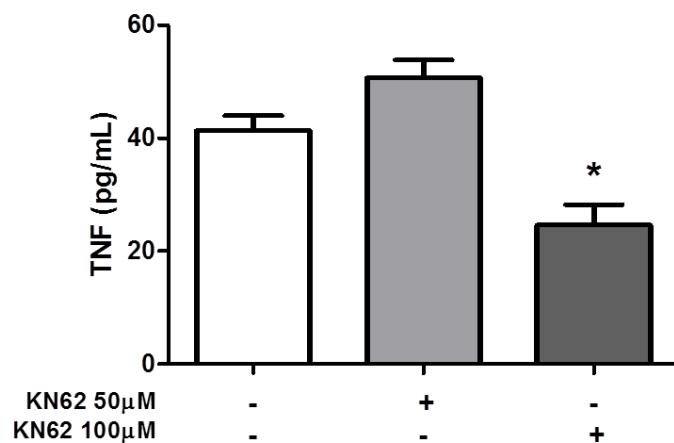


Figura 20 – Efeito do antagonista KN62 (50 e 100µM, 1h antes) sobre a síntese de TNF induzida por LPS (0,1µg/mL, 3h) em cultura de glândulas pineais. Os dados representam média ± e.p.m. de 3 a 4 glândulas por grupo com *p<0,05 versus LPS.

Discussão

Purinas são moléculas altamente preservadas nos três domínios da vida. Embora suas primeiras funções descritas tenham sido relacionadas ao metabolismo energético em função do ATP, seu papel como mensageiro intracelular e, mais recentemente, como mediador de respostas extracelulares vem sendo demonstrado.

Importantes participações da sinalização purinérgica em processos como neurotransmissão e neuromodulação (Sperlágħ et al., 2006; Khakh e North, 2012) ou em processos inflamatórios sistêmicos (Junger, 2012; Eltzschig et al., 2013) e no SNC (Clark et al., 2010) estão descritos e são de interesse para múltiplas áreas do conhecimento.

Dentre os receptores purinérgicos, o subtipo P2X7 vem sendo estudado com grande interesse em células do sistema imunológico e em células do sistema nervoso dada a modulação que este receptor exerce na atividade destas células e a sua participação em acometimentos de injúria, nociocepção e neuroinflamação. Com as demonstrações de que a estimulação purinérgica modula a síntese de indolaminas pela glândula pineal (Ferreira et al., 1994; Petrilli, 2012) e que estes hormônios estão envolvidos na montagem da resposta inflamatória, como postulado pelo eixo imune-pineal (Markus et al.,

2013), buscamos caracterizar a expressão do receptor P2X7 na glândula pineal.

Expressão do RNAm e da proteína do receptor P2X7

O primeiro passo dessa investigação foi avaliar se o receptor em questão estaria expresso na glândula pineal. A avaliação qualitativa do produto de amplificação do RNAm do P2X7 sugere a presença constitutiva na glândula pineal de ratos. Em alguns tipos celulares do SNC, embora ocorra a transcrição, a proteína do receptor não foi identificada (Sperlágh et al., 2006). No sistema imune a expressão proteica do receptor P2X7 foi identificada em todos os tipos celulares testados (Junger, 2011). Em nosso modelo, a expressão proteica do receptor pode ser observada em pinealócitos, neurônios modificados e células funcionais na síntese de melatonina (Arendt, 1995, Ekstrom e Missl, 2003).

A partir da demonstração de que o receptor está constitutivamente expresso em nosso modelo, buscamos avaliar a função do P2X7 sobre a síntese de indolaminas e de TNF pela glândula pineal.

Síntese de indolaminas induzidas por ISO

Desde as primeiras descrições do receptor P2X7 (Buisman et al., 1988), foi observado que este receptor somente era ativado mediante altas concentrações de ATP (Khakh e North, 2012), o que possibilita a formação de seu agonista endógeno, o ATP⁻⁴, e é uma ferramenta para distinguir a ação do receptor P2X7 dos demais receptores P2 (Gordon, 1986; Markwardt et al., 1997, Sperlágħ, 2006; Coddou et al., 2011; Khak e North 2012).

Para analisar os efeitos de sua ativação sobre a síntese de indolaminas induzida por ISO na glândula pineal, realizamos um ensaio com diferentes concentrações de ATP. Como pode ser observado, o conteúdo de NAS foi aumentado enquanto o conteúdo de melatonina foi diminuído de maneira dependente da concentração purinérgica.

O efeito de purinas como o ATP e ADP sobre o conteúdo de NAS já havia sido observado (Ferreira et al., 1994) e caracterizado como mediado pela ativação de receptores P2Y₁ (Ferreira et al., 2001; Petrilli, 2012). Este efeito sobre o conteúdo de NAS é mediado pela ativação da PLC (Ferreira et al., 2001) e consequente aumento da concentração do Ca⁺² intracelular (Ferreira et al., 2003). Estas vias convergem para um aumento da atividade de PKC, que pode amplificar a sinalização de AMPc e PKA atuando, portanto, tanto na fosforilação de CREB quanto na fosforilação do complexo AA-NAT /

14-3-3 (Baler, 1997; Ganguly et al., 2001; Simmonneaux e Ribelayga, 2003; Klein, 2007).

Apesar de ser um receptor ionotrópico, a ativação do P2X7 pode levar a um aumento da atividade de PKC (Bradford e Soltoff, 2002) contribuindo no efeito observado do aumento de NAS decorrente da ativação do receptor P2Y₁, especialmente nas concentrações mais altas do ensaio, em que poderia ocorrer o influxo de Ca⁺² extracelular pela abertura do canal P2X7 (Browne et al., 2010; Young, 2010).

A redução no conteúdo de melatonina mediada pela estimulação purinérgica com ADP foi pela primeira vez observada por nosso grupo no trabalho de Petrilli (2012). Para comprovar o envolvimento do receptor P2X7 nessa resposta, utilizamos o seu agonista mais potente - o BzATP (Donnelly-Roberts et al., 2009). A estimulação de glândulas pineais com ISO e BzATP demonstrou uma tendência de aumento do conteúdo de NAS.

Classicamente, BzATP não ativa receptores P2Y₁ e, desse modo, reiteramos os dados do nosso grupo de pesquisa que demonstraram que o aumento de NAS mediado pela estimulação purinérgica é decorrente da ativação dos receptores P2Y₁ (Ferreira et al., 2001; Petrilli, 2012). A tendência de aumento do conteúdo de NAS sugere uma contribuição da ativação do receptor P2X7 neste efeito.

Acerca do conteúdo de melatonina, a estimulação purinérgica com BzATP demonstrou uma redução desta indolamina nos meios de incubação, resultado semelhante ao observado à estimulação com

ATP, (observado neste estudo) e com ADP (Petrilli, 2012). Embora ADP seja um agonista de baixa afinidade pelo receptor P2X7, a incubação de altas concentrações desse agonista por longos períodos pode levar a ativação do P2X7 (North e Surprenant, 2000; Sperlágh et al., 2006; Donnelly-Roberts et al., 2009; Khakh e North, 2012). Além disso, a responsividade do nosso modelo ao BzATP também é um indicativo que sugere a participação do receptor P2X7 nesse contexto.

