FLÁVIA GOMES ILLA ORNELAS

CARACTERIZAÇÃO DE ECTO-NUCLEOTIDASES NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

FLÁVIA GOMES ILLA ORNELAS

CARACTERIZAÇÃO DE ECTO-NUCLEOTIDASES NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Zulma F. S. Ferreira

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ornelas, Flávia Gomes Illa.
Caracterização das enzimas de degradação de ATP na glândula pineal de ratos / Flávia Gomes Illa Ornelas. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Zulma F. da Silva Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Receptores purinérgico e cronofarmacologia.

Versão do título para o inglês: Caracterization of ATP-degrading enzymes in rat pineal gland.

1. ATP 2. Ecto-nucleotidases 3. Glândula pineal I. Ferreira, Profa. Dra. Zulma F. da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0156/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Gomes Illa Ornelas.

Título da Caracterização das enzimas de degradação de ATP na glândula pineal de ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Zulma F. da Silva Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas
Secretaria de Pós-Graduação
Edifício Biomédicas III
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415- CEP05508-900
Tel. (0xx11) 3091.7439 - Fax (0xx11) 3091.7423
E-mail: spgicb@usp.br
ICB

Programa: **FARMACOLOGIA**

Interessado(a): **FLAVIA GOMES ILLA ORNELAS**

Assunto: Pedido para aceitação de parecer emitido pela CEUA do Instituto de Biociências em substituição ao emitido pela CEUA do ICB

INFORMAÇÃO

A CPG/ICB, em **24/09/2013**, após análise das justificativas apresentadas, delibera em **caráter extritamente excepcional** pelo aceite do parecer emitido pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Biociências em substituição ao parecer emitido pela CEUA deste Instituto, devendo a interessada anexar cópia nos exemplares da Dissertação.

Na oportunidade, solicita que a Coordenadoria do Programa, bem como os orientadores, mais uma vez atentem para as normas e prazos estabelecidos pela Comissão de Pós-Graduação e Comissões de Ética em Animais e Humanos deste Instituto.

Encaminhe-se à Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em **Farmacologia** para ciência dos interessados e ao Coordenador da CEUA/ICB.

CPG/ICB, 24 de setembro de 2013

Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer
Presidente

Instituto de biociências

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF.CEUA/IB/012/2013
Ref. 2013.1.299.41.8

São Paulo, 25 de março de 2013

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que foi **APROVADO "AD-REFERENDUM"** da Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), nesta data, o Projeto "Caracterização das enzimas de degradação de ATP na glândula pineal de rato" - **Protocolo 175/2013**, de sua responsabilidade (Colaboradoras Flávia Gomes Illa Ornelas – ICB, Letícia D´Argenio Garcia, Débora Aparecida Moura e Sandra M. Muxel).

A pesquisadora responsável deverá comunicar a esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa.

Lembramos que deverão ser apresentados os relatórios anuais ou final, conforme modelo disponível no link desta Comissão.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariz Vainzof
Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilma. Sra.
Profa. Dra. ZULMA F. S. FERREIRA
Departamento de Fisiologia - IBUSP

Dedico este trabalho

Aos meus pais,

Por serem tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela dedicação e apoio constante para minha formação.

As minhas amigas e minha irmã por toda paciência e compreensão.

Ao Professor Walber Toma e a Professora Luciana Guimarães pelos ensinamentos de meus primeiros passos na carreira científica e ao meu grande amigo Leandro Molina por me acompanhar nesta caminhada desde o seu início.

Agradeço ao Departamento de Farmacologia do ICB, principalmente ao Professor Cristóforo Scavone, pelo suporte oferecido; as secretárias Mônica Nunes e Camila Gonçalves pela amizade e a Professora Lúcia Lopes e seu laboratório pelos ensinamentos.

Agradeço a agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho de alguma maneira:

A Sandra Muxel pela disponibilidade, ensinamentos e auxílio na realização dos métodos de RT-PCR desempenhados nesta dissertação.

A Professora Maria Rosa, a Daniela Zanini, a Naiara Stefanello e aos queridos do laboratório Enzitox da Universidade Federal de Santa Maria pelo auxílio na realização do método de atividade enzimática e pela receptividade durante minha estada no Rio Grande do Sul;

A Leila Campos e a Professora Luciana Pinato pelo auxílio, prontidão e dedicação na realização do método de imunohistoquímica;

Ao Professor Jean Sevigny e Julie Pelletier da Universidade Laval do Canadá por serem solícitos e pela disponibilização dos anticorpos utilizados nesta dissertação;

Agradeço também a Leticia Garcia e Luis Teodoro pela dedicação, incentivo, convívio e amizade, assim como a Professora Regina Markus e ao Professor Pedro Fernandes e a todos do Laboratório de Cronofarmacologia pelo inestimável auxílio e convivência.

E por ultimo e mais importante, agradeço a minha orientadora Professora Zulma Ferreira pela dedicação, por aceitar o desafio e acreditar na realização deste trabalho em apenas um ano.

Foi uma enorme satisfação dividir esse trabalho com vocês, que se encerra com a certeza de dever cumprido.

Obrigada!

"Posso ter defeitos, viver ansioso
e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida
é a maior empresa do mundo,
e posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
apesar de todos os desafios,
incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas
e se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si,
mas ser capaz de encontrar um oásis
no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um "não"
É ter segurança para receber uma crítica,
mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo…"

(Fernando Pessoa)

RESUMO

ORNELAS FGI - **Caracterização de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos.** [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A glândula pineal é um órgão neuroendócrino regulado pelo fotoperíodo ambiental. Na fase de escuro ocorre produção e liberação da melatonina, hormônio sinalizador do escuro. A principal inervação da pineal que regula a síntese de melatonina é constituída por fibras simpáticas provenientes do gânglio cervical superior que, liberando noradrenalina, ativam receptores β1 adrenérgicos resultando na produção noturna de melatonina, cuja biossíntese envolve a conversão da serotonina à N-acetilserotonina (NAS) e, posteriormente, a conversão deste à melatonina. O ATP, co-liberado com a noradrenalina, liga-se a receptores purinérgicos presentes na pineal e leva a uma potenciação da produção do precursor NAS. A sinalização purinérgica é modulada por uma rápida degradação enzimática que é funcionalmente importante, uma vez que metabólitos do ATP atuam como ligantes fisiológicos em receptores purinérgicos P1, que reconhecem adenosina, e P2, que reconhecem principalmente ATP, ADP e pirimidinas. Várias famílias de enzimas estão envolvidas na hidrólise de ATP liberado para o meio extracelular como as E-NTPDases, as E-NPPs e a ecto-5'-nucleotidase. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a expressão gênica, a atividade enzimática e a distribuição celular de enzimas de metabolização do ATP na glândula pineal de ratos. Os resultados evidenciaram a expressão constitutiva dos transcritos das ecto-nucleotidases - NTPDase (1, 2, 3, 5), NPP (1, 3, 4) e 5'nucleotidase. Em animais sacrificados a intervalos regulares de 4 horas ao longo de 24 h, estes transcritos apresentam uma variação temporal com um pico de expressão na fase de escuro. Este perfil temporal de expressão gênica pode ser correlacionado à atividade enzimática de ecto-nucleotidases na pineal que também revelou um aumento da hidrólise de ATP e de AMP na fase de escuro. Estudos de imunohistoquímica demonstraram a distribuição das enzimas NTPDase1, NTPDase3 e 5'nucleotidase por todo o parênquima da pineal e co-localizadas com astrócitos e micróglia em menor proporção. Estes resultados confirmam a presença de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos e apontam para a participação do sistema purinérgico no mecanismo modulatório da produção hormonal nesta glândula, através do aumento da hidrólise de ATP e AMP durante a fase de escuro com consequente produção de adenosina.

Palavras-chave: ATP. Ecto-nucleotidases. Glândula Pineal.

ABSTRACT

ORNELAS FGI. **Characterization of ecto-nucleotidases in the rat pineal gland.** [Thesis (Master's degree in Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The rat pineal gland is a neuroendocrine organ regulated by the environmental photoperiod leading to the production and release of the darkness hormone melatonin. The mainly innervation of the pineal gland that regulates the synthesis of melatonin is comprised of sympathetic fibers from the superior cervical ganglion that release noradrenaline, and activate β1 adrenergic receptors leading to the nocturnal conversion of serotonin to the N-acetylserotonin (NAS) and then to melatonin. ATP, co-released with noradrenaline binds to purinergic receptors present in the pineal gland and leads to an increase of the production in the precursor NAS. After released, ATP and other nucleotides undergo rapid enzymatic degradation that is functionally important, since metabolites of ATP act as physiological ligands in purinergic receptors P1 that recognize adenosine and P2 that recognize mainly ATP, ADP and pyrimidines. Several families of enzymes are involved in the hydrolysis of ATP released into the extracellular environment: the E-NTPDase the E-NPP and the ecto-5'-nucleotidase. The present study aimed to characterize the gene expression, the cellular distribution and the activity of the ecto-nucleotidases in the rat pineal gland. The results showed a constitutive expression of the ecto-nucleotidases NTPDase (1, 2, 3, 5), NPP (1, 3, 4) and 5'nucleotidase transcripts. Animals killed at 4 hours interval during 24 h showed a temporal variation in their expression that peaks in the dark phase. This temporal pattern correlated well to an increase in the hydrolysis of the ATP and AMP in the dark phase. Immunohistochemical studies revealed the cellular distribution of the NTPDase1, NTPDase3 and 5'nucleotidase in the whole parenchyma of the gland and co-localized with astrocytes and microglia. These results confirm the presence of ecto-nucleotidases in the rat pineal gland and point to a participation of the purinergic system in the modulatory mechanisms of the hormonal pineal output through the increase in the hydrolysis of ATP and AMP during the dark phase, leading to an increase in the production of adenosine in the dark phase.

Keywords: ATP. Ecto-nucleotidases. Pineal Gland.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de sinalização na biossíntese de melatonina em glândula pineal. 20
Figura 2 – Hidrólise de nucleotídeo pelas ecto-nucleotidases 23
Figura 3 - Representação esquemática do sistema purinérgico envolvendo ATP, enzimas de degradação e receptores 27
Figura 4 - Sinalização Intracelular dos Receptores Purinérgicos 28
Figura 5 - Expressão gênica das ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos 45
Figura 6 – Análise temporal da expressão gênica de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos – RT-PCR 46
Figura 7 – Análise temporal da expressão gênica de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos – RT-PCR em tempo real 48
Figura 8 – Atividade enzimática das ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos 50
Figura 9 – Distribuição celular de NTPDase 1 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com astrócitos. 52
Figura 10 – Distribuição celular de NTPDase 1 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com microglia 53
Figura 11 – Distribuição celular de NTPDase 3 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com astrócitos 55
Figura 12 – Distribuição celular de NTPDase 3 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com microglia 56
Figura 13 – Distribuição celular da 5'nucleotidase na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com astrócitos. 58
Figura 14 – Distribuição celular da 5'nucleotidase na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com microglia.....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Mecanismo de hidrólise das ecto-nucleotidases 24
Tabela 2 - Características Farmacológicas e Mecanismos de Transdução dos Receptores Purinérgicos 29
Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos inicidores para experimentos de RT-PCR 37
Tabela 4 - Anticorpos primários e secundários e as respectivas diluições utilizadas......41
Tabela 5 - Fator de correção do fosfato inorgânico.....49
Tabela 6 - Atividade enzimática nos diferentes tempos de reação. Dados mostrados em duplicata......49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α – alfa

β – beta

ɤ – gama

µM – micromolar

$[Ca^{2+}]i$ – concentração intracelular de cálcio

5-HT – serotonina

5-HTP – 5-hidroxitriptofano

AAAD – aminoácido aromático descarboxilase

AA-NAT – enzima arilalquilamina N-acetiltransferase

AC – adenilil ciclase

ADP – adenosina 5'difosfato

AMP – adenosina 5’monofosfato

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina 5'-trifosfato

bp – pares de base

Ca^{2+} - cálcio

cDNA – DNA complementar

CRE – elementos responsivos a AMPc

CREB – *Cyclic AMP Response Element Binding*

Cy3 – corante de cianina 3

Cy5 – corante de cianina 5

DAG – diacilglicerol

DAPI – 4’,6’-diamidino-2-fenilindol

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNase – desoxiribonuclease

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTT – ditiotreitol

ED-1 – marcador de microglia

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

E-NPPs – ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDases – ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases

epm – erro padrão da média

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase

GDP – guanosina 5’-difosfato

GFAP – *glial fibrillary acidic protein* (marcador de astrócito)

GMP – guanosina 5’-monofosfato

GTP – guanosina 5’-trifosfato

HIOMT – enzima hidroxindol-O-metiltransferase

IP3 – trifosfato de inositol

ISO – isoproterenol

K^+ – potássio

MAO – monoamina oxidase

MAPKs – proteínas quinases ativadas por mitógenos

Mn^{2+} - magnésio

Na^+ - sódio

NA – noradrenalina

NAS – N-acetilserotonina

NPY – neuropepitídeo Y

NSQ – núcleos supraquiasmáticos

PBS – *fosfate buffer saline*

PCR – reação em cadeia da polimerase

Pi – fosfato

PKA – proteína quinase dependente de AMPc

PKC – proteína quinase dependente de cálcio

PLA – foslolipase A

PLC – fosfolipase C

RNA – ácido ribonucleico

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

PVN – núcleo paraventricular

RT-PCR – reação de transcriptase reversa em cadeia de polimerase

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TM – temperatura de *Melting*

TPOH – enzima triptofano hidroxilase 1

UDP – uridina-5'-difosfato

UTP – uridina-5'-trifosfato

Zn^{2+} - zinco

ZT – *Zeitgeber time*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **17**

1.1 GLÂNDULA PINEAL E MELATONINA 18

1.2 SISTEMA PURINÉRGICO 21

1.3 ECTO-NUCLEOTIDASES 22

1.3.1 E-NTPDases 24

1.3.2 E-NPPs 25

1.3.3 Ecto-5'nucleotidase 26

1.4 RECEPTORES PURINÉRGICOS 27

2 OBJETIVOS **31**

ESTRATÉGIAS 32

3 MATERIAIS E MÉTODOS **33**

3.1 ANIMAIS 34

3.2 RETIRADA DA GLÂNDULA PINEAL 34

3.3 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) 34

3.4 SÍNTESE DA FITA DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA) POR TRANSCRIPTASE REVERSA 35

3.5 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES 36

3.6 RT-PCR – ENSAIOS DE TRANSCRIPTASE REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE 37

3.7 RT-PCR EM TEMPO REAL 38

3.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA 39

3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA – "FREE FLOATING" 40

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 42

4 RESULTADOS **43**

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS 44

4.1.1 RNA total 44

4.1.2 Presença de transcritos das ecto-nucleotidases 44
4.1.3 Análise temporal da expressão das ecto-nucleotidases.....46
4.1.3.1 RT-PCR.....46
4.1.3.2 RT-PCR em tempo real.....47
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ECTO-NUCLEOTIDASES NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS.....49
4.3 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS ECTO-NUCLEOTIDASES POR IMUNOHISTOQUÍMICA 51
5 DISCUSSÃO 60
5.1 EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DOS TRANSCRITOS DE ECTO-NUCLEOTIDASES.....61
5.2 VARIAÇÃO TEMPORAL DE TRANSCRITOS DE ECTO-NUCLEOTIDASES NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS.....63
5.3 HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS 64
5.4 LOCALIZAÇÃO CELULAR DE ECTO-NUCLEOTIDASES NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS 65
6 CONCLUSÃO 68
REFERÊNCIAS 70
ANEXO I- CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO: FASEB 77
ANEXO II- CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO: CLUBE DE PURINAS.....78
ANEXO III- CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO: SBFTE.....79

1 INTRODUÇÃO

Existe um sistema de grande complexidade que regula a organização temporal de diversas funções biológicas permitindo um ajuste do ciclo claro/escuro. O dia e a noite são os grandes regentes de nossas funções rítmicas e a alternância claro/escuro ambiental tem que ser traduzida em termos neurais e hormonais (revisto por Simonneaux, Ribelayga, 2003).

Para poder marcar o tempo, o nosso organismo possui o chamado relógio biológico, que cicla com um período de aproximadamente 24 horas. O relógio biológico central corresponde a um grupo de neurônios localizados no hipotálamo, conhecido como núcleo supraquiasmático (NSQ). As células do NSQ mantêm esse ritmo de aproximadamente 24 horas mesmo quando colocadas em cultura, mostrando que sua atividade rítmica independe de informação temporal do meio ambiente. Para sincronizar-se aos ritmos ambientais estas células recebem diariamente informação de claro/escuro, através de uma via sináptica que conecta a retina ao NSQ. A retina contém não apenas fotorreceptores que nos permitem distinguir formas e cores, mas contém também células ganglionares com um pigmento chamado melanopsina responsável por levar a informação de luz aos NSQ (Provencio et al., 2000). A informação de luz ajusta o relógio cada vez que se inicia um novo dia e o NSQ então redireciona a informação à glândula pineal que, em resposta ao estímulo, secreta o hormônio melatonina durante o escuro (Reiter, 1993).

1.1 Glândula pineal e Melatonina

A glândula pineal é um órgão localizado fora da barreira hematoencefálica, entre os dois hemisférios cerebrais, à frente do cerebelo, na posição posterodorsal do diencéfalo em humanos Os componentes celulares da pineal em roedores e humanos são semelhantes. No parênquima da glândula são encontrados: pinealócitos e células da glia (astrócitos, micróglia, oligodendrócitos), sendo o pinealócito, a célula produtora de melatonina e o tipo celular mais abundante (Møller, Baeres, 2002).

A glândula pineal de mamíferos é inervada por fibras de várias origens, sendo a principal uma via multissináptica que se inicia na retina e regula o ritmo de produção de melatonina. As informações fóticas captadas pela retina através da

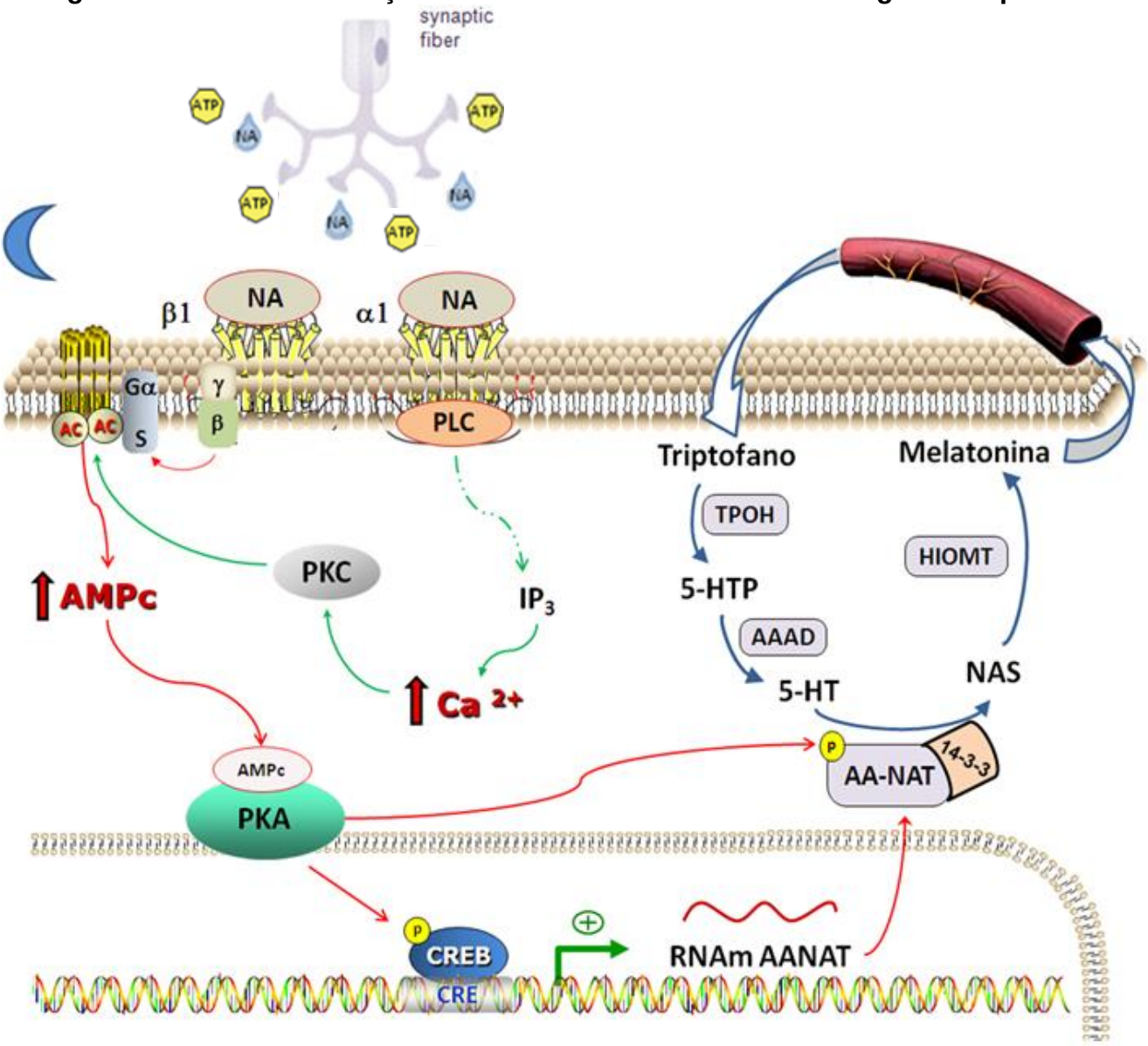
melanopsina chegam ao NSQ via fibras retino-hipotalâmicas e, a partir daí, são transmitidas para a área retro-quiasmática do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que se projeta direta ou indiretamente, sobre a coluna intermediolateral da medula espinal. Esta por sua vez, projeta-se sobre o gânglio cervical superior de onde partem fibras simpáticas pós-ganglionares que inervam a pineal (Klein, Moore, 1979).

A síntese de melatonina se inicia a partir do aminoácido triptofano proveniente da circulação. O triptofano é convertido pela ação da enzima Triptofano-Hidroxilase-1 (TPOH) à 5-Hidroxitriptofano (5-HTP). Este é descarboxilado pelo aminoácido aromático descarboxilase (AAAD) dando origem à serotonina (5-HT). A serotonina poderá sofrer exocitose ou ser acetilada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) dando origem à N-acetilserotonina (NAS). A NAS será então metilada pela enzima hidroxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT) formando por fim a melatonina (Axelrod, Weissbach, 1960; Sugden, 1989; revisto por Simonneaux, Ribelayga, 2003).

No controle da síntese de melatonina, a noradrenalina (NA) liberada pelas fibras pós-ganglionares simpáticas estimula adrenoceptores beta 1 (β1) ativando a adeniliciclase (AC) e aumentando os níveis intracelulares de adenosina de monofosfato ciclica (AMPc) que leva, então, à ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Em roedores, o aumento do AMPc e, consequentemente, a ativação da PKA fazem com que a subunidade catalítica da PKA fosforile o fator de transcrição CREB (do inglês, sigla para *Cyclic AMP Response Element Binding*). Este, por sua vez, se liga ao seu sítio CRE (elementos responsivos a AMPc) na região promotora do gene *Aa-nat*, induzindo a transcrição seguida da tradução citoplasmática da enzima. Após a fosforilação da AA-NAT pela própria PKA e ligação com a proteína chaperona (14-3-3), esta enzima estabiliza-se tornando-se ativa, sendo a enzima chave para acetilar a serotonina (5-HT) transformando-a em N-acetilserotonina (NAS). Todo esse efeito da estimulação de adrenoceptores β1 é potenciado pela estimulação de adrenoceptores alfa 1 (α1), cuja interação induz a hidrólise de fosfoinositídeos, através da ativação da fosfolipase C (PLC), com aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) e geração de diacilglicerol (DAG). Este por sua vez, irá ativar a proteína quinase C (PKC) capaz de potenciar o aumento da produção de AMPc induzido pela

estimulação de adrenoceptores β1 (Klein et al., 1983; Ganguly et al., 2001; Klein, 2007).

Figura 1 - Vias de sinalização na biossíntese de melatonina na glândula pineal.



Legenda: A noradrenalina (NA) ao ativar o receptor β1 irá deslocar a subunidade αs da proteína G ativando a adenililciclase (AC), aumentando os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) que irá ativar a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA irá fosforilar o fator de transcrição CREB que irá promover a transcrição da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), enzima chave para acetilar a serotonina (5-HT) transformando-a em N-acetilserotonina (NAS). A ativação dos receptores α1 irão potenciar essa resposta dos receptores β através do aumento dos níveis de cálcio intracelular (Ca^{2+}). O aminoácido triptofano capturado da circulação sofre reações enzimáticas sequenciais que culmina na formação de melatonina, sendo prontamente liberada na circulação.Abreviaturas: CREB – fator de transcrição, TPOH - Triptofano-Hidroxilase-1, 5-HTP - 5-Hidroxitriptofano, AAAD - aminoácido aromático descarboxilase, 5-HT - serotonina, HIOMT - hidroxi-indol-O-metiltransferase, PLC - fosfolipase C, PKC – proteína quinase C (Adaptada de Cecon, 2010).

N-acetil-5-methoxitriptamina (melatonina) é ubiquamente distribuída na natureza e detectada em vertebrados, invertebrados, plantas e também em eucariotos e procariotos. Quimicamente, é uma indolamina sintetizada a partir do triptofano (aminoácido essencial encontrado nas proteínas) e, devido ao seu caráter anfifílico, pode atravessar facilmente as membranas celulares por difusão (Hardeland et al., 2011; Iriti at al., 2010; Reiter et al., 2010; Slominski et al., 2008; Stehle et al., 2011; Tan et al., 2003).

O controle da produção de melatonina pela glândula pineal somente na fase de escuro é observado na enorme maioria das espécies já estudadas, sejam estas espécies de atividade diurna, noturna ou crepuscular. A duração de sua concentração plasmática está na dependência da duração da fase de escuro. Dessa forma, esta característica de produção noturna da melatonina é um fator decisivo para que o organismo possa prever e se adaptar às variações diárias e sazonais (Simmoneaux, Ribelayga, 2003).

Na glândula pineal, a exocitose da vesícula sináptica libera juntamente com a noradrenalina, o nucleotídeo adenosina 5’trifosfato (ATP). A existência de uma cotransmissão noradrenérgica--purinérgica na glândula pineal foi funcionalmente evidenciada por nosso grupo através de um bioensaio que permitiu acessar a importância de ambos os transmissores (noradrenalina e ATP) no metabolismo da glândula pineal. Sob estimulação elétrica transmural dos terminais nervosos que inervam a pineal (30 V, 0,5 ms), noradrenalina foi liberada de maneira dependente da frequência de estimulação (1, 3 e 10 Hz) e melatonina foi sintetizada de maneira dependente do tempo de estimulação (15, 30 e 90 min). A incubação com o antagonista beta-adrenérgico propranolol, bloqueou completamente a produção de NAS, precursor imediato da melatonina, enquanto os antagonistas de receptores P2, PPADS e suramina, bloquearam parcialmente esta produção, apontando para a relevância fisiológica do papel da cotransmissão noradrenérgica--purinérgica neste sistema (Mortani--Barbosa et al., 2000).

1.2 Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico inclui: as purinas derivadas da adenina (os nucleotídeos adenosina 5’trifosfato - ATP, adenosina 5’difosfato - ADP, adenosina 5’monofosfato -

AMP e o nucleosídeo adenosina); as purinas derivadas da guanina (os nucleotídeos guanosina 5'trifosfato -GTP, guanosina 5'difosfato -GDP, guanosina 5'monofosfato -GMP e o nucleosídeo guanosina), além dos metabólitos xantina, hipoxantina, ácido úrico e o nucleosídeo inosina, bem como receptores, transportadores e enzimas (Schmidt et al., 2007).

O ATP é um nucleotídeo existente em todas as células (Bours et al., 2006). Além de ser considerado uma fonte clássica de energia no metabolismo intracelular, age no meio extracelular, como neurotransmissor e neuromodulador no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), além de regular outros processos biológicos como, por exemplo, crescimento, diferenciação, função cardíaca e contração muscular (James, Butt, 1999; Torres et al., 2002; Zimmermann 1999).

Assim como outros neurotransmissores, no SNC, o ATP é estocado em vesículas intracelulares e, após um estímulo neuronal, ele é liberado pelas terminações nervosas na fenda sináptica. Além das evidências da liberação de ATP por exocitose vesicular em células neuronais (Pankratov et al., 2007), estudos também suportam a liberação vesicular de ATP em astrócitos (Bowser, Khakh, 2007) através da ação de lisossomos (Zhang et al., 2007).

Após a liberação, o ATP pode ligar-se a receptores purinérgicos do tipo P2 ou ser alvo de metabolização enzimática. ADP é o primeiro produto gerado na hidrólise do ATP, e o AMP é um intermediário obrigatório da hidrólise do ATP em adenosina (Barsotti, Ipata, 2004). O nucleosídeo adenosina pode ser captado pelas células através de transportadores específicos, o que garante a reutilização dessa molécula para a síntese de ATP intracelular (Robson et al., 2006).

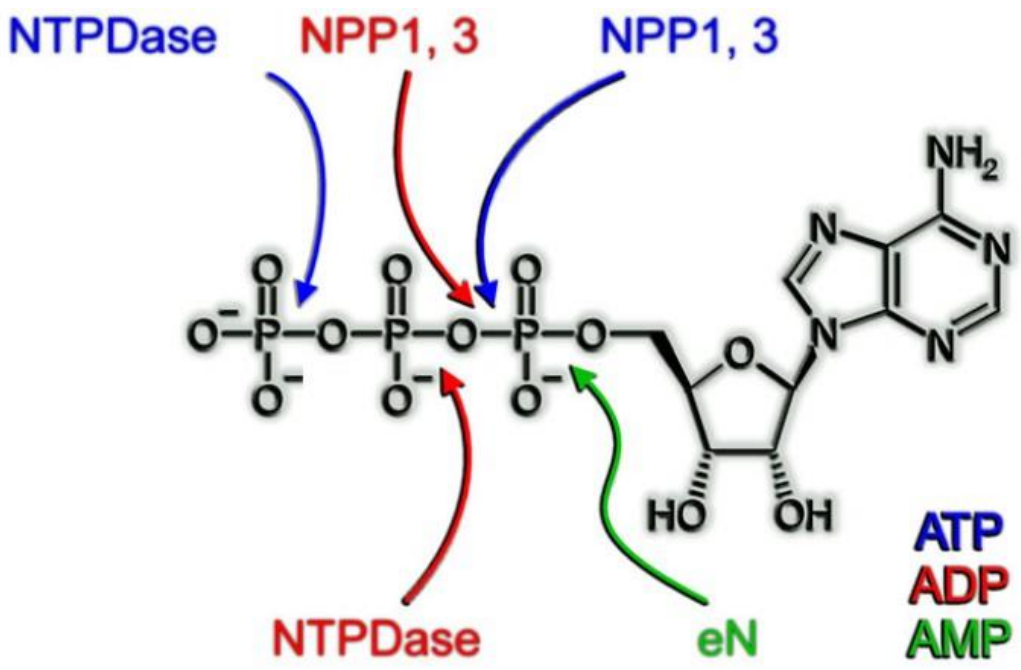
A metabolização realizada pelas enzimas é funcionalmente importante, uma vez que o ATP e seus metabólitos atuam como ligantes fisiológicos em diferentes receptores purinérgicos (Zimmermann, 2006).