Reforçando nossa hipótese, a incubação de glândulas pineais com suramina, um clássico antagonista não-seletivo para receptores P2, não reverteu a redução no conteúdo de melatonina mediado pela estimulação purinérgica. A concentração escolhida de suramina não atua nos receptores P2X4 e P2X7, mas inibe a ativação dos demais receptores P2 (Khakh e North, 2012), inclusive de P2Y₁, revertendo o aumento de NAS mediado por ATP (Ferreira et al., 1994; Mortani-Barbosa, 2000).

Considerando os receptores nos quais o BzATP é um importante agonista, notadamente P2X1, P2X2, P2X3 e P2X7 (Bianchi et al., 1999) e o antagonismo exercido pela suramina, que compreende todos os receptores P2, exceto P2X4 e P2X7 (Khakh e North, 2012), temos fortes indícios que sugerem um papel importante do receptor P2X7 na redução do conteúdo de melatonina.

Com a utilização do KN62, um antagonista alostérico seletivo para o receptor P2X7, pudemos observar uma reversão parcial dos

níveis de melatonina, que não são iguais ao conteúdo de melatonina induzido por ISO, mas que já é maior do que o conteúdo observado na presença de ATP, reiterando a participação do receptor P2X7 nesse sistema e suscitando que poderiam ter sido utilizadas maiores concentrações do antagonista, visto que seus efeitos são menores em ratos do que em humanos (Gargett e Wiley, 1997) ou novas classes de antagonistas mais específicos e competitivos (Wiley et al., 2011).

Metabolização de melatonina

O primeiro passo para investigar a redução observada no conteúdo de melatonina mediada pela estimulação purinérgica foi avaliar se ocorria a ativação de enzimas de metabolização da melatonina, como a CYP1A1, CYP2C9 ou CYP2C19, que podem catalisar a conversão de melatonina em NAS (Facciolá et al., 2001; Ma et al., 2005; Pandi-Perumal et al., 2006). Estas enzimas estão expressas em células do SNC (Meyer, et. al, 2007) e na barreira hemato-encefálica (Declèves et al., 2011) podendo estar presentes na glândula pineal e levar à formação de 6-OH-melatonina (Facciolá et al., 2001; Haderland 2010).

Desta forma, glândulas pineais em cultura foram incubadas com melatonina, em concentração semelhante à observada em nossos ensaios após o estímulo beta-adrenérgico, na presença ou na ausência de agonistas purinérgicos. Através da quantificação do conteúdo de

NAS e melatonina nos meios de incubação, não foram detectados níveis de NAS e o conteúdo de melatonina não foi alterado na presença de estimulação purinérgica, indicando que não houve conversão enzimática de melatonina em NAS.

Com este ensaio, também descartamos a hipótese de que a estimulação purinérgica ativa, nesse contexto, outras enzimas capazes de metabolizar melatonina em derivados do AFMK, como as peroxidases (Tan et al., 2007; Hardeland, 2010) ou a IDO (Marteau et al., 2005).

Uma outra hipótese sobre a conversão de melatonina em seus metabólitos seria decorrente da interação direta dessa molécula com radicais livres e/ou hidroxilas, que poderiam ser formados a partir do ATP. Embora o ensaio não tenha demonstrado alterações no conteúdo de melatonina, o que indica que essa interação não ocorre ou não é relevante, as ectoenzimas que hidrolisam ATP, porém, apresentam expressão e atividade aumentada durante a fase de escuro (Ornelas et al., 2013).

Dados demonstram que ectonucleotidases plasmáticas apresentam uma atividade maior durante a fase de escuro em decorrência de um mecanismo dependente de estimulação β -adrenérgica (Detanico et al., 2010). Deste modo, graças a estimulação com isoprenalina, aumentando a atividade dessas enzimas na glândula pineal, poderia haver um aumento da quantidade de hidroxilas ou

mesmo de espécies reativas que poderiam interagir com a molécula de melatonina (Tan et al., 2003; Tan et al., 2007; Hardeland, 2010).

Um contra ponto em relação a essa hipótese poderia ser levantado pelo aumento de NAS em função da estimulação com isoprenalina e ATP, todavia, a literatura aponta que a hidroxilação de moléculas de NAS não ocorre ou é irrisória (Ma et al., 2008).

Mecanismos intracelulares

Buscando avaliar os mecanismos envolvidos na modulação purinérgica da pineal sobre o conteúdo de NAS e melatonina, investigamos a participação da PLC, via de transdução envolvida na mediação dos efeitos da ativação do receptor P2Y₁ na pineal demonstrado anteriormente (Ferreira e Markus, 2001). Os dados obtidos neste estudo reiteraram, através do bloqueio funcional desta via pelo inibidor U73122, a participação da via da PLC na modulação da síntese de NAS. A inibição da PLC, contudo, não reverteu os efeitos observados pela estimulação purinérgica sobre o conteúdo de melatonina.

O envolvimento da PLC na mediação do efeito da estimulação purinérgica neste estudo poderia ser decorrente de uma modulação sobre a enzima AA-NAT, enzima chave na via biosintética da melatonina produzindo o precursor NAS (Klein, 2007). Não avaliamos a atividade desta enzima neste trabalho mas, dados de nosso

laboratório demonstram que a ativação de receptores P2Y1 na pineal por ADP não alterou a atividade desta enzima (Petrilli, 2012).

A formação de um complexo fosforilado com a proteína chaperona 14-3-3 constitui-se em importante evento intracelular para a estabilidade e funcionalidade da enzima AA-NAT (Klein, 2007). Nesse contexto, buscamos avaliar se a ativação de receptores P2X7 na pineal alterariam os níveis de fosforilação da enzima AA-NAT.

Através de análise imunocitoquímica não evidenciamos alterações nos níveis de fosforilação da AA-NAT em pinealócitos estimulados com ISO ou ISO e ATP, sugerindo mais uma vez que esta via não está envolvida nos efeitos da estimulação purinérgica aqui observados.

Dados da literatura demonstram o envolvimento da via do fator de transcrição NF-kB na ativação do receptor P2X7 em vários sistemas (Ferrari et al., 1997; Liu et al., 2011). Na glândula pineal o NF-kB encontra-se constitutivamente expresso e apresenta papel inversamente correlacionado à síntese de NAS e de melatonina (Ferreira et al., 2005; Cecon et al., 2010). Nossos resultados demonstram que o bloqueio da translocação nuclear de NF-kB aumenta os níveis de NAS e de melatonina induzidos por estimulação β_1 -adrenérgica, mas não reverte os efeitos do ATP sobre a potenciação de NAS ou a inibição do conteúdo de melatonina, sugerindo que esta via de sinalização não é a responsável pelo efeito inibitório do conteúdo de melatonina aqui observado.

Os dados apresentados sugerem que existem mecanismos diferenciais entre a regulação de NAS e de melatonina que, embora não tenham sido esclarecidas as vias envolvidas na redução de melatonina, tais resultados são possivelmente decorrentes da ativação de diferentes receptores P2 expressos nos pinealócitos. Além disso, nossos dados também apontam para um efeito diferencial entre a ativação de receptores P1 e P2 uma vez que a estimulação com adenosina aumentou os níveis de melatonina induzidos pela estimulação β_1 -adrenérgica. Vale ressaltar que os efeitos e a sinalização intracelular da adenosina na pineal são controversos, existindo na literatura dados semelhantes aos observados por nosso grupo de pesquisa (Gharib et al., 1987, 1989; Sarda et al., 1989; Nikodijevic e Klein, 1989).