1.3 Ecto-nucleotidases

Várias famílias de enzimas estão envolvidas na hidrólise de ATP liberado para o meio extracelular. Dentre as enzimas associadas às membranas encontramos: as ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDases; apirases), as ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs) e a ecto-5'nucleotidase (Shirley

et al., 2009). Essas enzimas constituem uma cascata enzimática altamente eficiente que, através de reações sucessivas, controlam a concentração de ATP bem como o tempo em que este e seus metabólitos permanecem no espaço extracelular (Zimmermann, 2006).

Figura 2 – Hidrólise de nucleotídeos pelas ecto-nucleotidases



Legenda: As setas indicam os locais de hidrólise de ATP: entre os fosfatos α e β pelas enzimas NPPs e entre os fosfatos β e ɤ pelas enzimas NTPDases. Seta azul, vermelha e verde indicam os locais de hidrólise de ATP, ADP e AMP respectivamente (eN = 5'nucleotidase) (Figura adaptada de Zimmermann et al., 2012).

Além do controle da sinalização purinérgica, as ecto-nucleotidases garantem uma recuperação das purinas, uma vez que os nucleotídeos não retornam ao interior das células sem antes terem seus grupamentos fosfatos terminais retirados. A atividade dessas enzimas é dependente da presença de Ca^{2+} no caso das enzimas NTPDases, de magnésio (Mg^{2+}) no caso da enzima 5'nucleotidase e de zinco (Zn^{2+}), no caso das enzimas NPPs (Bonan, 2012).

Tabela 1- Mecanismo de hidrólise das ecto-nucleotidases

Enzimas	Mecanismo de Hidrólise
NTPDases	
NTPDase 1	ATP → ADP + Pi → AMP + 2P_i ADP → AMP + P_i
NTPDase 2	ATP → ADP + P_i ADP → AMP + P_i
NTPDase 3 NTPDase 5 NTPDase 8	ATP → ADP + P_i ADP → AMP + P_i
NPPs	
NPP 1 NPP 3	ATP → AMP + PP_i ADP → AMP + P_i 3',5'-cAMP → AMP
NPP 2	ATP → AMP + PP_i ADP → AMP + P_i 3',5'-cAMP → AMP
Ecto-5'nucleotidase	AMP → adenosina + P_i

Abreviaturas: NTPDase - ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase; NPP - ecto-nucleosídeo-pirofosfatase/fosfodiesterase; ATP - adenosina 5'-trifosfato; ADP - adenosina 5'-difosfato; AMP - adenosina 5'monofosfato; Pi - fosfato; AMPc - monofosfato cíclico de adenosina (Tabela adaptada de Shirley et al., 2009).

1.3.1 E-NTPDases

A primeira etapa de hidrólise do ATP pode ser catalisada por uma família de enzimas, atualmente denominadas de ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase,

E-NTPDases. Estas enzimas apresentam uma distribuição tecidual diferenciada e podem também ser simultaneamente expressas por um mesmo tipo celular, indicando que a sinalização purinérgica é sujeita a uma complexa regulação (Kukulski et al., 2011). Funcionam como ecto-enzimas, visto que se encontram ancoradas à membrana plasmática através de um duplo sítio catalítico transmembrana e um *loop* voltado para o meio extracelular (Robson et al., 2006).

Os primeiros estudos sobre essas enzimas coincidem com as primeiras investigações sobre os processos básicos do metabolismo celular, tais como a fermentação em células de leveduras e plantas (Battastini et al., 2011). Hoje se sabe que a família das E-NTPDases é composta por 8 enzimas distintas que hidrolisam nucleotídeos como ATP, GTP e uracila 5'trifosfato (UTP). Dentro dessa família, as enzimas NTPDases 1, 2, 3 e 8 são as de maior destaque no que diz respeito ao controle da resposta purinérgica. A enzima NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP diretamente para AMP e UTP a uracila 5'difosfato (UDP), sendo a hidrólise de igual preferência (Zimmermann, 2001). A enzima NTPDase 1 irá retirar um fosfato por vez do ATP, rapidamente formando AMP com pouco acúmulo de ADP (Kukulski et. al., 2005; Laliberté et al., 1983) enquanto a enzima NTPDase 2 apresenta grande preferência por ATP podendo, portanto, favorecer o acúmulo extracellular de ADP (Burnstock, 2006; Sevigny et al., 2002). As enzimas NTPDase 3 e NTPDase 8 revelam uma preferência intermediária por ATP sobre ADP também podendo causar um acúmulo de difosfonucleosídeos, enquanto as enzimas NTPDases 4 e NTPDase 7 são enzimas extracelulares que não participam da sinalização purinérgica (Kukulski et. al., 2005). O AMP produzido pela atividade das enzimas NTPDases é, posteriormente, hidrolisado a adenosina pela enzima 5'nucleotidase (Robson et al., 2006).

1.3.2 E-NPPs

A família das enzimas E-NPPs é constituida por 7 membros. As NPP1 e NPP3 se caracterizam com um domínio transmembrana, uma pequena região n-terminal citoplasmátipa e um loop extracelular com a porção C-terminal. A NPP2 é uma enzima secretada e não apresenta domínio transmenbrana. As demais NPPs, 4, 5, 6 e 7 possuem seu ecto-domínio invertido, podemos ver que sua região C-terminal é

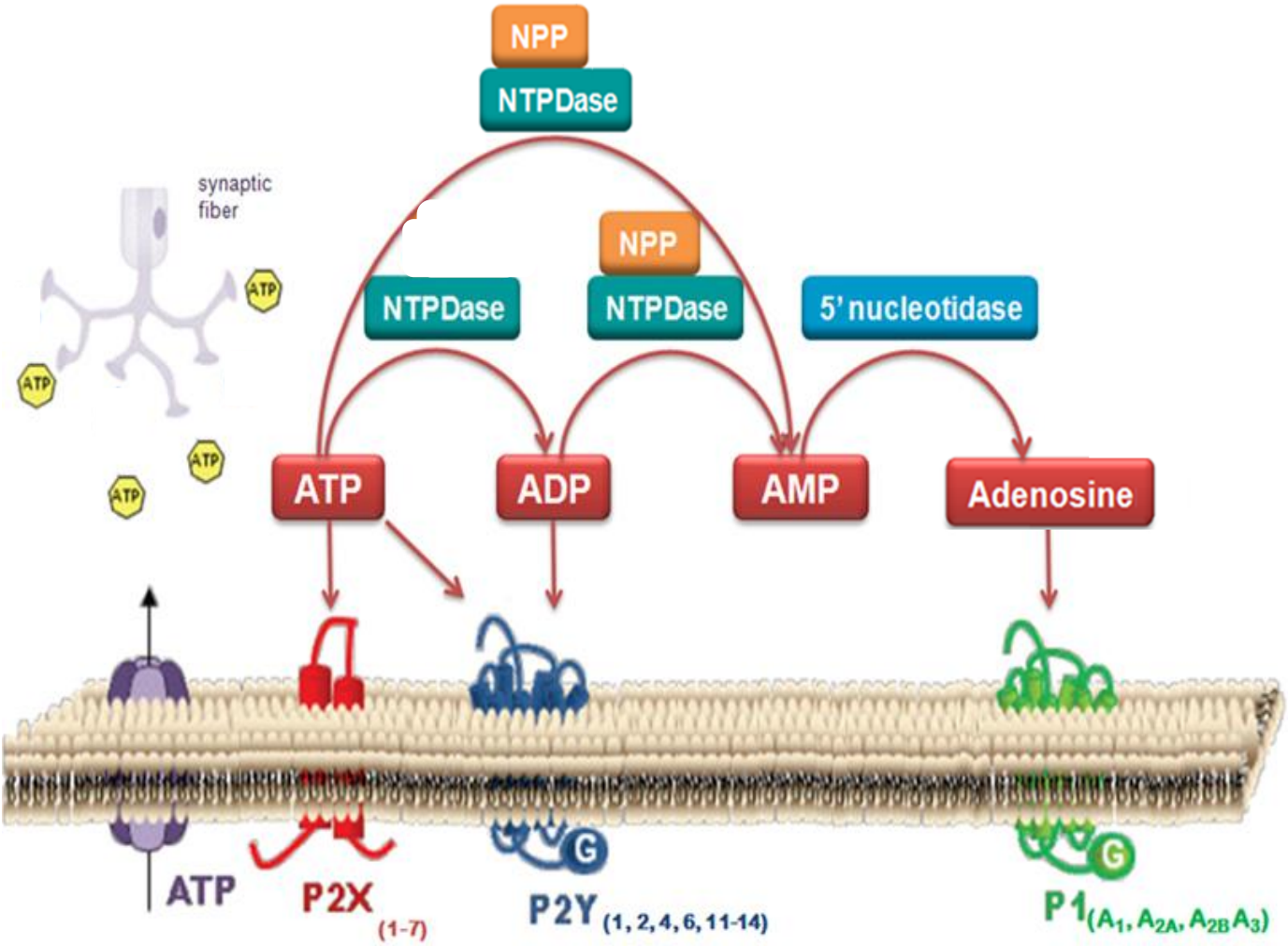
intracelular e a N-terminal extracelular (Bonan, 2012). Essa diferença conformacional e pelo fato da NPP 2 não apresentar domínio transmembrana faz com que somente a NPP1 e NPP3 estejam envolvidas com o sistema purinérgico por serem capazes de hidrolisar nucleotídeos. As enzimas NPP 1 e NPP 3 metabolizam a molécula de ATP em AMP + PPi e a molécula de ADP em AMP + Pi (Cappellari et al., 2012) de maneira mais eficiente do que a NPP 2 (Gijsbers et al., 2003). Esta última possui preferência por substratos fosfolípides, assim como as enzimas E-NPPs 4 - 7. Vale ressaltar que as enzimas E-NPPs são mais ativas em pH alcalino (Zimmermann et al., 2012).

1.3.3 Ecto-5’nucleotidase

A família da ecto-5’nucleotidase é uma família de uma única enzima, a 5’nucleotidase (5’-NT/CD73). Ela possue dois domínios transmembrana, com dois loops extracelulares contendo as porções C’ e N’ terminais no meio extracelular. A hidrólise do AMP até adenosina é catalisada somente pela enzima 5’-nucleotidase (Burnstock, 2006) sendo a principal fonte de adenosina no meio extracelular (Colgan et al., 2006).

Em resumo, apresentamos uma representação esquemática do sistema purinérgico envolvendo ATP, enzimas de degradação e os receptores purinérgicos (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática do sistema purinérgico envolvendo ATP, enzimas de degradação e receptores



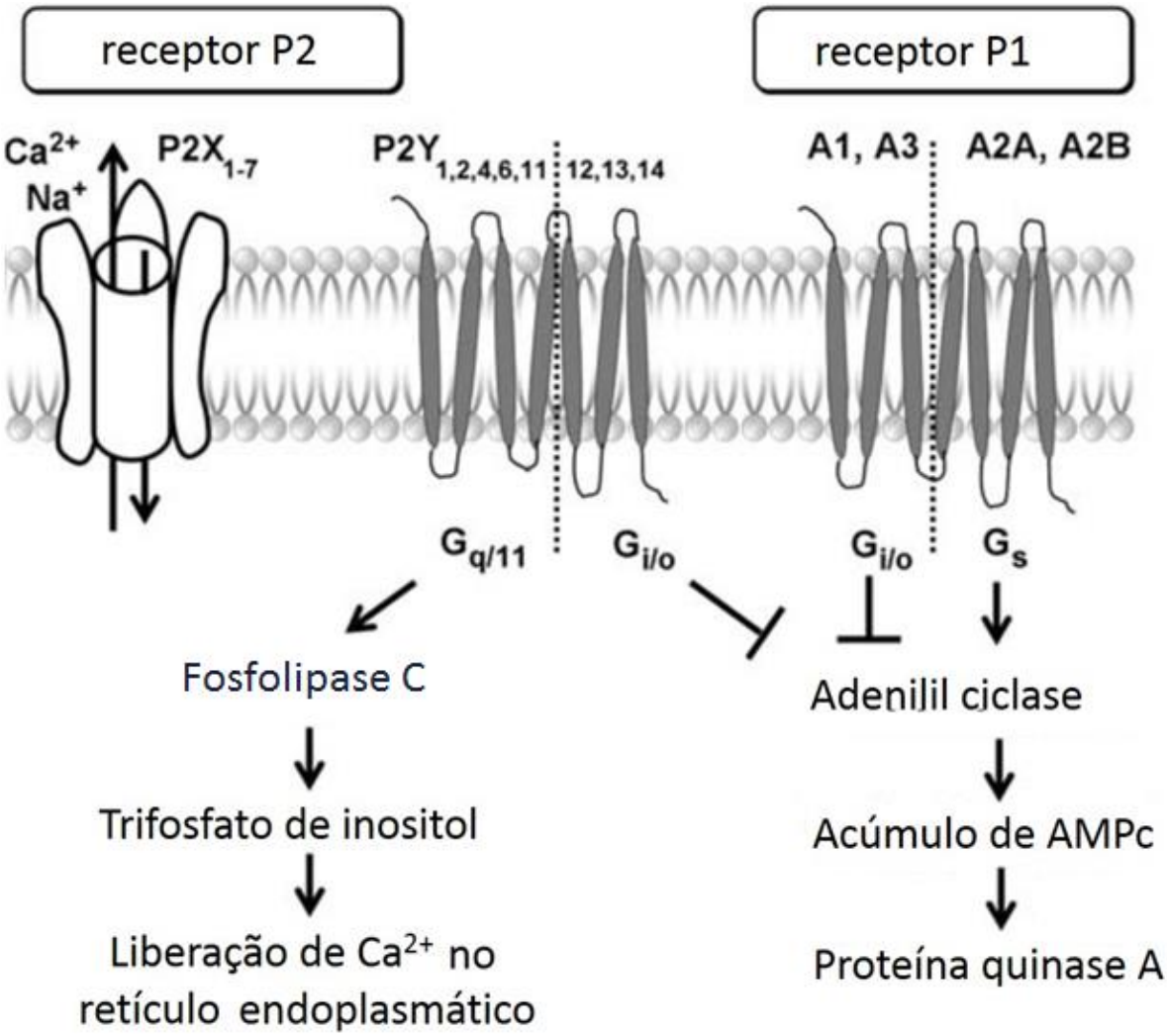
Legenda: O ATP liberado, por exemplo, por exocitose vesicular do terminal nervoso simpático, atua como cotransmissor em receptores purinérgicos P2X e P2Y. ADP e adenosina são gerados através da atividade de ecto-nucleotidases ativando receptores P2Y e P1, respectivamente. A liberação de ATP pode também ser efetuada via canais na membrana celular evocando ações autócrinas ou parácrina.