Respostas diferenciais entre NAS e melatonina já foram observadas mediante estímulos estressores (Seggie et al., 1985) além da demonstração de níveis elevados da enzima AA-NAT terem sido encontrados concomitantemente com baixos níveis de melatonina após a realização de exercícios extenuantes (Yaga et. al, 2007).

Logo, como o ATP é um importante DAMP sistêmico (Junger, 2011), sua liberação em altas concentrações na glândula pineal pode ser um sinal de estresse, que leva a uma modulação dual entre NAS e melatonina de modo que os mecanismos envolvidos e a importância fisiológica desses fenômenos permanecem inconclusivos, muito embora tenham sido descartados clássicos mecanismos bem

estabelecidos da regulação da função pineal. Estes dados abrem novos questionamentos para investigações futuras sobre os papéis da modulação purinérgica sobre o conteúdo de NAS e melatonina.

Síntese de TNF induzida por LPS

Com as demonstrações do nosso grupo de pesquisa que a glândula pineal é capaz de sintetizar TNF a partir da estimulação com LPS (Cruz-Machado et al., 2010) e que a estimulação por ATP, ativando receptores P2X7, é um estímulo absoluto para síntese de TNF em alguns modelos de estudo de microglia (Hide et al., 2000), buscamos avaliar se a ativação do P2X7 levaria à síntese de TNF na glândula pineal de ratos. Em nossos ensaios, em um decurso temporal compreendido entre uma a cinco horas, a incubação de ATP ou de BzATP em diferentes concentrações não apresentou níveis detectáveis de TNF. A partir desta demonstração de que o ATP não é um estímulo absoluto para a síntese de TNF, buscamos investigar quais seriam os efeitos da estimulação purinérgica sobre a síntese dessa citocina em glândulas pineais desafiadas com LPS. A demonstração de que ATP e BzATP reduzem o conteúdo de TNF nos meios de incubação de modo dependente de concentração sugerem que este efeito seja mediado pelo receptor P2X7 uma vez que as concentrações utilizadas de ATP e de BzATP são características da farmacologia deste receptor (Sperlágh, 2006; Coddou et al., 2011; Khak e North 2012). Além

disso, há também a sugestão de que estes receptores estejam expressos na microglia da glândula pineal, células responsáveis pela síntese de TNF na pineal (Cruz-Machado et al., 2012).

Resultados semelhantes são observados em astrócitos (Kucher e Neary, 2005) e em macrófagos peritonais (Haskó et al., 2000) onde a incubação com ATP reduz os níveis de TNF induzidos por LPS.

Para avaliar se os efeitos observados são mediados pelo receptor P2X7, glândulas pineais pré-tratadas com BBG, antagonista não-seletivo de receptores P2, mas potente inibidor da ativação do receptor P2X7, ou com o antagonista seletivo KN62, foram desafiadas com LPS. Através deste protocolo os níveis de TNF foram inibidos de maneira dependente da concentração. Estes resultados demonstram que no contexto da síntese de TNF, BBG e KN62 não agem como antagonistas clássicos, mas sim como agonistas inversos, levando a uma resposta semelhante àquela observada pela estimulação purinérgica e corroborando demonstrações *in vitro* (Clark et al., 2010) e *in vivo* (Gourine et al., 2005) de que ocorre uma inibição na síntese de TNF mediada por antagonistas do P2X7.

O envolvimento deste receptor nas respostas mediadas pelo desafio com LPS ganha especial importância com as demonstrações de que na porção C-terminal do receptor P2X7 há um sítio de ligação funcional para o LPS (Denlinger et al., 2001).

Outro ensaio que demonstrou a importância da interação dos receptores TLR4-P2X7 merece destaque, como a observação de que

macrófagos da linhagem RAW264.7 desafiados com LPS permutam ATP intracelular para o meio extracelular por um mecanismo dependente de P2X7 que é fundamental para a liberação de NO (Sperlágh et al., 1998). Além disso, é importante ressaltar que ambos os receptores podem ativar a translocação nuclear de NF- κ B por um mecanismo dependente do recrutamento de Myd88 (Cruz-Machado et al., 2010; Liu et al., 2011), suscitando que a comunicação entre esses receptores e as vias de transdução correlatas entre eles são importantes para o entendimento e para estudos futuros sobre quadros de injúria.

Portanto, em resumo, os dados aqui apresentados demonstram a presença do receptor P2X7 na glândula pineal de ratos. Nossos dados reiteram o relevante papel da estimulação purinérgica para a função neuroendócrina da glândula pineal e sua capacidade de responder a PAMPs, como o LPS, em função da ativação do receptor P2X7, além da responsividade a DAMPs, como as purinas.

Conclusões

- Pinealócitos expressam o receptor P2X7
- A ativação do receptor P2X7 com ATP ou BzATP inibe o conteúdo de melatonina induzido por isoprenalina de modo concentração dependente
- O antagonismo do receptor P2X7 reverteu a inibição de melatonina mediada por ATP
- Os mecanismos responsáveis pela inibição de melatonina não envolvem a via da PLC, a fosforilação de AA-NAT e/ou a translocação de NF-κB
- A ativação de receptores P1 aumentam o conteúdo de melatonina induzido por isoprenalina
- A estimulação com ATP ou BzATP inibe o conteúdo de TNF induzido por LPS de modo concentração dependente
- O pré-tratamento com antagonistas do receptor P2X7 inibem o conteúdo de TNF de modo dependente de concentração

RESUMO

A sinalização purinérgica tem sido demonstrada como um importante modulador de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Dentro os receptores purinérgicos, o receptor P2X7 distingui-se por requerir altas concentrações de ATP em sua ativação. As demonstrações prévias de que a glândula pineal responde a diferentes estímulos purinérgicos e a altas concentrações de ATP sugere um papel para os receptores P2X7 nesta glândula, embora sua expressão e função não estivesse estabelecida. O objetivo deste trabalho, portanto, foi caracterizar funcionalmente o receptor P2X7 na glândula pineal de ratos. Os resultados obtidos demonstram, pela primeira vez, a expressão gênica e proteica do receptor P2X7 na glândula pineal. Os efeitos da ativação destes receptores levam a uma inibição nos níveis de melatonina induzida por isoprenalina por um mecanismo independente da via do fator de transcrição NF- κ B e da fosfolipase C. Além disso, a estimulação destes receptores inibiu a síntese de TNF induzida por LPS, resultado este semelhante ao observado na presença do pré-tratamento com antagonistas do receptor P2X7. Estes dados confirmam a presença de receptores P2X7 na glândula pineal e reiteram o relevante papel da estimulação purinérgica a sobre a síntese de melatonina e sobre a capacidade da pineal em responder a PAMPs, como o LPS.

ABSTRACT

Purinergic signalling has been demonstrated as an important modulator of several physiological and pathophysiological processes. Among the purinergic receptors, the activation of P2X7 receptor requires high concentrations of ATP. The previous demonstration that the pineal gland is responsive to different purinergic stimuli and to high concentrations of ATP suggests a role for P2X7, although its expression and function remain unclear. The aim of this study was to functionally characterize the P2X7 receptor in the rat pineal gland. The data showed that P2X7 receptor mRNA and protein are expressed in the rat pineal gland. The P2X7 receptor activation leads to an inhibition of melatonin content induced by isoprenaline through an independent NF- κ B and PLC pathways. Furthermore, the P2X7 receptor activation inhibits the LPS-induced TNF synthesis, a similar result observed in the presence of the pre-treatment with P2X7 receptor antagonists. These data demonstrate the presence of P2X7 receptors in the rat pineal gland, and confirm the relevant role of the purinergic stimulation to the pineal melatonin synthesis and responsiveness to PAMPs such as LPS.