1.4 Receptores purinérgicos

Existem duas famílias de receptores purinérgicos denominadas P1, em que a adenosina é o ligante natural, e P2, que reconhecem principalmente ATP, ADP e pirimidinas (Ralevic, Burnstock, 1998). Os receptores P1 já foram caracterizados contendo 4 subtipos: A1, A2a, A2b e A3 (Coddou, et al., 2011). A família de receptores P2, por sua vez, apresenta-se dividida em dois subgrupos: P2X e P2Y.

Os receptores P2X são proteínas de membrana que formam um canal iônico e sua ativação promove a passagem não seletiva de cátions, regulando os níveis de Ca^{2+}, sódio (Na^{+}) e potássio (K^{+}). O subgrupo P2Y é um receptor metabotrópico, acoplado a proteína G e sua ativação promove a alteração dos níveis de AMPc e $[Ca^{2+}]_i$ na dependência do acoplamento à proteína G (Gs, Gi ou Gq/11). Os receptores P2X contém 7 subtipos: P2X1 à P2X7 e os receptores P2Y contém 8 subtipos conhecidos como: P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14 (Figura 4).

Figura 4 - Sinalização Intracelular dos Receptores Purinérgicos



Fonte: Figura adaptada de Stagg, Smyth, 2010.

A tabela 2 a seguir apresenta um resumo das principais características farmacológicas e dos mecanismos de transdução de sinal dos receptores purinérgicos.

Tabela 2 - Características Farmacológicas e Mecanismos de Transdução dos Receptores Purinérgicos

	Receptor P1	Receptor P2	
Ligante endógeno	Adenosina	ATP ADP UTP UDP Dinucleotídeos de adenosina	
Subgrupo	A	P2X	P2Y
Tipo de Receptor	Acoplados à proteína G: G_s, G_q, G_i, G_o	Canal iônico	Acoplados à proteína G: $G_{q/11}$, G_i, G_s
Subtipos	A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3	$P2X_{1-7}$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$
Efetores	IP_3, Ca^{2+}, AMPc	$Ca^{2+} > Na^+ > K^+$	IP_3, Ca^{2+}, DAG, AMPc

Abreviaturas: ATP - adenosina 5'-trifosfato; ADP - adenosina 5'-difosfato; UTP - uridina-5'-trifosfato; UDP - uridina-5'-difosfato; IP_3- trifosfato de inositol; AMPc- adenosina monofosfato cíclica; DAG - diacilglicerol (Tabela adaptada de Petrilli, 2012).

Na glândula pineal de ratos já foram caracterizados receptores P1 do subtipo A2B (Nikodijevic, Klein, 1989; Gharib et al., 1992) e receptores P2 do subtipo P2Y1 (Ferreira et al., 1994; Ferreira, Markus, 2001) e P2X7 (Souza-Teodoro, 2013).

Funcionalmente, os eventos intracelulares decorrentes da estimulação destes receptores na glândula pineal levam a diferentes eventos biológicos. A ativação de receptores P2Y1 e P2X7 leva a uma potenciação da produção do precursor NAS (Ferreira, Markus, 2001; Ferreira et al., 2003). Sobre os níveis de melatonina, contudo, a ativação destes receptores P2 leva a uma inibição de melatonina

induzida por noradrenalina, enquanto a ativação dos receptores P1 leva a uma potenciação da produção desta indolamina (Petrilli, 2012; Souza-Teodoro, 2013).

Estes resultados foram demonstrados recentemente pelo nosso grupo e sugerem, através da hidrólise de ATP, um efeito modulatório das purinas sobre a função neuroendócrina da glândula pineal. A caracterização da modulação desse sistema requer um estudo detalhado das enzimas de metabolização do ATP na glândula pineal, constituindo então, o objetivo deste trabalho.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a expressão gênica, a distribuição celular e a atividade das ecto-nucleotidases - NTPDases, NPPs e 5'nucleotidase - na glândula pineal de ratos.

Estratégias

1. Verificar a expressão gênica e o padrão temporal de expressão de ecto-nucleotidases através das técnicas de RT-PCR e RT-PCR em tempo real em glândulas pineais de animais sacrificados a intervalos regulares do ciclo de iluminação ambiental.
2. Determinar a atividade de ecto-nucleotidases na pineal nos períodos de claro e escuro.
3. Caracterizar a distribuição celular das ecto-nucleotidases identificadas na pineal através da técnica de imuno-histoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos fêmeas da linhagem Wistar, entre 6 e 7 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Os animais foram mantidos em grupos de, no máximo, cinco animais por gaiola de polipropileno, com temperatura controlada em 22°C e acesso à água e ração *ad libitum*. O ciclo claro/escuro empregado foi o de 12/12 horas, sendo as luzes acesas às 06 horas e apagadas às 18 horas. O horário de acender das luzes é considerado como *"Zeitgeber Time"* 0 (ZT 0). ZT é um termo alemão que significa "doador de tempo", caracterizado como um sinal do ambiente que promove a sincronização do ritmo endógeno do organismo. Os animais foram sacrificados por decapitação e os protocolos experimentais foram feitos de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo: 175/2013).

3.2 Retirada da glândula pineal

Os animais foram sacrificados a intervalos regulares de 4 horas ao longo de 24 horas, sendo sacrificados em ZT 4, ZT 8, ZT 12, ZT 16, ZT 20 e ZT 24. Após os animais serem decapitados as glândulas pineais foram retiradas com auxílio de uma pinça e imediatamente colocadas em tubos *eppendorfs* no gelo seco.

3.3 Extração de ácido ribonucleico (RNA)

As glândulas pineais foram homogeneizadas individualmente em 100 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen Life Technology, Carlsbad- CA, EUA), com auxílio de um homogeneizador e pistilo, depois completamos o volume para 1 mL. Em seguida, adicionamos 200 µL de clorofórmio, agitamos manualmente e vigorosamente por 15 segundos, os tubos foram mantidos por cerca de 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugados (12000 x g; 15 min; 4ºC) para separação da fase aquosa que contém o RNA. O RNA foi precipitado com 400 µL de isopropranol por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação (12000 x g; 10 min; 4ºC). O

sobrenadante foi removido, o *pellet* lavado duas vezes com 500 µL de etanol 75 %, centrifugado (7500 x g; 5 min; 4ºC) e o excesso de etanol evaporado a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Após esse período, o material foi ressuspendido em 10 µL de água estéril para injeção (RNase *free*) e tratado com desoxiribonuclease (DNase) (Invitrogem Life Technology, Carlsbad- CA, EUA) conforme instruções do fabricante. Em resumo, a cada amostra foi adicionado 1 µL de tampão 10x DNase I *Reaction Buffer* (Invitrogem Life) e 1 µL DNase I (1 U/µL- Invitrogem Life). As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e, para inativação da DNase, foi acrescentado 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (25 mM – Invitrogen Life) seguido de incubação a 65ºC por 10 minutos. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop®).

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

Realizamos a síntese de cDNA a partir de RNA total (0,5 µg) diluído em água RNase-*free* em um volume de 12 µL, ao qual adicionamos 1 µL de *random primer* (50 ng/µL – Invitrogen Life) e 1 µL dNTP mix (10 mM- Invitrogen Life). A amostra foi incubada inicialmente a 65ºC por 5 minutos. Imediatamente após a incubação, foi transferida para cuba com gelo, adicionando-se 4 µL de tampão PCR 5x (Invitrogen Life), 1 µL DTT (0,1 M, Invitrogen Life) e 1 µL Superscript III RT (200 U/ µL- Invitrogen Life), finalizando um volume de 20 µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 minutos a 25ºC, 50ºC por 55 minutos, sendo a reação inativada a 70ºC por 15 minutos, em termociclador MasterCycler Personal (Eppendorf). Um controle negativo contendo todos os componentes da reação exceto a enzima SuperScript III foi realizado para excluir a possibilidade de contaminação de ácido desoxirribonucleico (DNA) nas amostras de RNA. O cDNA produzido foi estocado a -20°C até ser utilizado nos ensaios de transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real.

3.5 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram desenhados uma sequência senso e anti-senso de oligonucleotídeo iniciadores (*primers*) para cada gene das seguintes enzimas: ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase 1 (NTPDase 1), ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase 2 (NTPDase 2), ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase 3 (NTPDase 3), ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase 5 (NTPDase 5), ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase 8 (NTPDase 8), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (NPP 1), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/ fosfodiesterase 2 (NPP 2), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 3 (NPP 3), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 4 (NPP 4), ecto-5'nucleotidase e para gliceraldeído 3-fosfato dehidrogenase (G*apdh*), utilizado como controle interno. As sequências dos genes foram desenhadas de maneira que o produto amplificado ficasse localizado próximo da terminação 3´ e possuísse em torno de 100 pares de bases (100 bp) para realização do RT-PCR quantitativo (RT-PCR em tempo real). 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 auxíilio dos Softwares BioEdit Sequence Aligment Editor e Annhyb 4.946 e sintetizados pela Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil.

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos inicidores para experimentos de RT-PCR

		Sequencia do primer	T (°C)	Tamanho (Bp)
NTPDase 1	*(senso)*	5'-AGTATGGGATTGTGCTGGATG-3'	57	146
	(anti-senso)	5'-TCTGAGCGTATTTTGAGATTCCG-3'		
NTPDase 2	*(senso)*	5'-CGGGATGTACCCAGAGACAG-3'	60	109
	(anti-senso)	5'-TCAAGCACCCTGGCTGT-3'		
NTPDase 3	*(senso)*	5'-AGATAGGGCCCCACTCAACT-3'	59	126
	(anti-senso)	5'-TCTCCCTCCGTATTCCTCCT-3'		
NTPDase 5	*(senso)*	5'-GGTTCTGAAGGCAACGGC-3'	58	135
	(anti-senso)	5'-GGACCCATCCATGATGCT-3'		
NTPDase 8	*(senso)*	5'-CCTGAAGAGCTGCCTGCA-3'	57	145
	(anti-senso)	5'-GACTGCAGCTAGGATGTC-3'		
NPP 1	*(senso)*	5'-GGGTTGAAACCAAGCTGTGC-3'	59	122
	(anti-senso)	5'-GAAATCCAGACAGCAGTTCC-3'		
NPP 2	*(senso)*	5'-CGGGATGTACCCAGAGACAG-3'	61	109
	(anti-senso)	5'-TCAAGCACCCTGGCTGT-3'		
NPP 3	*(senso)*	5'-GCAATTCCGTCCCATATG-3'	58	136
	(anti-senso)	5'-CAGCACTGACTGGTCCACT-3'		
NPP 4	*(senso)*	5'-GGGAAGAACCGGATGTAAG-3'	59	122
	(anti-senso)	5'-CCTAACGCCTTGAGCTTTTG-3'		
5'nucleotidase	*(senso)*	5'-AGAGGCGTGGACGTCGTGG-3'	62	83
	(anti-senso)	5'-CCCAGCAGGCACCTCTTTGGA-3'		
GAPDH	*(senso)*	5'-TTCTTGTGCAGTGCCAGCC-3'	64	84
	(anti-senso)	5'-GTAACCAGGCGTCCGATACG-3'		

3.6 RT-PCR – Ensaios de Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase

Para a realização da reação de RT-PCR, preparou-se uma solução composta por 1 µL de cDNA, 17 µL de água MiliQ, 5 µL de Coral Loading Buffer 10 X, 1 µL de *oligonucleotídeo* senso (10 µM), 1 µL de anti-senso (10 µM), 25 µL Top Taq Master Mix Kit (Qiagen Quality, Alameda, CA- EUA). As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient- Eppendorf), com um ciclo de 5 minutos a 94°C

para desnaturação das duplas-fitas, por 40 ciclos de 1 minutos a 94°C para desnaturação das dupla-fitas, 30 segundos a 60°C para associação dos primers, 15 segundos a 72°C para extensão das fitas de DNA e um ciclo de extensão final das fitas de DNA por 5 min a 72°C. Os produtos amplificados (10 µL) foram analisados 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 90 Volts por 25 a 30 minutos, os resultados foram visualizados em transiluminador ultra-violeta (UV) e fotografados digitalmente.

3.7 RT-PCR em tempo real

A partir dos produtos obtidos na reação de RT-PCR realizamos uma purificação com o kit AccuPrep® PCR Purification (Bioneer, Daejeon, Korea), conforme instruções do fabricante. Estes fragmentos puros foram quantificados no espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop®). Com esta quantificação e conhecendo o tamanho e peso molecular de cada fragmento amplificado foi possível calcular o número de moléculas para todas as amostras usando a seguinte formula (Dhanasekaran et al., 2010):

$$\text{Nº de moléculas / µL} = \frac{6{,}022 \times 10^{23}\ \text{(mol)} \times \text{concentração de DNA (g / µL)}}{\text{Nº de pares de base} \times 660\ \text{daltons}}$$

$6{,}022 \times 10^{23}$ (mol) = Numero do Avogrado

660 daltons (DA) = média do peso de um par de base

Realizou-se então uma curva de diluições em série de 10 vezes (10^0 a 10^7 moléculas de fragmentos de DNA) para a quantificação absoluta de cada enzima.

As reações RT-PCR em tempo real foram realizadas com 1 ou 2 µL de cDNA, adicionando 400 nM de cada par de *oligonucleotídeo* e SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, EUA) para volume final de 25 µL. Foram usados os oligonucleotídeos para identificar as enzimas NTPDase 1, NTPDase 3, NPP 1 e ecto-5' nucleotidase, apresentados na tabela 2. A reação foi realizada em 1 ciclo de 10 minutos a 94ºC, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C seguido de 1 minuto a 60°C.

Realizamos a curva de *Melting*, curva da temperatura de desnaturação do produto, com 81 ciclos de 10 segundos, iniciando aos 55ºC e aumentando 0,5ºC a cada ciclo, terminando aos 94ºC, usando iQ iCycle BioRad.

A curva padrão para a quantificação absoluta das ecto-nucleotidases identificadas foi construída plotando-se em escala logarítmica o threshold cycle (Ct) contra o número de moléculas. A partir desta foi delineada uma reta que gerou uma equação desta reta, com R^2 e slope, que possibilitou a identificação do número de copias presentes em cada amostra analisada. A relação do Ct e número de cópias de cada fragmento foi calculado utilizando o software (BioRad). O número de cópias de cada enzima analisada foi normalizado pelo número de cópias do fragmento de *Gapdh.*

3.8 Atividade enzimática

As glândulas foram homogeneizadas em Médium I (pH 7,5) contendo HEPES 5 mM, sacarose 320 mM e EDTA 10 mM. O conteúdo de proteínas foi ajustado para 0,7 mg/ml, pelo método de *Coomassie Blue*, de acordo com Bradford (1976). A atividade da NTPDase foi determinada conforme o descrito por Schetinger e colaboradores (2000), o qual apresenta o meio de incubação da enzima composto por: 1,5 mM de $CaCl_2$, 0,1 mM de EDTA, 5 mM de KCl, 10 mM de glicose, 225 mM de sacarose e 45 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5), com um volume final de 200 µL. A atividade da enzima 5'nucleotidase foi determinada de acordo com o método de Heymann e colaboradores (1984), o qual apresenta o meio de incubação da enzima composto por: 10 mM de $MgSO_2$ e 100 mM de Tris-HCl. Vinte microlitros do homogeneizado da glândula foram adicionados ao meio de incubação descrito anteriormente, sendo pré-incubados por 10 minutos seguido de incubação por 20 minutos à 37°C. A reação foi iniciada com a adição dos substratos ATP (1 mM), ADP (1 mM) ou AMP (2 mM) e foi interrompida com ácido tricloroacético (TCA) 15%. Para a inibição da NTPDase citosólica foi utilizado azida de sódio (1 mM). A liberação de fosfato inorgânico (Pi) foi determinado pelo método de Chan e colaboradores (1986), usando Verde Malaquita como reagente colorimétrico e KH_2PO_4 como padrão. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e a atividade das enzimas foi expressa em nmol de Pi liberado/min/mg de proteína.

3.9 Imunohistoquímica – “Free Floating”

As pineais foram removidas e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4 % onde permaneceram por 3 dias com troca de solução a cada 24 horas. Para a crioproteção as pineais foram incubadas em solução de sacarose 30 % em PBS a 4°C por 18 horas e logo após colocadas em meio de congelamento (Tissue freezing médium, Triangle Biomédical xSciences, INC) e congeladas em freezer - 80°C. As pineais foram cortadas em criostato (Leica) em cortes de 25 µm de espessura e coletadas diretamente em solução PBS em diferentes poços de placa acrílica costar. Em seguida, deu-se início ao processamento do material com técnica de imuno-histoquímica em cortes *free floating*. Os cortes foram lavados com PBS, por 3 vezes de 10 minutos, depois foram pré-incubados, submergidos em solução bloqueio 5% de soro donkey (Jackson ImunnoResearch) e 0,3% de Triton X em PBS em temperatura ambiente por uma hora. Após esse tempo, os anticorpos primários foram acrescentados juntos aos cortes e solução de bloqueio. Os anticorpos primários foram incubados separadamente de acordo com interesse e, numa segunda etapa combinados com os respectivos anticorpos secundários fluorescentes, como descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Anticorpos primários e secundários e as respectivas diluições utilizadas.

AC primário	Diluição	Soro	AC secundário	Diluição
anti-NTPDase 1 – rabbit*	1:1000	Donkey	Alexa fluor 488 Donkey anti rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1:200
anti-NTPDase 3 – rabbit*	1:500	Donkey	Alexa fluor 488 Donkey anti rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1:200
anti-ecto-5' nucleotidase – rabbit*	1:2000	Donkey	Alexa fluor 488 Donkey anti rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1:200
anti-ED-1 – mouse (Abcam, Cambridge -UK)	1:100	Donkey	CY3 Donkey anti mouse (Jackson ImmunoResearch)	1:200
anti-GFAP (Sigma-AldricH)	1:2000		*Conjugado ao fluoróforo Cy3	
DAPI (Ab cam)	1:1000			

Legenda: Os anticorpos primários das ectonucleotidases e os soros pré-imunes das mesmas foram gentilmente cedidos pelo colaborador Professor Jean Sévigny da Universidade Lavál de Quebec, Canadá. Tradução: donkey = cabra; mouse = camundongo; rabbit = coelho. * Para os controles negativos das ecto-nucleotidases foram utilizados: soro pré-imune no lugar do anticorpo primário da enzimas, nas mesmas concentrações.

Os cortes incubados com anticorpos primários permaneceram por período de 24 horas sob agitação constante e temperatura de 4°C. Passado esse tempo, os cortes foram lavados novamente com PBS por 3 vezes de 10 minutos, seguidos de incubação em solução 5% de soro *donkey*, 0,3% de Triton X em PBS, e os

respectivos anticorpos secundários fluorescentes, durante 90 minutos em temperatura ambiente. Passado esse tempo os cortes das pineais foram montados em lâminas gelatinizadas. Após a secagem, foram incubados por 5 minutos com a deposição de DAPI (5 µM; California, Estados Unidos) sobre a lâmina, em temperatura ambiente, como o objetivo de realizar a marcação do núcleo. Em seguida as lâminas foram cobertas por glicerol e lamínulas, e protegidas da luz para posterior análise.

A fluorescência foi observada através de microscópio para fluorescência (Olympus BX50- DP73) e as imagens analisadas através do software Cell Sens Standard.

3.10 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (epm) de *n* amostras. Diferenças entre grupos foram analisadas pela análise de variância ANOVA de 1 via, seguido de teste de Newman-Kells. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão gênica das enzimas

4.1.1 RNA total

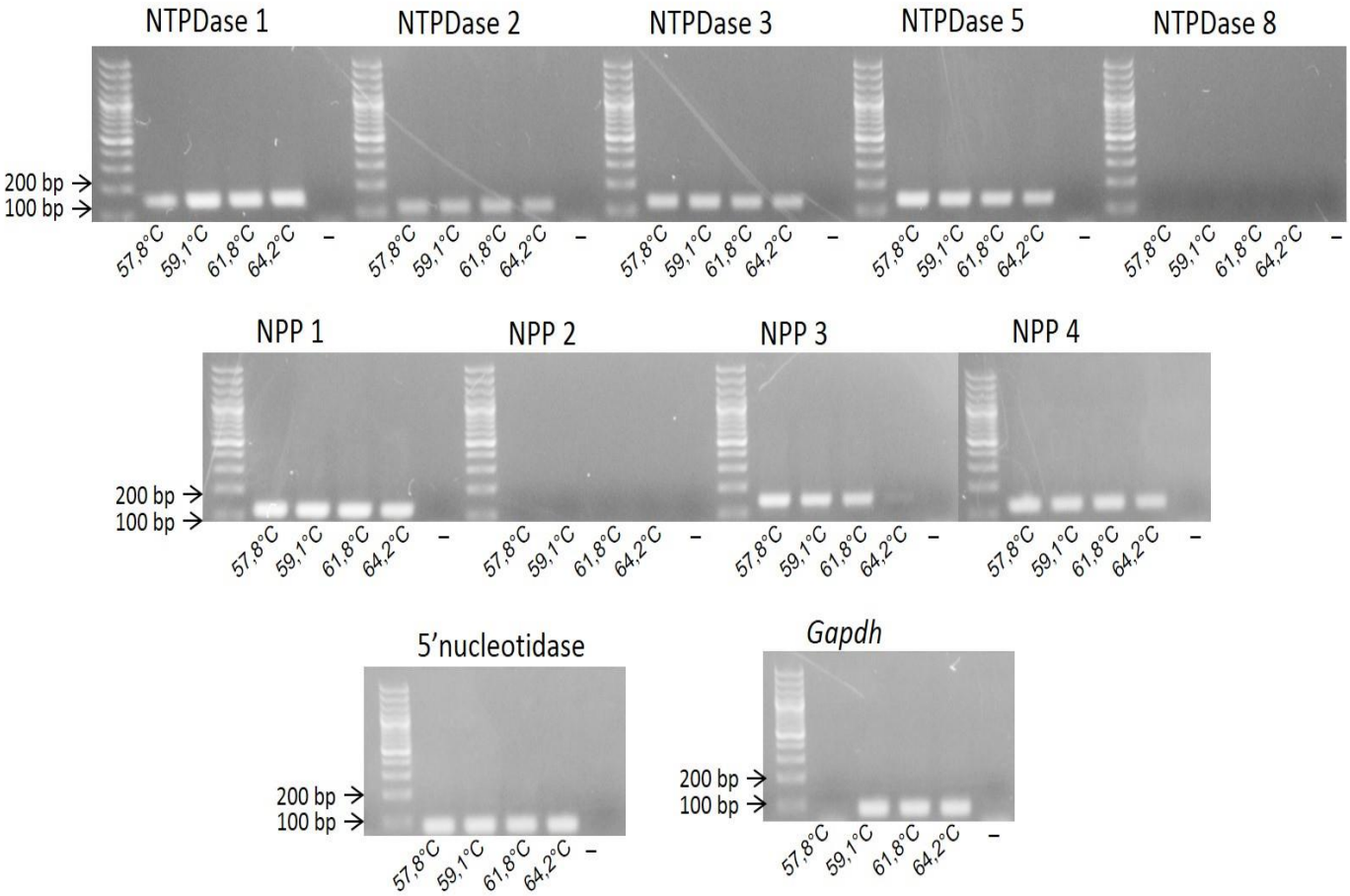
O RNA total isolado de glândulas pineais apresentou quantidades apreciáveis em cada extração analisada (500-1500 ng/glândula). As amostras apresentaram ainda alta qualidade, como pudemos verificar pelos valores da relação das absorbâncias A260/280 variando de 1,8 a 2,0 (dados não mostrados).

4.1.2 Presença de transcritos das ecto-nucleotidases

Os resultados obtidos com os ensaios de RT-PCR confirmaram a presença dos transcritos das ecto-nucleotidases testadas na pineal de ratos. A temperatura ótima para a associação de cada par de oligonucleotídeos foi estabelecida através de um gradiente de temperatura realizado em termociclador a partir de 61 °C com uma variação de 4°C (57,8°C, 59,1°C, 61,8°C e 64,2°C). Sob condições de temperatura a 59,1°C e 61,8°C, observamos a presença de banda única em gel de agarose 2% nas reações que envolveram a análise dos produtos das enzimas NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3, NTPDase 5, NPP 1, NPP 3, NPP 4, ecto-5'nucleotidase e do gene *Gapdh,* utilizado como controle interno (Figura 5).

Portanto, os produtos de DNA obtidos apresentaram-se sob a forma de banda única, com tamanho dos fragmentos correspondentes ao produto esperado conforme o desenho dos oligonucleotídeos. Nenhum fragmento foi detectado no controle negativo (ausência de cDNA) confirmando as boas condições da reação de PCR. Os controles negativos da transcrição reversa, reação realizada sem a transcriptase reversa, demonstraram a ausência de contaminação por DNA genômico (dados não mostrados).

Figura 5 - Expressão gênica das ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos



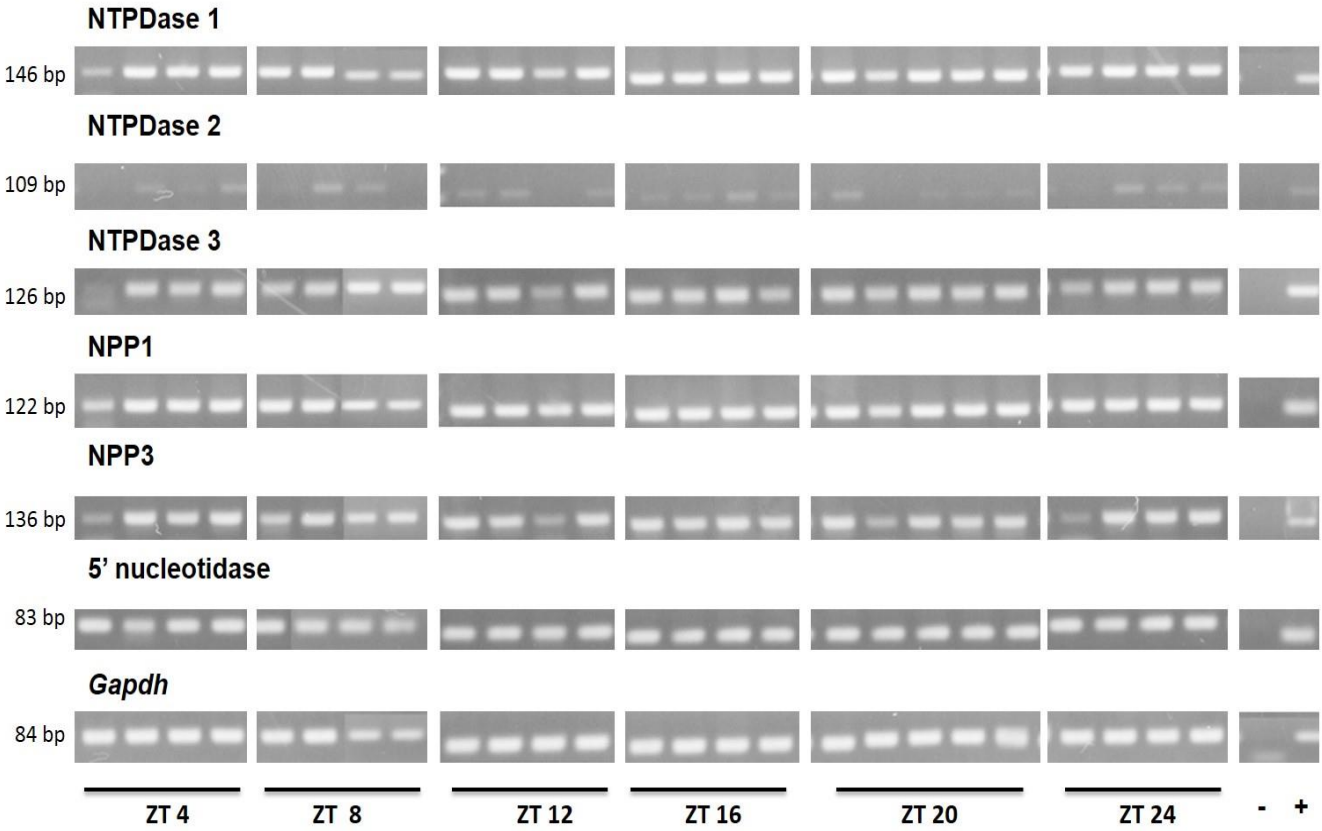
Legenda: Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos de RT-PCR dos transcritos de ecto-nucleotidases a partir de RNA total de um *pool* de glândulas pineais sob diferentes temperaturas de associação dos oligonucleotídeos iniciadores. Seta: banda de pares de base (bp) correspondentes às enzimas NTPDase (1, 2, 3, 5 e 8), NPP (1, 2, 3, e 4), 5'nucleotidase e *Gapdh*. Peso Molecular em escala de 100 bp. O controle negativo foi realizado na ausência de cDNA.

4.1.3 Análise temporal da expressão das ecto-nucleotidases

4.1.3.1 RT-PCR

A seguir foi realizada a avaliação da expressão gênica das enzimas NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3, NPP 1, NPP 3 e 5'nucleotidase na glândula pineal de animais sacrificados em diferentes horários do ciclo claro-escuro ambiental (Figura 6). Os resultados obtidos neste ensaio sugerem uma variação temporal na expressão dessas enzimas.

Figura 6 – Análise temporal da expressão gênica de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos – RT-PCR



Legenda: Eletroforese representativa dos produtos de RT-PCR dos transcritos de ecto-nucleotidases obtidos a partir de RNA total de glândulas pineais de ratos sacrificados a intervalos regulares de 4 horas (ZT 4, 8, 12, 16, 20 e 24). 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. Os tamanhos dos fragmentos em pares de base (bp) encontram-se identificados na figura. ZT = *Zeitgeber Time*; ZT 0 = acender das luzes.

4.1.3.2 RT-PCR em tempo real

Para confirmar a existência de uma variação temporal na expressão gênica de ecto-nucleotidases na pineal, foi realizada uma análise quantitativa da expressão gênica destas enzimas através do método de RT-PCR em tempo real.

A quantificação absoluta da expressão gênica foi realizada a partir de uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de fragmentos de DNA amplificado de cada par de oligonucleotídeo iniciador. As curvas foram feitas a partir de 8 diluições em série (10^0 a 10^7) mostrando-se linear em 7 dos 8 pontos (10 à 10^7 moléculas) (dados não mostrados).