Referências Bibliográficas

- ABBRACCIO, M. P. BOEYNAEMS JM, BARNARD EA, BOYER JL, KENNEDY C, MIRAS-PORTUGAL MT, KING BF, GACHET C, JACOBSON KA, WEISMAN GA, BURNSTOCK G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, v. 24, n. 2, p. 52-5, 2003.
- ADINOLFI, E. RAFFAGHELLO L, GIULIANI AL, CAVAZZINI L, CAPECE M, CHIOZZI P, BIANCHI G, KROEMER G, PISTOIA V, DI VIRGILIO F. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res*, v. 72, n. 12, p. 2957-69, 2012.
- ANCCASI, R. M. ORNELAS IM, COSSENZA M, PERSECHINI PM, VENTURA AL. ATP induces the death of developing avian retinal neurons in culture via activation of P2X7 and glutamate receptors. *Purinergic Signal*, v. 9, n. 1, p. 15-29, 2013.
- ARENKT, J. Complex effects of melatonin. *Therapie*, v. 53, n. 5, p. 479-88, 1998.
- ARENKT, J. DEACON S, ENGLISH J, HAMPTON S, MORGAN L. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res*, v. 4, n. S2, p. 74-79, 1995.
- AXELROD, J.; WEISSBACH, H. ENZYMATIC O-METHYLATION OF N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, v. 131, n. 3409, p. 1312, 1960.
- BALER, R.; COVINGTON, S.; KLEIN, D. C. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-

- responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem*, v. 272, n. 11, p. 6979-85, 1997.
- BARCHAS, J. Studies on the relation of melatonin to sleep. *Proc West Pharmacol Soc*, v. 11, p. 22, 1968.
- BARTLETT, R.; YERBURY, J. J.; SLUYTER, R. P2X7 receptor activation induces reactive oxygen species formation and cell death in murine EOC13 microglia. *Mediators Inflamm*, v. 2013, p. 271813, 2013.
- BEG, A. A. SHA, W. C.; BRONSON, R. T.; BALTIMORE, D.. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*, v. 9, n. 22, p. 2736-46, 1995.
- BEIGI, R. D. KERTESY, S. B.; AQUILINA, G.; DUBYAK, G. R. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol*, v. 140, n. 3, p. 507-19, 2003.
- BIANCHI, B. R. LYNCH, K. J.; TOUMA, E.; NIFORATOS, W.; BURGARD, E. C.; ALEXANDER, K. M.; PARK, H. S.; YU, H.; METZGER, R.; KOWALUK, E.; JARVIS, M. F.; VAN BIESEN, T. Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, v. 376, n. 1-2, p. 127-38, 1999.
- BIANCO, F. CERUTI, S.; COLOMBO, A.; FUMAGALLI, M.; FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; MATTEOLI, M.; DI VIRGILIO, F.; ABBRACCCHIO, M. P.; VERDERIO, C. A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem*, v. 99, n. 3, p. 745-58, 2006.

- BIENVENU, K.; GRANGER, D. N. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Blood Cells*, v. 19, n. 2, p. 279-88, 1993.
- BRADFORD, M. D.; SOLTOFF, S. P. P2X₇ receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem J*, v. 366, n. Pt 3, p. 745-55, 2002.
- BRANDAO-BURCH, A. KEY, M. L.; PATEL, J. J.; ARNETT, T. R.; ORRISS, I. R. The P2X₇ Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 3, p. 41, 2012.
- BROWNE, L. E. CAO, L.; BROOMHEAD, H. E.; BRAGG, L.; WILKINSON, W. J.; NORTH, R. A. P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat Neurosci*, v. 14, n. 1, p. 17-8, 2011.
- BUISMAN, A. M.; LANGERMANS, J. A.; VAN FURTH, R. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the number of leucocytes and course of *Listeria monocytogenes* infection in naive and leucocytopenic mice. *Immunology*, v. 93, n. 1, p. 73-9, 1998.
- BURNSTOCK, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*, v. 1, n. 4, p. 239-48, 1976a.
- BURNSTOCK, G. Purine nucleotides. *Adv Biochem Psychopharmacol*, v. 15, p. 225-35, 1976b.
- BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *J Theor Biol*, v. 62, n. 2, p. 491-503, Oct 21 1976c.

BURNSTOCK, G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol*, v. 11, n. 3-4, p. 205-22, 1978.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, v. 64, n. 12, p. 1471-83, 2007.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*, v. 16, n. 5, p. 433-40, 1985.

CARRILLO-VICO, A. CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA-MAURINO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *Faseb J*, v. 18, n. 3, p. 537-9, 2004.

CARVALHO-SOUZA, C. E. DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; TAMURA, E. K.; FERNANDES, P. A.; PINATO, L.; MUXEL, S. M.; CECON, E.; MARKUS, R. P. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 2, p. 10, 2011.

CECON, E. FERNANDES, P. A.; PINATO, L.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*, v. 27, n. 1, p. 52-67, 2010.

CIPOLLA-NETO, J. BARTOLI, I.; SERAPHIM, P. M.; AFECHE, S. C.; SCIALFA, J. H.; PERACOLI, A. M. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res*, v. 691, n. 1-2, p. 133-41, 1995.

- CLARK, A. K. STANILAND, A. A.; MARCHAND, F.; KAAN, T. K.; MCMAHON, S. B.; MALCANGIO, M. P2X7-dependent release of interleukin-1beta and nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide. *J Neurosci*, v. 30, n. 2, p. 573-82, 2010.
- CODDOU, C.; STOJILKOVIC, S. S.; HUIDOBRO-TORO, J. P. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci*, v. 22, n. 3, p. 335-54, 2011.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. ET AL. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res*, v. 49, n. 2, p. 183-92, 2010.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. CARVALHO-SOUZA, C. E.; TAMURA, E. K.; PINATO, L.; CECON, E.; FERNANDES, P. A.; DE AVELLAR, M. C.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. e40142, 2012.
- DECLEVES, X. JACOB, A.; YOUSIF, S.; SHAWAHNA, R.; POTIN, S.; SCHERRMANN, J. M. Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab*, v. 12, n. 8, p. 732-41, 2011.
- DENLINGER, L. C. FISSETTE, P. L.; SOMMER, J. A.; WATTERS, J. J.; PRABHU, U.; DUBYAK, G. R.; PROCTOR, R. A.; BERTICS, P. J. Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, v. 167, n. 4, p. 1871-6, 2001.
- DETANICO, B. C. DE SOUZA, A.; MEDEIROS, L. F.; ROZISKY, J. R.; CAUMO, W.; HIDALGO, M. P.; BATTASTINI, A. M.;

- TORRES, I. L. 24-hour temporal pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum. *Chronobiol Int*, v. 27, n. 9-10, p. 1751-61, 2010.
- DI VIRGILIO, F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today*, v. 16, n. 11, p. 524-8, 1995.
- DOLPHIN, A. C. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, v. 55, n. 4, p. 607-27, 2003.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L.; JARVIS, M. F. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol*, v. 151, n. 5, p. 571-9, 2007.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L. NAMOVIC, M. T.; HAN, P.; JARVIS, M. F. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol*, v. 157, n. 7, p. 1203-14, 2009.
- DOWDALL, M. J.; BOYNE, A. F.; WHITTAKER, V. P. Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J*, v. 140, n. 1, p. 1-12, 1974.
- DRIJFHOUT, W. J. VAN DER LINDE, A. G.; KOOI, S. E.; GROL, C. J.; WESTERINK, B. H. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem*, v. 66, n. 2, p. 748-55, 1996.
- DRURY, A. N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, v. 68, n. 3, p. 213-37, 1929.

- DUARTE, T.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; GODINHO, R. O. Contribution of the extracellular cAMP-adenosine pathway to dual coupling of beta₂-adrenoceptors to G_s and G_i proteins in mouse skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 341, n. 3, p. 820-8, 2012.
- DUBOCOVICH, M. L. MELATONIN RECEPTORS: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med*, v. 8 Suppl 3, p. 34-42, 2007.
- DUVERNOY, H. M.; RISOLD, P. Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*, v. 56, n. 1, p. 119-47, 2007.
- EGAN, T. M.; SAMWAYS, D. S.; LI, Z. Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch*, v. 452, n. 5, p. 501-12, 2006.
- EKSTROM, P.; MEISSL, H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 358, n. 1438, p. 1679-700, 2003.
- EL-MOATASSIM, C.; DUBYAK, G. R. A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *J Biol Chem*, v. 267, n. 33, p. 23664-73, 1992.
- ENNION, S.; HAGAN, S.; EVANS, R. J. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X1 receptors. *J Biol Chem*, v. 275, n. 45, p. 35656, 2000.
- FACCIOLA, G.; HIDESTRAND, M.; VON BAHR, C.; TYBRING, G. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 56, n. 12, p. 881-8, 2001.

- .FAIRBAIRN, I. P. STOBER, C. B.; KUMARARATNE, D. S.; LAMMAS, D. A. ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol*, v. 167, n. 6, p. 3300-7, 2001.
- FERNANDES, P. A. BOTHOREL, B.; CLESSE, D.; MONTEIRO, A. W.; CALGARI, C.; RAISON, S.; SIMONNEAUX, V.; MARKUS, R. P. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol*, v. 21, n. 2, p. 90-7, 2009.
- FERNANDES, P. A. CECON, E.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res*, v. 41, n. 4, p. 344-50, 2006.
- FERRARI, D. PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*, v. 176, n. 7, p. 3877-83, 2006.
- FERRARI, D. WESSELBORG, S.; BAUER, M. K.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol*, v. 139, n. 7, p. 1635-43, 1997.
- FERREIRA, Z. S.; CIOPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R. P. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol*, v. 112, n. 1, p. 107-10, 1994.
- FERREIRA, Z. S. FERNANDES, P. A.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAR, M. C.; MARKUS, R. P.. Corticosterone modulates

- noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res*, v. 38, n. 3, p. 182-8, 2005.
- FERREIRA, Z. S. GARCIA, C. R.; SPRAY, D. C.; MARKUS, R. P. P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology*, v. 69, n. 1, p. 33-7, 2003.
- FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Characterisation of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol*, v. 415, n. 2-3, p. 151-6, 2001.
- GANGULY, S. GASTEL, J. A.; WELLER, J. L.; SCHWARTZ, C.; JAFFE, H.; NAMBOODIRI, M. A.; COON, S. L.; HICKMAN, A. B.; ROLLAG, M.; OBSIL, T.; BEAUVERGER, P.; FERRY, G.; BOUTIN, J. A.; KLEIN, D. C. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 14, p. 8083-8, 2001.
- GARCIA-MAURINO, S. GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. 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*, v. 159, n. 2, p. 574-81, 1997.
- GARGETT, C. E.; WILEY, J. S. The isoquinoline derivative KN-62 a potent antagonist of the P2Z-receptor of human lymphocytes. *Br J Pharmacol*, v. 120, n. 8, p. 1483-90, 1997.
- GLASER, T. CAPPELLARI, A. R.; PILLAT, M. M.; ISER, I. C.; WINK, M. R.; BATTASTINI, A. M.; ULRICH, H.. Perspectives of

- purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal*, v. 8, n. 3, p. 523-37, 2012.
- GOONERATNE, N. S. EDWARDS, A. Y.; ZHOU, C.; CUELLAR, N.; GRANDNER, M. A.; BARRETT, J. S. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. *J Pineal Res*, v. 52, n. 4, p. 437-45, 2012.
- GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*, v. 233, n. 2, p. 309-19, 1986.
- GOURINE, A. V. POPUTNIKOV, D. M.; ZHERNOSEK, N.; MELENCHUK, E. V.; GERSTBERGER, R.; SPYER, K. M.; GOURINE, V. N. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br J Pharmacol*, v. 146, n. 1, p. 139-45, 2005.
- GU, B. J. RATHSAM, C.; STOKES, L.; MCGEACHIE, A. B.; WILEY, J. S. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 297, n. 2, p. C430-9 2009.
- GU, L. Q. LI, F. Y.; ZHAO, L.; LIU, Y.; CHU, Q.; ZANG, X. X.; LIU, J. M.; NING, G.; ZHAO, Y. J.. Association of XIAP and P2X7 receptor expression with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine*, v. 38, n. 2, p. 276-82, 2010.
- HARDELAND, R. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*, v. 8, n. 3, p. 168-81, 2010b.
- HARDELAND, R.; POEGGELER, B. Melatonin and synthetic melatonergic agonists: actions and metabolism in the central

- nervous system. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, v. 12, n. 3, p. 189-216, 2012.
- HARDEN, T. K. SESMA, J. I.; FRICKS, I. P.; LAZAROWSKI, E. R. Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol (Oxf)*, v. 199, n. 2, p. 149-60, 2010.
- HASKO, G. KUHEL, D. G.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. ATP suppression of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha release from macrophages. *Br J Pharmacol*, v. 129, n. 5, p. 909-14, 2000.
- HIBELL, A. D. THOMPSON, K. M.; SIMON, J.; XING, M.; HUMPHREY, P. P.; MICHEL, A. D. Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X7 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 363, n. 6, p. 639-48, 2001.
- HIDE, I. TANAKA, M.; INOUE, A.; NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S.; INOUE, K.; NAKATA, Y. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem*, v. 75, n. 3, p. 965-72, 2000.
- HILLE, B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci*, v. 17, n. 12, p. 531-6, 1994.
- IWAMARU, Y. TAKENOUCHI, T.; MURAYAMA, Y.; OKADA, H.; IMAMURA, M.; SHIMIZU, Y.; HASHIMOTO, M.; MOHRI, S.; YOKOYAMA, T.; KITANI, H. Anti-prion activity of Brilliant Blue G. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e37896, 2012.
- JACOBSON, K. A.; JARVIS, M. F.; WILLIAMS, M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*, v. 45, n. 19, p. 4057-93, 12 2002.