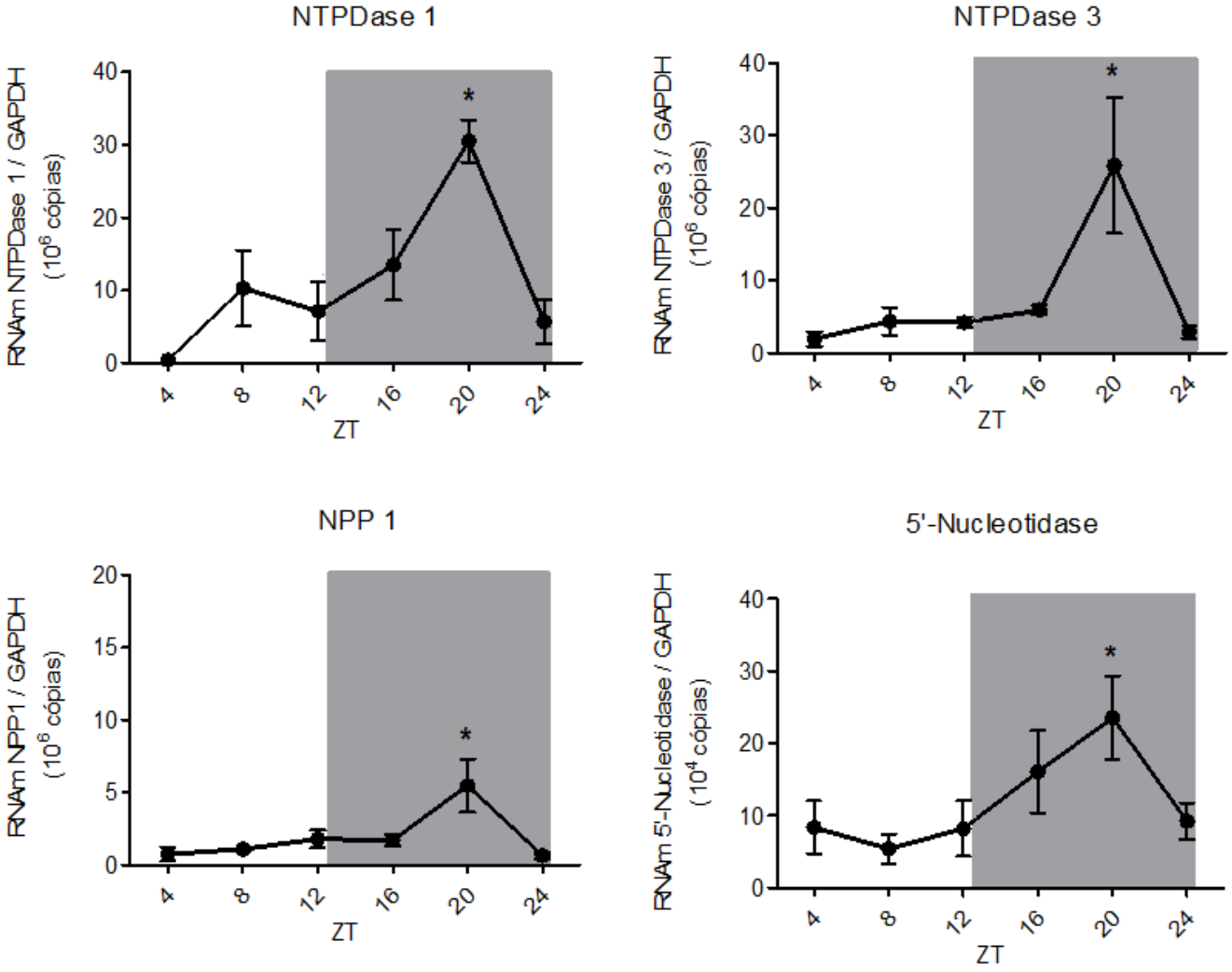
Para a curva da temperatura de desnaturação do produto, curva de *Melting*, foram realizados 81 ciclos de 10 segundos, iniciando aos 55ºC e aumentando 0,5ºC a cada ciclo terminando aos 94ºC usando iQ iCycle BioRad. As curvas apresentaram um único pico de amplificação, caracterizando uma amplificação específica dos oligonucleotídeos de cada gene (dados não mostrados).

As amplificações obtidas foram validadas através da análise dos parâmetros eficiência da amplificação, coeficiente de correlação (R^2) e inclinação da reta (slope) que se mostram dentro de valores confiáveis.

A curva padrão para a quantificação absoluta das ecto-nucleotidases identifcadas foi construída plotando-se em escala logarítmica o *threshold cycle* (Ct) contra o número de moléculas. O valor de Ct foi definido como o ciclo no qual um aumento estatísticamente significativo na magnitude do sinal gerado pela reação de PCR foi detectado. Este valor de Ct foi calculado sob o software (BioRad).

As enzimas NTPDase 1, NTPDase 3, NPP 1 e 5’nucleotidase mostraram um aumento significativo de expressão gênica em pineais de animais sacrificados oito horas após o apagar das luzes (ZT 20) quando comparada à expressão gênica em pineais de animais sacrificados na fase de claro (Figura 7). Nenhuma amplificação foi detectada no controle negativo (ausência de cDNA ou omissão de transcriptase reversa; dados não mostrados).

Figura 7 – Análise temporal da expressão gênica de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos – RT-PCR em tempo rea



Legenda: Quantificação absoluta dos produtos dos transcritos de ecto-nucleotidases obtidos a partir de RNA total de glândulas pineais de ratos sacrificados a intervalos regulares de 4 horas (ZT 4, 8, 12, 16, 20 e 24). Os dados estão apresentados como média ± epm do número de moléculas amplificadas normalizadas por *Gapdh*. n = 4 glândulas para cada ZT identificado. * $p<0,05$ comparado a média do produto amplificado na fase de claro.

4.2 Atividade enzimática de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos

A atividade das NTPDases e da 5'nucleotidase foi analisada através da hidrólise dos substratos ATP (1 mM), ADP (1 mM) e AMP (2 mM) em glândulas pineais de animais sacrificados em diferentes horários do ciclo claro-escuro ambiental. Este método permitiu a quantificação de fosfato inorgânico liberado pela reação de hidrólise desses nucleotídeos. Uma primeira quantificação foi realizada sem as amostras contendo todo o sistema, o fosfato e o fator colorimétrico, sendo utilizada como fator de correção em que foi normalizado o valor da atividade enzimática das amostras obtido posteriormente (Tabela 5).

Tabela 5 - Fator de correção do fosfato inorgânico

concentração				média	Pi
10 mM	0,148	0,155	0,165	0,156	64,10256
20 mM	0,198	0,192	0,195	0,195	102,5641

Para a determinação de tempo de reação das amostras com os nucleotídeos foi realizada uma padronização testando-se os tempos de 20 e 60 min. Após 60 min de incubação houve uma queda na hidrólise dos três nucleotídeos sugerindo uma diminuição da atividade enzimática na glândula (Tabela 6). O tempo de 20 min foi então escolhido para a realização dos próximos experimentos e a atividade enzimática expressa na unidade nmol Pi/ min/ mg de proteína.

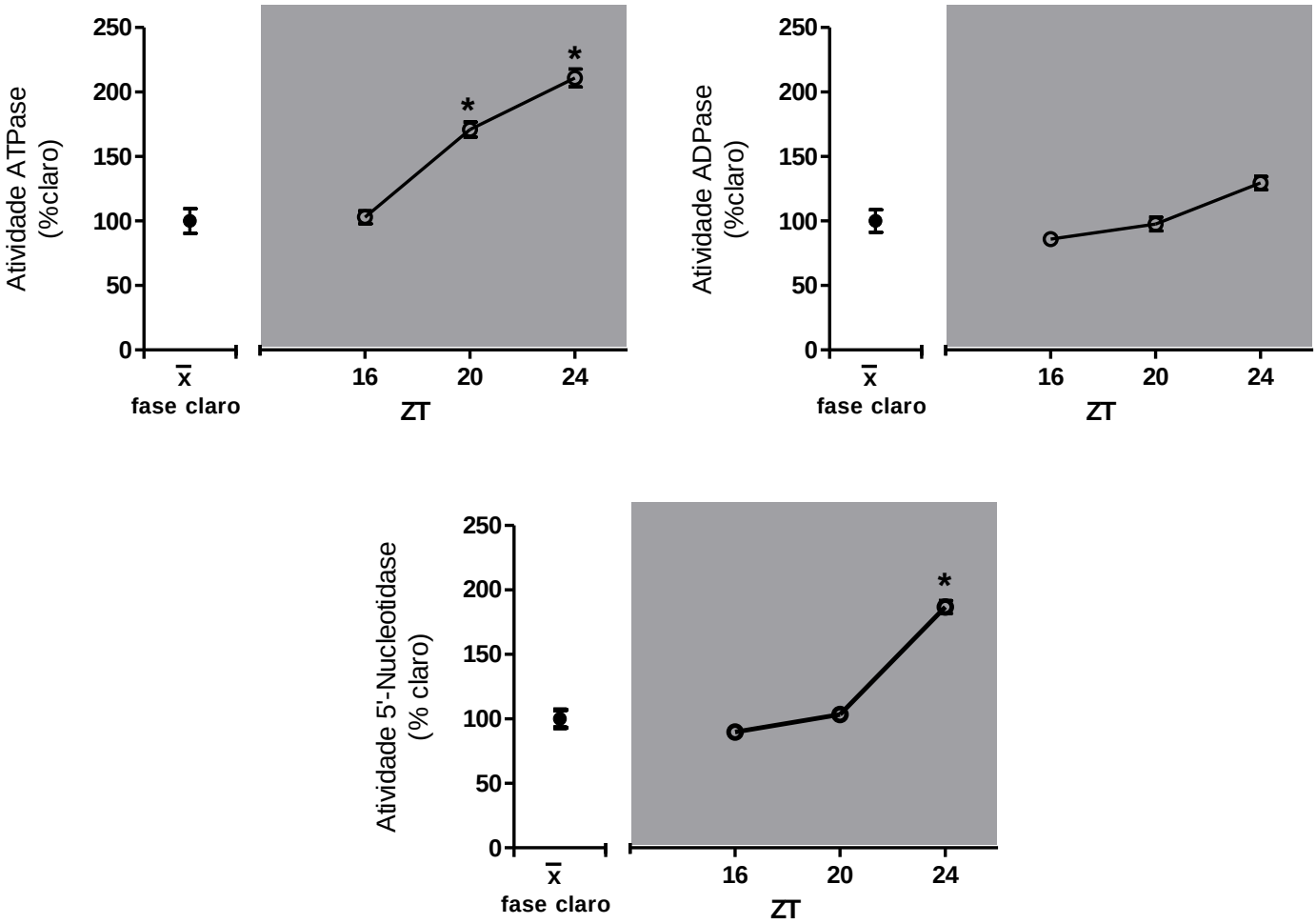
Tabela 6 - Atividade enzimática nos diferentes tempos de reação. Dados mostrados em duplicata.

	ATP	ADP	AMP
20 min	39,85	28,19	9,27
	41,22	27,57	9,65
60 min	17,29	9,71	0,25
	20,01	10,4	3,38

A hidrólise de ATP foi significativamente maior em glândulas pineais de animais sacrificados 8 e 12 horas após o apagar das luzes (ZT 20 e ZT 24, respectivamente)

em relação à hidrólise detectada em glândulas pineais de animais sacrificados na fase de claro. A hidrólise de AMP também foi significativamente aumentada em pineais de animais sacrificados 12 horas após o apagar das luzes (ZT 24) enquanto a hidrólise de ADP manteve-se inalterada em pineais de animais sacrificados nas diferentes fases do ciclo claro-escuro ambiental (Figura 8). Fica evidente, portanto, o significativo aumento de atividade das NTPDases e da 5'nucleotidase na glândula pineal na fase de escuro.

Figura 8 – Atividade enzimática das ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos



Legenda: Hidrólise dos substratos ATP (1 mM), ADP (1 mM) e AMP (2 mM) em pineais de animais sacrificados em diferentes horários do ciclo claro-escuro ambiental. Os resultados foram expressos como nmol/Pi/min/mg de proteína e estão apresentados em % de variação em relação à fase de claro. n = 3 glândulas para cada ponto. * $p<0,05$ comparado a média da atividade enzimática determinada na fase de claro. Média da fase do claro na atividade ATPase 27,64 ± 2,65; média da fase do claro na atividade ADPase 26,32 ± 2,35; média da fase do claro na atividade da 5'nucleotidase 48,54 ± 3,43.

4.3 Localização celular das ecto-nucleotidases por imunohistoquímica

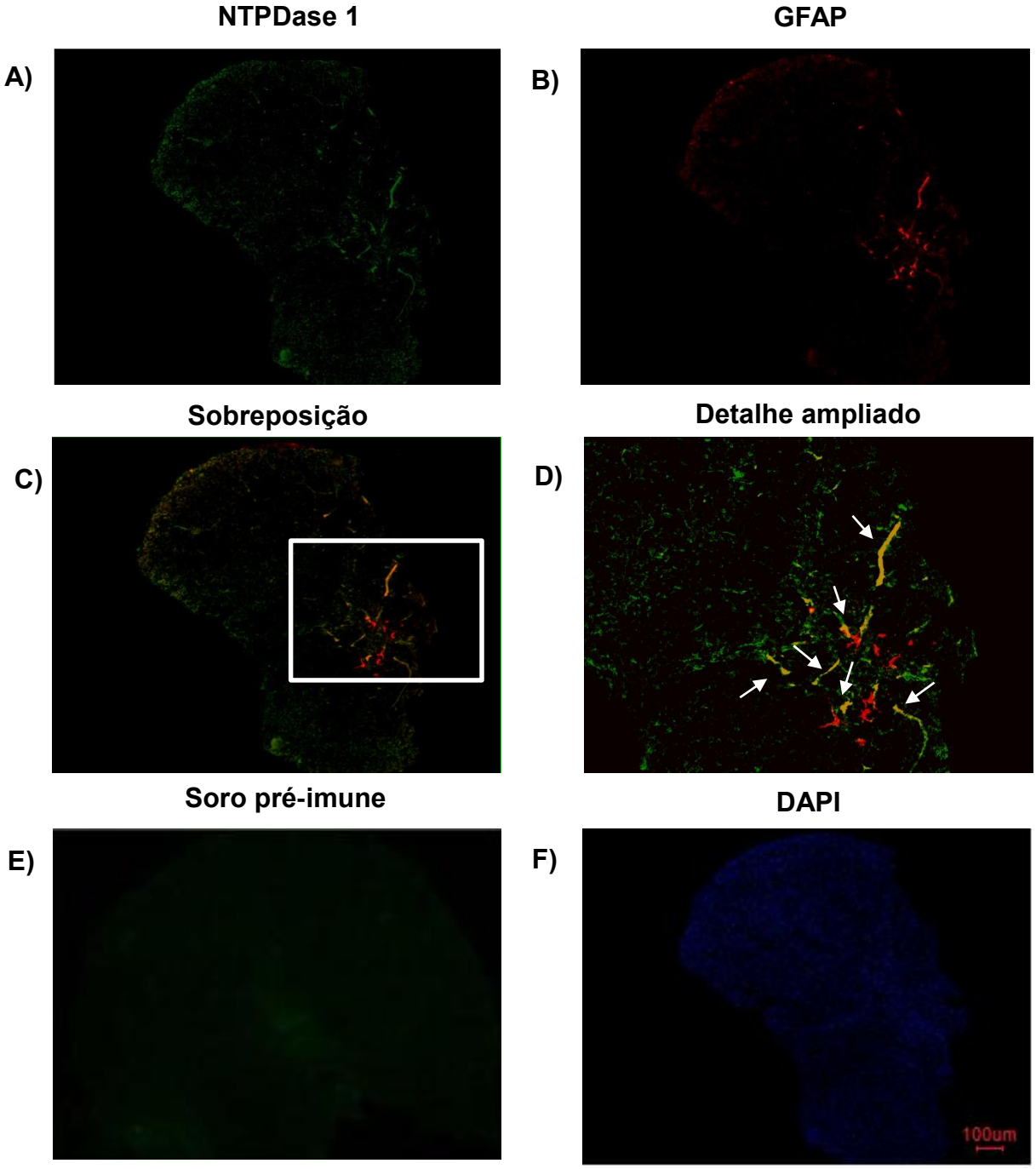
Tendo em vista o aumento de atividade enzimática observado no período de escuro, glândulas pineais de animais sacrificados na fase de escuro foram submetidas ao protocolo de imuno-histoquímica em secções *free-floating*. Verificamos uma imunoreatividade positiva para as enzimas NTPDase 1 (Figura 9 e 10), NTPDase 3 (Figura 11 e 12) e ecto-5'nucleotidase em todo o parênquima da glândula (Figuras 13 e 14).