- JIANG, L. H. RASSENDREN, F.; SURPRENANT, A.; NORTH, R. A. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem*, v. 275, n. 44, p. 34190-6, 2000.
- JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 3, p. 201-12, 2011.
- KAGAN, J. C. SU, T.; HORNG, T.; CHOW, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOY, R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*, v. 9, n. 4, p. 361-8, 2008.
- KAHLENBERG, J. M.; DUBYAK, G. R. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 286, n. 5, p. C1100-8, 2004.
- KAHLENBERG, J. M. LUNDBERG, K. C.; KERTESY, S. B.; QU, Y.; DUBYAK, G. R. Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol*, v. 175, n. 11, p. 7611-22, 2005.
- KALSBEEK, A. GARIDOU, M. L.; PALM, I. F.; VAN DER VLIET, J.; SIMONNEAUX, V.; PEVET, P.; BUIJS, R. M. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci*, v. 12, n. 9, p. 3146-54, 2000.
- KAPPERS, J. A. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, v. 52, p. 163-215, 1960.

- KAWATE, T. MICHEL, J. C.; BIRDSONG, W. T.; GOUAUX, E. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature*, v. 460, n. 7255, p. 592-8, 2009.
- KHAKH, B. S. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 3, p. 165-74, 2001.
- KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*, v. 442, n. 7102, p. 527-32, 2006.
- KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 51-69, 2012.
- KHAKH, B. S. SMITH, W. B.; CHIU, C. S.; JU, D.; DAVIDSON, N.; LESTER, H. A. Activation-dependent changes in receptor distribution and dendritic morphology in hippocampal neurons expressing P2X2-green fluorescent protein receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 9, p. 5288-93, 2001.
- KITCHENS, R. L.; WANG, P.; MUNFORD, R. S. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J Immunol*, v. 161, n. 10, p. 5534-45, 1998.
- KLEIN, D. C. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "The Timezyme". *J Biol Chem*, v. 282, n. 7, p. 4233-7, 2007.
- KLEIN, D. C.; SUGDEN, D.; WELLER, J. L. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, n. 2, p. 599-603, 1983.

KLEIN, D. C.; WELLER, J. L. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, v. 169, n. 3950, p. 1093-5, 1970.

KLOTZ, K. N. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 362, n. 4-5, p. 382-91, 2000.

KUCHER, B. M.; NEARY, J. T. Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J Neurochem*, v. 92, n. 3, p. 525-35, 2005.

LANDOLT, H. P.; RETEY, J. V.; ADAM, M. Reduced neurobehavioral impairment from sleep deprivation in older adults: contribution of adenosinergic mechanisms. *Front Neurol*, v. 3, p. 62, 2012.

LEANDER, P.; VRANG, N.; MOLLER, M. Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol*, v. 399, n. 1, p. 73-93, 1998.

LIU, S.; KIELIAN, T. MyD88 is pivotal for immune recognition of *Citrobacter koseri* and astrocyte activation during CNS infection. *J Neuroinflammation*, v. 8, p. 35, 2011.

LOPES, C. DELYRA, J. L.; MARKUS, R. P.; MARIANO, M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*, v. 23, n. 2, p. 72-8, 1997.

LOPES, C.; MARIANO, M.; MARKUS, R. P. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res*, v. 50, n. 1, p. 6-11, 2001.

- LOTUFO, C. M. LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H.; MARKUS, R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol*, v. 430, n. 2-3, p. 351-7, 2001.
- MA, X. CHEN, C.; KRAUSZ, K. W.; IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J. A metabolomic perspective of melatonin metabolism in the mouse. *Endocrinology*, v. 149, n. 4, p. 1869-79, 2008.
- MA, X. IDLE, J. R.; KRAUSZ, K. W.; GONZALEZ, F. J. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*, v. 33, n. 4, p. 489-94, 2005.
- MARIATHASAN, S. NEWTON, K.; MONACK, D. M.; VUCIC, D.; FRENCH, D. M.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; ERICKSON, S.; DIXIT, V. M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, v. 430, n. 6996, p. 213-8, 2004.
- MARKUS, R. P. FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; CECON, E.. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, v. 14, n. 3-4, p. 126-33, 2007.
- MARQUES-DA-SILVA, C. CHAVES, M. M.; RODRIGUES, J. C.; CORTE-REAL, S.; COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M. Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*, v. 6, n. 9, p. e25356, 2011.
- MARTEAU, F. GONZALEZ, N. S.; COMMUNI, D.; GOLDMAN, M.; BOEYNNAEMS, J. M. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-

- dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood*, v. 106, n. 12, p. 3860-6, 2005.
- MARTINS, E., JR. FERREIRA, A. C.; SKORUPA, A. L.; AFECHE, S. C.; CIOPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L. F. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J Leukoc Biol*, v. 75, n. 6, p. 1116-21, 2004.
- MATHISON, J. C.; ULEVITCH, R. J. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol*, v. 123, n. 5, p. 2133-43, 1979.
- MAURICE, N. TKATCH, T.; MEISLER, M.; SPRUNGER, L. K.; SURMEIER, D. J. D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci*, v. 21, n. 7, p. 2268-77, 2001.
- MEYER, R. P. GEHLHAUS, M.; KNOTH, R.; VOLK, B. Expression and function of cytochrome p450 in brain drug metabolism. *Curr Drug Metab*, v. 8, n. 4, p. 297-306, 2007.
- MOLLER, M.; BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*, v. 309, n. 1, p. 139-50, Jul 2002.
- MONIF, M.; BURNSTOCK, G.; WILLIAMS, D. A. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 42, n. 11, p. 1753-6, 2010.
- MONIF, M. REID, C. A.; POWELL, K. L.; SMART, M. L.; WILLIAMS, D. A. The P2X7 receptor drives microglial activation

and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci*, v. 29, n. 12, p. 3781-91, 2009.

MORTANI BARBOSA, E. J.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol*, v. 401, n. 1, p. 59-62, 2000.

MURGIA, M. HANAU, S.; PIZZO, P.; RIPPA, M.; DI VIRGILIO, F. OXIDIZED ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem*, v. 268, n. 11, p. 8199-203, 1993.

NIKODIJEVIC, O.; KLEIN, D. C. 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*, v. 125, n. 4, p. 2150-7, 1989.

NONAKA, K. O. REITER, R. J.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; STOKKAN, K. A.; 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*, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1991.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, v. 82, n. 4, p. 1013-67, 2002.

NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 40, p. 563-80, 2000.

ORNELAS F.G., SOUZA-TEODORO L.H., D'ARGENIO-GARCIA L., CARVALHO-SOUZA C.E., MUXEL S.M., STEFANELLO N., ZANINI D., SCHETINGER M.R.C., FERNANDES P.A., MARKUS R.P., FERREIRA Z.S. Characterization of ecto-nucleotidases in

rat pineal glanda - impact the day-night modulation of the darkness hormone melatonin. (Poster presentation) 4th Brazilian Purine Club Meeting. Canela-RS, 2013.

PANDI-PERUMAL, S. R. SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J.; CARDINALI, D. P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? FEBS J, v. 273, n. 13, p. 2813-38, 2006.

PELEGRI, P. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. Br J Pharmacol, v. 163, n. 5, p. 908-11, 2011.

PETRILLI C.L. Regulação da atividade da glândula pineal por estimulação purinérgica. [dissertação (Mestrado em Fisiologia)]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2012.

PICCINI, A. CARTA, S.; TASSI, S.; LASIGLIE, D.; FOSSATI, G.; RUBARTELLI, A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, n. 23, p. 8067-72, 2008.

PIRES-LAPA, M. A. TAMURA, E. K.; SALUSTIANO, E. M.; MARKUS, R. P.. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. J Pineal Res, 2013.

POEGGELER, B. THUERMANN, S.; DOSE, A.; SCHOENKE, M.; BURKHARDT, S.; HARDELAND, R. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. J Pineal Res, v. 33, n. 1, p. 20-30, 2002.

- PONTES, G. N. CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*, v. 41, n. 2, p. 136-41, 2006.
- PROVENCIO, I. RODRIGUEZ, I. R.; JIANG, G.; HAYES, W. P.; MOREIRA, E. F.; ROLLAG, M. D. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, v. 20, n. 2, p. 600-5, 5 2000.
- RADULOVACKI, M. VIRUS, R. M.; DJURICIC-NEDELSON, M.; GREEN, R. D. Adenosine analogs and sleep in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 228, n. 2, p. 268-74, 1984.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, v. 50, n. 3, p. 413-92, 1998.
- REITER, R. J. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol*, v. 35, n. 3, p. 169-75, 1991.
- REITER, R. J. HOLTORF, A.; CHAMPNEY, T. H.; VAUGHAN, M. K. Relative efficacy of melatonin and 5-methoxytryptamine in terms of their antigonadotrophic and counterantigonadotrophic actions in male Syrian hamsters. *J Pineal Res*, v. 1, n. 1, p. 91-8, 1984.
- REUSS, S. Trigeminal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech*, v. 46, n. 4-5, p. 305-9, 1999.
- ROGER, S. GILLET, L.; BAROJA-MAZO, A.; SURPRENANT, A.; PELEGREN, P. C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *J Biol Chem*, v. 285, n. 23, p. 17514-24, 2010.

- SAKAI, Y.; HIRA, Y.; MATSUSHIMA, S. Central GABAergic innervation of the mammalian pineal gland: a light and electron microscopic immunocytochemical investigation in rodent and nonrodent species. *J Comp Neurol*, v. 430, n. 1, p. 72-84, 2001.
- SCHACHTER, J. MOTTA, A. P.; DE SOUZA ZAMORANO, A.; DA SILVA-SOUZA, H. A.; GUIMARAES, M. Z.; PERSECHINI, P. M. ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci*, v. 121, n. Pt 19, p. 3261-70, 2008.
- SCHLAFER, M.; VOLKNANDT, W.; ZIMMERMANN, H. Putative synaptic vesicle nucleotide transporter identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Neurochem*, v. 63, n. 5, p. 1924-31, 1994.
- SCHWARZ, N. DROUOT, L.; NICKE, A.; FLIEGERT, R.; BOYER, O.; GUSE, A. H.; HAAG, F.; ADRIOUCH, S.; KOCH-NOLTE, F. Alternative splicing of the N-terminal cytosolic and transmembrane domains of P2X7 controls gating of the ion channel by ADP-ribosylation. *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. e41269, 2012.
- SHIRLEY, D. G.; VEKARIA, R. M.; SEVIGNY, J. Ectonucleotidases in the kidney. *Purinergic Signal*, v. 5, n. 4, p. 501-11, 2009.
- SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*, v. 55, n. 2, p. 325-95, 2003.
- SMART, M. L. GU, B.; PANCHAL, R. G.; WILEY, J.; CROMER, B.; WILLIAMS, D. A.; PETROU, S. P2X7 receptor cell surface

- expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem*, v. 278, n. 10, p. 8853-60, 2003.
- SNYDER, S. H.; AXELROD, J. A Sensitive Assay for 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase. *Biochem Pharmacol*, v. 13, p. 805-6, 1964.
- SPERLAGH, B.; VIZI, E. S. Is the neuronal ATP release from guinea-pig vas deferens subject to alpha 2-adrenoceptor-mediated modulation? *Neuroscience*, v. 51, n. 1, p. 203-9, 1992.
- SPERLAGH, B. VIZI, E. S.; WIRKNER, K.; ILLES, P. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol*, v. 78, n. 6, p. 327-46, 2006.
- STADLER, H.; FENWICK, E. M. Cholinergic synaptic vesicles from *Torpedo marmorata* contain an atracyloside-binding protein related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Eur J Biochem*, v. 136, n. 2, p. 377-82, 1983.
- STJARNE, L.; STJARNE, E. Some pharmacological applications of an extracellular recording method to study secretion of a sympathetic co-transmitter, presumably ATP. *Acta Physiol Scand*, v. 135, n. 3, p. 227-39, 1989.
- SUN, S. C.; LEY, S. C. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol*, v. 29, n. 10, p. 469-78, 2008.
- SURPRENANT, A. RASSENDREN, F.; KAWASHIMA, E.; NORTH, R. A.; BUELL, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, v. 272, n. 5262, p. 735-8, 1996.
- SUZUKI, T. HIDE, I.; IDO, K.; KOHSAKA, S.; INOUE, K.; NAKATA, Y. Production and release of neuroprotective tumor

necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci*, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2004.

TAN, D. X. HARDELAND, R.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; KORKMAZ, A.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; FUENTES-BROTO, L.; REITER, R. J. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc*, v. 85, n. 3, p. 607-23, 2010.

TAN, D. X. MANCHESTER, L. C.; HARDELAND, R.; LOPEZ-BURILLO, S.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; REITER, R. J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*, v. 34, n. 1, p. 75-8, 2003.

TAN, D. X. MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, v. 42, n. 1, p. 28-42, 2007.

TECLEMARIAM-MESBAH, R. TER HORST, G. J.; POSTEMA, F.; WORTEL, J.; BUIJS, R. M. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*, v. 406, n. 2, p. 171-82, 1999.

TOBIN, V. A. MCCANCE, I.; COLEMAN, H. A.; PARKINGTON, H. C. How important is stimulation of alpha-adrenoceptors for melatonin production in rat pineal glands? *J Pineal Res*, v. 32, n. 4, p. 219-24, 2002.

TSAI, S. Y. SCHLUNS, K. S.; LE, P. T.; MCNULTY, J. A. TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by

- norepinephrine and interleukin-1beta. *Histol Histopathol*, v. 16, n. 4, p. 1135-41, 2001.
- TZAVARA, E.T. POUILLE, Y. DEFER, N. & HANOUNE, J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Neurobiology*, v. 93, p11208-12, 1996.
- VANECEK, J. SUGDEN, D.; WELLER, J.; KLEIN, D. C. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*, v. 116, n. 6, p. 2167-73, 1985.
- VIRGINIO, C. CHURCH, D.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, v. 36, n. 9, p. 1285-94, 1997.
- VOLLRATH, L., ED. The pineal organ. Handbuch der mikroskopischen antomie des menschen. Berlin: Springer Verlag, v.6, Handbuch der mikroskopischen antomie des menschen, Ed A. Oksche and L. Vollrath ed. 1981.
- VOLONTE, C. APOLLONI, S.; SKAPER, S. D.; BURNSTOCK, G. P2X7 receptors: channels, pores and more. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v. 11, n. 6, p. 705-21, 2012.
- WILEY, J. S. SLUYTER, R.; GU, B. J.; STOKES, L.; FULLER, S. J. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, v. 78, n. 5, p. 321-32, 2011.
- WITHYACHUMNARNKUL, B. NONAKA, K. O.; SANTANA, C.; ATTIA, A. M.; REITER, R. J. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J Interferon Res*, v. 10, n. 4, p. 403-11, 1990.