As enzimas foram marcadas positivamente na cor verde com seus respectivos anticorpos. Juntamente com estas foram utilizados os anticorpos ED-1 e GFAP para marcação dos tipos celulares microglia e astrócito, respectivamente, marcados na cor vermelha. Para marcação de núcleo foi utilizado marcação com DAPI na cor azul.

A especificidade da imunomarcação dos anticorpos primários às enzimas NTPDase 1, NTPDase 3 e 5'nucleotidase na pineal de ratos foi confirmada pela ausência de marcação na reação realizada na presença do soro pré-imune (Figura 9 E, 10 E, 11 E, 12 E, 13 E e 14 E).

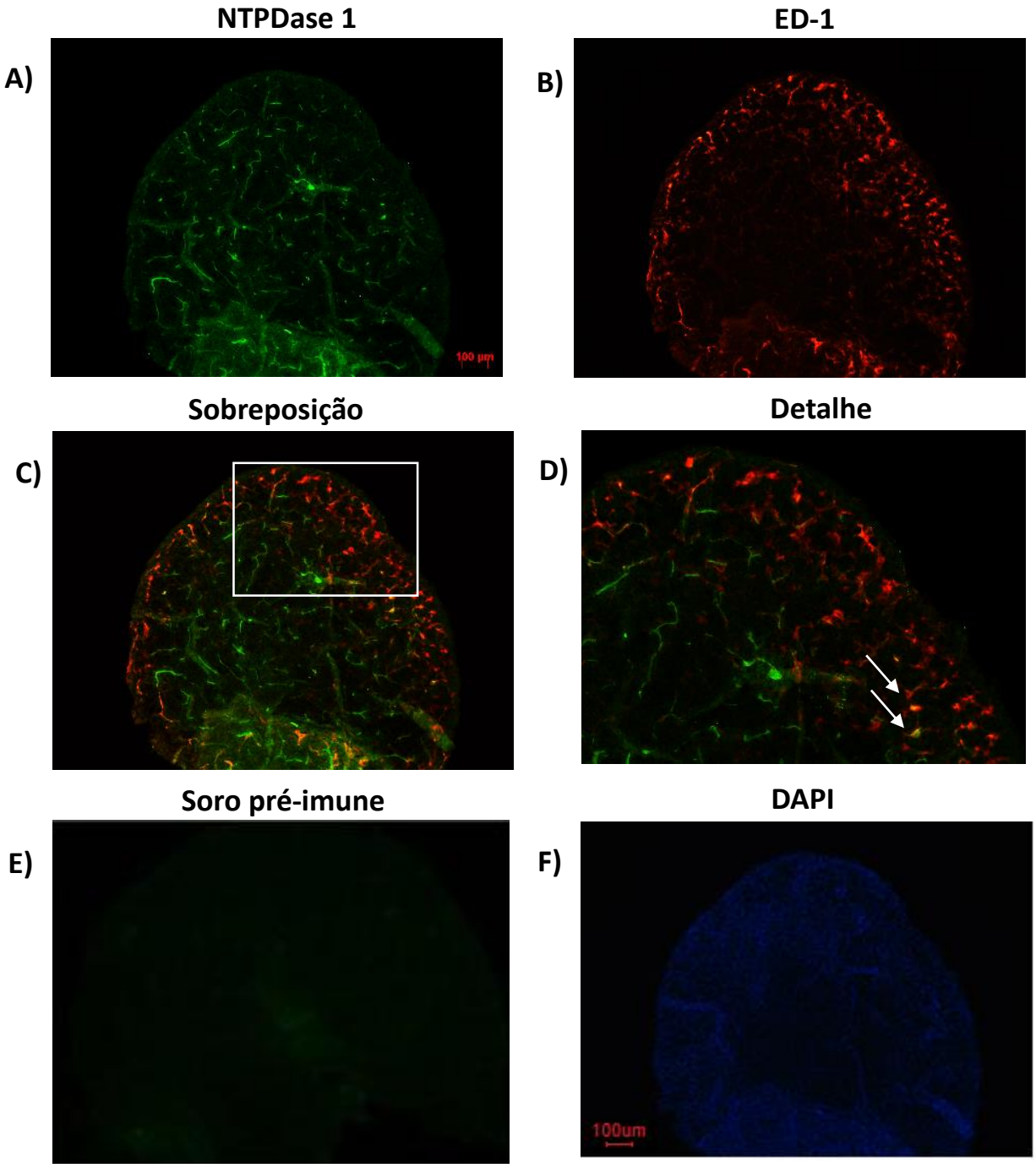
A dupla marcação mostrou a existência de uma intensa co-localização de NTPDase 1 com astrócitos (Figura 9 C e 9 D). A análise da imagem em objetiva maior (aumento 5 x) revela que grande parte das células do parênquima da pineal tem imunorreatividade positiva para NTPDase 1 (Figuras 9 A e 9 A). Praticamente todas as células imunorreativas a GFAP também marcam para NTPDase 1 (Figura 9 C), revelando a expressão constitutiva da enzima em astrócitos. Em relação a co-localização com micróglia, apenas parte das células marcadas com ED-1 apresentam imunorreatividade positiva para NTPDase 1 (Figura 10 D, indicado pela seta), sugerindo que poucas células da microglia expressam NTPDase 1.

Figura 9 – Distribuição celular de NTPDase 1 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com astrócitos.



Legenda: Reação imunohistoquímica em glândulas pineais obtidas de animais sacrificados na fase de escuro. Marcação verde para a enzima NTPDase 1 (A); marcação vermelha para astrócitos imunorreativos a GFAP (B); sobreposição das imagens e aumento no detalhe selecionado (C e D, respectivamente). As setas indicam o local da co-localização. Controle negativo realizado na presença do soro pré-imune do anticorpo NTPDase 1 (E). Núcleos celulares marcados em azul com o reagente DAPI (F). Escalas 100 µm e 50 µm (D).

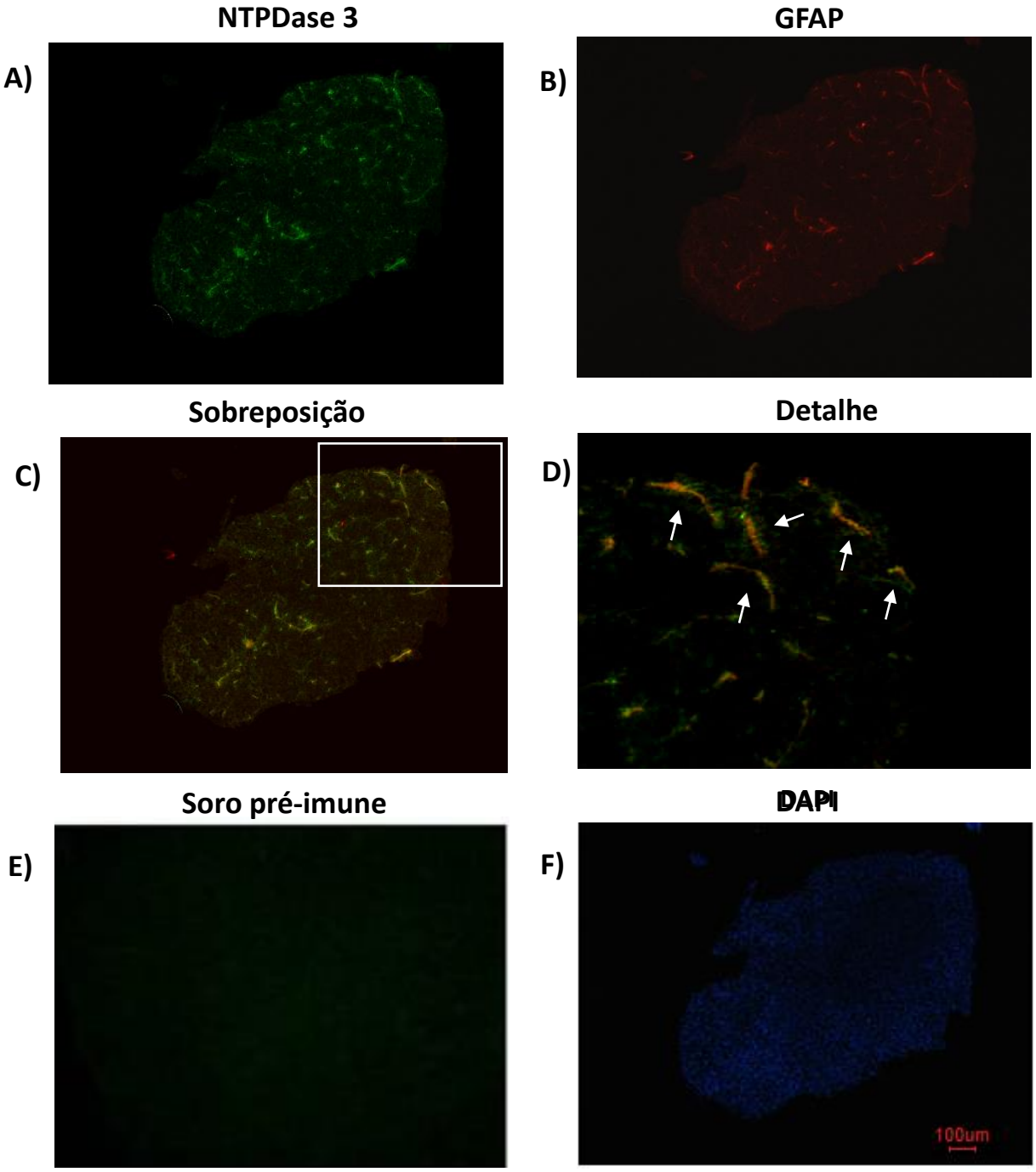
Figura 10 – Distribuição celular de NTPDase 1 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com microglia



Legenda: Reação imunohistoquímica em glândulas pineais obtidas de animais sacrificados na fase de escuro. Marcação verde para a enzima NTPDase 1 (A); marcação vermelha para microglia imunorreativos a ED-1 (B); sobreposição das imagens e aumento no detalhe selecionado (C e D, respectivamente). As setas indicam o local da co-localização. Controle negativo realizado na presença do soro pré-imune do anticorpo NTPDase 1 (E). Núcleos celulares marcados em azul com o reagente DAPI (F). Escalas 100 µm e 50 µm (D).

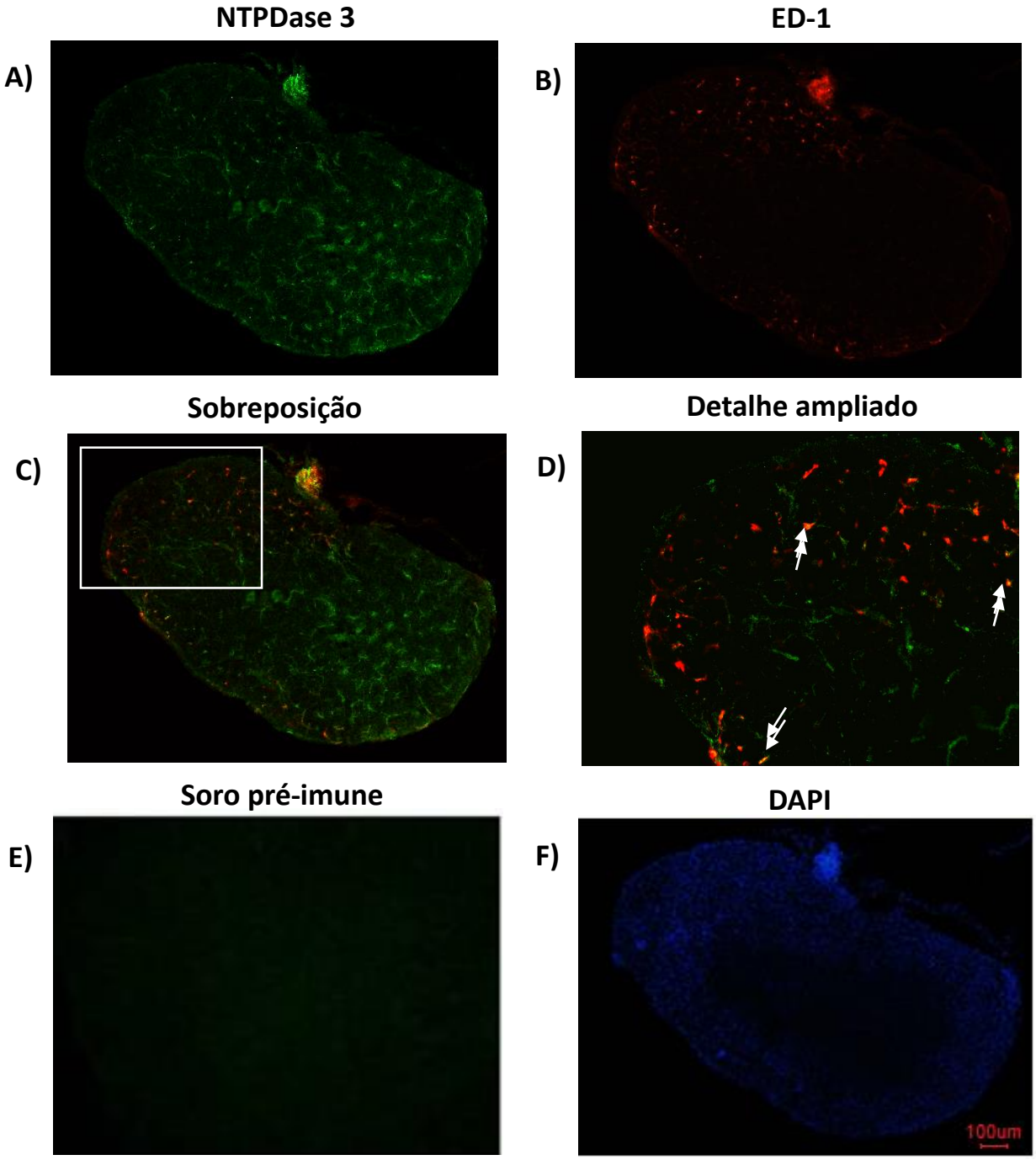
A análise da sobreposição das imagens com dupla marcação para NTPDase 3 e astrócitos mostrou uma intensa co-localização (Figura 11 C) o que não foi observada com a mesma intensidade com micróglia (Figura 12 C). A análise da imagem em objetiva maior (aumento 5 x) revela que grande parte das células do parênquima da pineal também tem imunorreatividade positiva para NTPDase 3 (Figuras 11 A e 12 A). Praticamente todas as células que imunoreagem com GFAP também marcam para NTPDase 3 (Figura 11 C e D), revelando também a expressão constitutiva da enzima em astrócitos. Em relação a co-localização com microglia (Figura 12, apenas parte das células marcadas com ED-1 apresentam imunorreatividade positiva para NTPDase 3 (Figura 12 D, indicado pela seta), sugerindo baixa expressão de NTPDase 3 em microglia.