- WITHYACHUMNARNKUL, B.; REITER, R. J.; LERCHL, A.; NONAKA, K. O.; STOKKAN, K. A. Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int J Biochem*, v. 23, n. 12, p. 1397-401, 1991.
- YAN, Z.; KHADRA, A.; LI, S.; TOMIC, M.; SHERMAN, A.; STOJILKOVIC, S. S. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X₇ receptor channel gating. *J Neurosci*, v. 30, n. 42, p. 14213-24, 2010.
- YAN, Z.; LI, S.; LIANG, Z.; TOMIC, M.; STOJILKOVIC, S. S. The P2X₇ receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol*, v. 132, n. 5, p. 563-73, 2008.
- YIP, L.; WOEHRLE, T.; CORRIDEN, R.; HIRSH, M.; CHEN, Y.; INOUE, Y.; FERRARI, V.; INSEL, P. A.; JUNGER, W. G. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X₇ receptors. *FASEB J*, v. 23, n. 6, p. 1685-93, 2009.
- YOUNG, M. T. P2X receptors: dawn of the post-structure era. *Trends Biochem Sci*, v. 35, n. 2, p. 83-90, 2010.
- ZIMMERMAN, ED. Ecto-nucleotidases. Purinergic and pyrimidinergic signalling. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag, v.151, p.209-25, Purinergic and pyrimidinergic signalling. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2001.
- ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.

ZOU, J.; VETRENO, R. P.; CREWS, F. T. ATP-P2X₇ receptor signaling controls basal and TNFalpha-stimulated glial cell proliferation. *Glia*, v. 60, n. 4, p. 661-73, 2012.

Súmula curricular

Dados Pessoais

Nome Luis Henrique de Souza Teodoro

Data de nascimento 30/07/1986

Local de nascimento São Paulo

Endereço eletrônico: lhteodoro@gmail.com

Formação Acadêmica

2010 Mestrado em Ciências (Fisiologia Geral).

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

Título: Caracterização Funcional do Papel da Estimulação Purinérgica na Modulação de Glândulas Pineais de Rato Frente a Agentes Inflamatórios.

Orientador: Dra. Zulma Felisbina da Silva Ferreira

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006 - 2010 Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.

Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, São Paulo, Brasil

Título: Análise Morfológica Cardíaca Avaliada pela Ecocardiografia em um modelo Experimental Submetido a Dois Fatores de Risco Cardiovascular: Frutose e Sal

Orientador: Dra. Vera de Moura Azevedo Farah

Bolsista do(a): Universidade Presbiteriana Mackenzie

2006 - 2010 Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, São Paulo,
Brasil

Título: O RPG na Educação: Novas Oportunidades de Construção
de Conhecimento.

Orientador: Dr. Adriano Monteiro de Castro

Atuação profissional

1. Prefeitura Municipal de São Paulo - PMSP

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional:
Professor, Regime: Parcial

2. Universidade Presbiteriana Mackenzie - MACKENZIE

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Livre, Enquadramento funcional: Monitor,
Carga horária: 6. Regime: Parcial

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos

FERREIRA, Z. S. ; TEODORO, L. H. S. ; Garcia, L. D'A ; Souza, G. ; MUXEL, S. ; MARKUS, R. P. **Bi-functional effects of P2Y1 and P2X7 receptors stimulation on tumor necrosis factor (TNF) release in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated pineal glands.** In: FASEB Research Summer Conference - Melatonin Biology: actions and Therapeutics, 2013, Niagara Falls. FASEB Research Summer Conference - Melatonin Biology: actions and Therapeutics. 2013.

FARAH, V. M. A., FIORINO, P., SOUZA-TEODORO, L. H., SIRVENTE, R., MOSTARDA, C., ARAUJO, I. C., FONTELES, M. C., IRIGOYEN, M. C. **Evaluation of Cardiac Function in Hypertension-Induced by Salt Intake.** In: FASEB, 2011, Las Vegas. The FASEB Journal. 2011.

Apresentação de Trabalho

Ornelas FG, Souza-Teodoro LH, D'Argenio-Garcia L, Carvalho-Souza CE, Muxel SM, Stefanello N, Zanini D, Schetinger MRC, Fernandes PA, Markus RP, Ferreira ZS. **Characterization of ecto-nucleotidases in rat pineal gland - impact the day-night modulation of the darkness hormone melatonin.** 4th Brazilian Purine Club Meeting. Canela-RS, 2013.

Garcia, L. D'A ; PETRILLI, C. L. ; TEODORO, L. H. S. ; CALGARY, C. ; Simonneaux, V ; MARKUS, R. P. ; FERREIRA, Z. S. **Purinergic modulation on pineal gland synthesis of N-acetylserotonin and melatonin.** In: FASEB Research Summer Conference - Melatonin Biology: actions and Therapeutics., 2013, Niagara Falls. FASEB Research Summer Conference - Melatonin Biology: actions and Therapeutics., 2013.

Garcia, L. D'A ; PETRILLI, C. L. ; TEODORO, L. H. S. ; MARKUS, R. P. ; FERREIRA, Z. S. **Diferencial effects of purinergic stimulation on melatonin biosynthetic pathway in the rat pineal gland.** In: Third Meeting of the Brazilian Purine Club - Purinergic Signaling: Structure, Functions and Therapeutic Applications, 2012, Ouro Preto. Third Meeting of the Brazilian Purine Club - Purinergic Signaling: Structure, Functions and Therapeutic Applications, 2012.

SOUZA, G., SOUZA-TEODORO, L. H., GARCIA, L. D'A., CARVALHO-SOUSA, C. E., FERNANDES, P. A. C. M., MARKUS, R. P., FERREIRA, Z. S. **EFFECT OF PURINERGIC STIMULATION ON TNF RELEASE IN LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)-STIMULATED RAT PINEAL GLAND.**, 2011.

GARCIA, L. D'A., SOUZA-TEODORO, L. H., MORI, D. P., MARKUS, R. P., FERREIRA, Z. S. **IMMUNOLOCALIZATION OF**

P2X7 RECEPTOR IN THE RAT PINEAL GLAND, 2011.

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, 2011.

SOUZA-TEODORO, L. H., NASCIMENTO, R. S., SIRVENTE, R., FARAH, V. M. A., IRIGOYEN, M. C. C., FIORINO, P.

EVALUATION OF CARDIAC FUNCTION IN A HYPERTENSION MODEL INDUCED BY FRUCTOSE INTAKE, 2010.

FARAH, V. M. A., FIORINO, P., SOUZA-TEODORO, L. H., NASCIMENTO, R. S., BECHARA, A., SIRVENTE, R., MOSTARDA,

C., FONTELES, M. C., IRIGOYEN, M. C. C. TIME-COURSE EVALUATION OF CARDIAC FUNCTION IN HYPERTENSION-INDUCED BY FRUCTOSE INTAKE IN RATS, 2010.*Orientação de estágio*

X Curso de Inverno de Fisiologia Comparativa (2013) - **Modulação purinérgica na biossíntese de N-acetyl-5HT (NAS).** Alunas: Andrieli Cansi (Universidade Estadual de Maringá) e Ceila Cintra (Centro Universitário de Itajubá);

IX Curso de Inverno de Fisiologia Comparativa (2012) - **Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de indolaminas e TNF pela glândula pineal.** Aluno: Raphael Barbosa (Universidade Federal do Maranhão).