Figura 11 – Distribuição celular de NTPDase 3 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com astrócitos



Legenda: Reação imunohistoquímica em glândulas pineais obtidas de animais sacrificados na fase de escuro. Marcação verde para a enzima NTPDase 3 (A); marcação vermelha para astrócitos imunorreativos a GFAP (B); sobreposição das imagens e aumento no detalhe selecionado (C e D, respectivamente). As setas indicam a co-localização. Controle negativo realizado na presença do soro pré-imune do anticorpo NTPDase 3 (E). Núcleos celulares marcados em azul com o reagente DAPI (F). Escalas 100 µm e 50 µm (D).

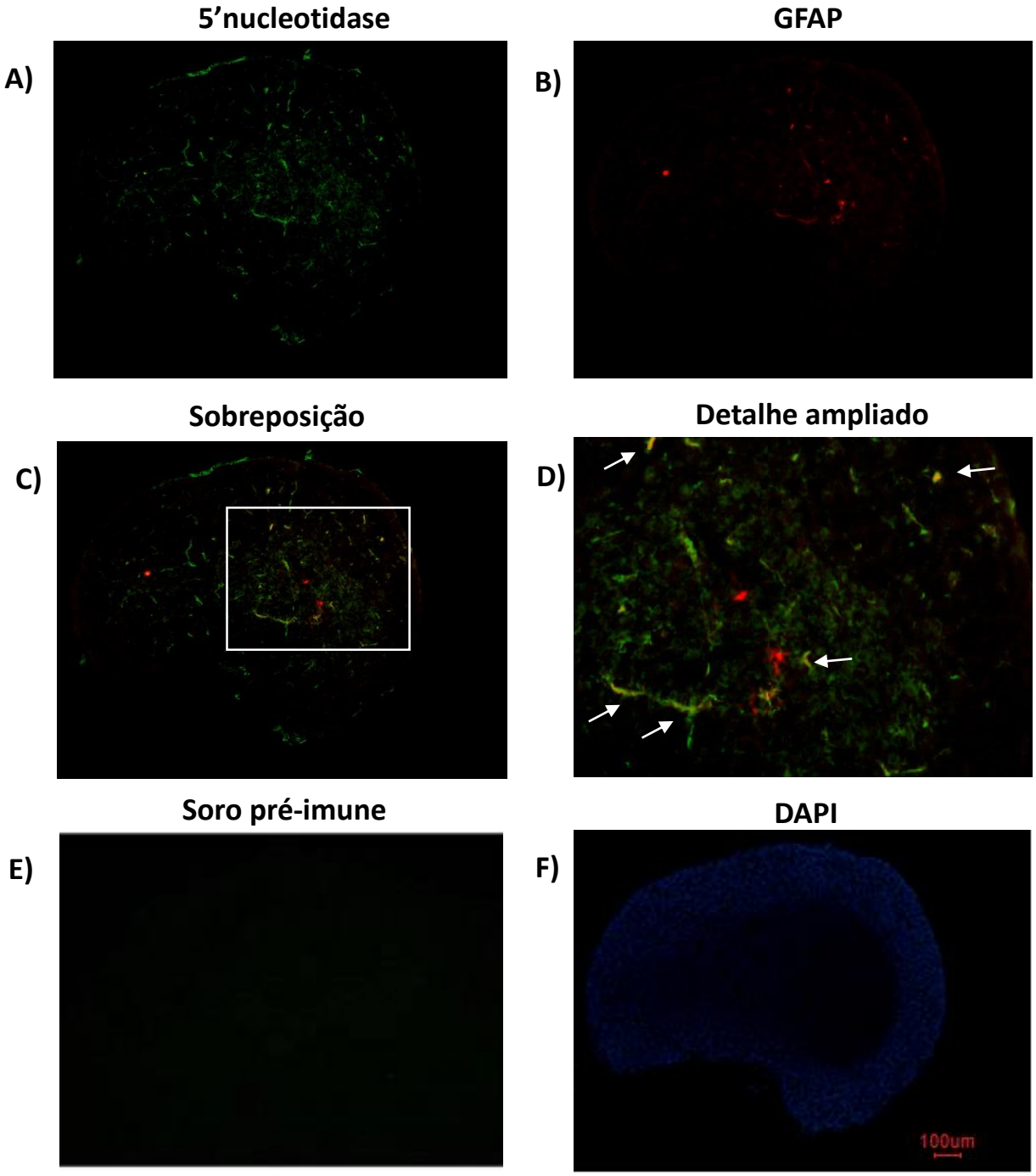
Figura 12 – Distribuição celular de NTPDase 3 na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com microglia



Legenda: Reação imunohistoquímica em glândulas pineais obtidas de animais sacrificados na fase de escuro. Marcação verde para a enzima NTPDase 3 (A); marcação vermelha para microglia imunorreativos a ED-1 (B); sobreposição das imagens e aumento no detalhe selecionado (C e D, respectivamente). As setas indicam a co-localização. Controle negativo realizado na presença do soro pré-imune do anticorpo NTPDase 3 (E). Núcleos celulares marcados em azul com o reagente DAPI (F). Escalas 100 µm e 50 µm (D).

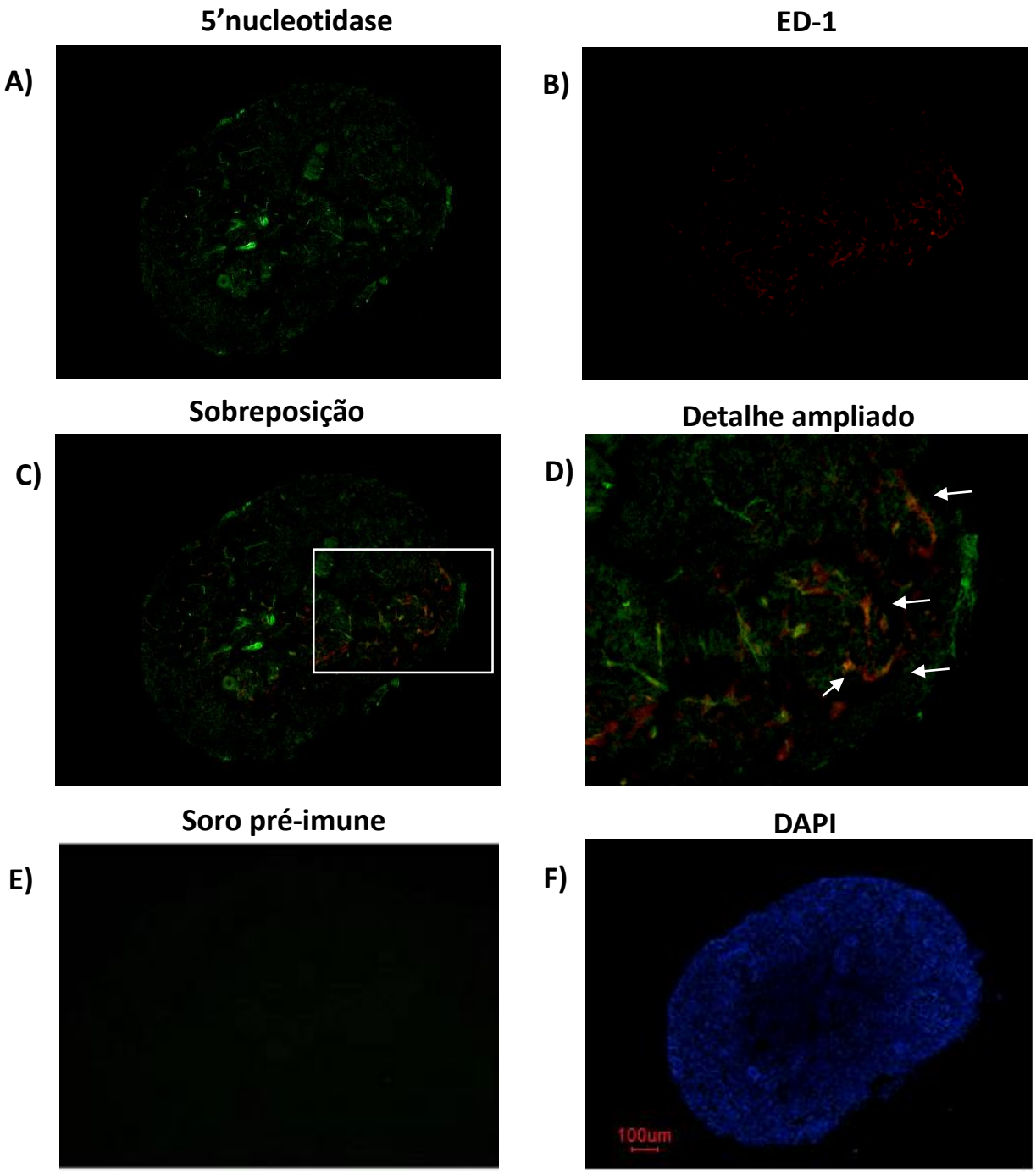
A enzima 5’nucleotidase mostrou na sobreposição das imagens com dupla marcação intensa co-localização com astrócitos (Figura 13 C) e com microglia (Figura 14 C). A análise da imagem em objetiva maior (aumento 5 x) revela que grande parte das células do parênquima da pineal tem imunorreatividade positiva para 5’nucleotidase (Figuras 13 A e 14 A). Praticamente todas as células que imunoreagem com GFAP também marcam para 5’nucleotidase (Figura 13 D, indcadas pela seta), revelando a expressão constitutiva da enzima em astrócitos. A co-localização com microglia mostra que metade das células marcadas com ED-1 apresentam imunorreatividade positiva para 5’nucleotidase (Figura 14 D, indicado pela seta), indicando que a 5’nucleotidase está expressa nos dois tipos celulares.

Figura 13 – Distribuição celular da 5'nucleotidase na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com astrócitos.



Legenda: Reação imunohistoquímica em glândulas pineais obtidas de animais sacrificados na fase de escuro. Marcação verde para a enzima 5'nucleotidase (A); marcação vermelha para astrócitos imunorreativos a GFAP (B); sobreposição das imagens e aumento no detalhe selecionado (C e D, respectivamente). As setas indicam o local da co-localização. Controle negativo realizado na presença do soro pré-imune do anticorpo 5'nucleotidase (E). Núcleos celulares marcados em azul com o reagente DAPI (F). Escalas 100 µm e 50 µm (D).

Figura 14 – Distribuição celular da 5'nucleotidase na glândula pineal de ratos – estudo de co-localização com microglia



Legenda: Reação imunohistoquímica em glândulas pineais obtidas de animais sacrificados na fase de escuro. Marcação verde para a enzima e 5'nucleotidase (A); marcação vermelha para microglia imunorreativos a ED-1 (B); sobreposição das imagens (Merge) e aumento no detalhe selecionado (C e D, respectivamente). As setas indicam o local da co-localização. Controle negativo realizado na presença do soro pré-imune do anticorpo 5'nucleotidase (E). Núcleos celulares marcados em azul com o reagente DAPI (F). Escalas 100 µm e 50 µm (D).

5 DISCUSSÃO

A disponibilidade de ATP, ADP e adenosina bem como a extenção e duração de suas ações nos receptores purinérgicos são eventos regulados por uma cascata enzimática composta por diversas enzimas que diferem em suas propriedades moleculares e funcionais – as ectonucleotidases (Zimmermann et al., 2012). Estas incluem as enzimas NTPDase e NPP que hidrolizam ATP e ADP a AMP e a enzima 5'nucleotidase que catalisa a etapa final de desfosforilação do AMP a adenosina.

Na glândula pineal de ratos, o ATP é co-liberado com a noradrenalina por exocitose vesicular do terminal nervoso simpático no período de escuro (Mortani-Barbosa et al., 2000). A relevância funcional do sistema purinérgico na pineal requer a caracterização das ectonucleotidases nesta glândula visto que receptores purinérgicos P2X7, P2Y1 e P1 (ativados por ATP, ADP e adenosina, respectivamente) são co-expressos na membrana dos pinealócitos e levam a uma modulação diferencial da produção hormonal da glândula – a síntese de melatonina (Gharib et al., 1989; Petrilli, 2012; Souza-Teodoro, 2013).

5.1 Expressão constitutiva dos transcritos de ecto-nucleotidases

A primeira análise realizada neste trabalho teve como objetivo avaliar a presença de transcritos de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos. A técnica de RT-PCR foi realizada utilizando um *pool* de amostras de cDNA obtidas a partir de RNA total de pineais de animais sacrificados em diferentes horários do ciclo claro-escuro a fim de minimizar qualquer influência ambiental na detecção de amplificação dos transcritos.

A confiabilidade da amplificação foi validada através de uma busca pela temperatura ótima a ser utilizada no ensaio RT-PCR em nossas condições experimentais. Altas temperaturas impedem suficiente hibridação da amostra de cDNA com o oligonucleotídeo iniciador e resulta em baixa quantidade do produto alvo do RT-PCR, ao passo que baixas temperaturas podem levar à associação de produtos não específicos causados por um alto número de pareamentos inespecíficos das bases. Sob a temperatura média de 60°C, obtida através do gradiente de temperaturas demonstramos, pela primeira vez, a transcrição constitutiva dos genes das enzimas NTPDase 1, NTPDase 2, NTPDase 3, NTPDase 5, NPP1, NPP 3, NPP 4 e 5'nucleotidase na glândula pineal de ratos.

Com relação à expressão, dados da literatura demonstram que, funcionalmente, as enzimas NTPDases 1, 2 e 3 encontram-se expressas no tecido cerebral de mamíferos mediando o término da sinalização evocada por ATP na fenda sináptica (Zimmermann, 1999; Kukulski et al., 2005). No SNC a enzima NTPDase 1 está localizada na superfície de vasos da camada endotelial apresentando também grande expressão na microglia (Braun et al., 2000). A enzima NTPDase 2 está associada a células progenitoras no cérebro de roedores adultos, sendo expressa em vasos, astrócitos, células de Schwann e outras células da glia no SNC e periférico (Braun et al., 2003; Shukla et al., 2005; Robson et al., 2006; Wink et al., 2006). A enzima NTPDase 3 encontra-se expressa em várias regiões cerebrais e é a mais expressa das ecto-nucleotidases em tumores de células cromafins (Vorhoff et al., 2005). Estudos imuno-histoquímicos revelam a associação desta enzima com estruturas neuronais semelhantes a axônios onde podem atuar funcionalmente na pré-sinápse regulando o conteúdo de ATP e coordenando, desta forma, diversos sistemas homeostáticos, como comportamento alimentar e ciclo sono-vigília (Belcher et al., 2006). Corroborando nossos resultados, que sugerem a ausência de transcritos de NTPDase 8 na pineal, a enzima NTPDase 8 apresenta baixa expressão no cérebro de camundongos sendo mais expressa em tecidos periféricos como fígado, rim e intestino (Bigonnesse et al., 2004). A enzima NPP 1 é expressa em capilares cerebrais (Harahap et al., 1988) e em células C6 de glioma de rato (Grobben et al., 1999) existindo uma correlação positiva entre um aumento de sua expressão e a malignidade de tumores em astrócitos (Aertis et al., 2011) mas não é detectada em neurônios ou glia (Goding et al., 2003), assim como também não foi detectada em glândula pineal neste trabalho. Assim com a NPP1, a transcrição da enzima NPP2 não foi encontrada na glândula pineal. Essa enzima , chamada de autotaxina não tem atividade conhecida na hidrólise de nucleotídeos mas sabe-se que ela é capaz de atuar como como lisofosfolipase D que hidrolisa lisofosfatidilcolina levando a produção de ácido lisofosfatídico e colina (Gijsbers et al., 2003). A enzima 5’nucleotidase é abundantemente expressa no hipocampo, cerebelo e medulla oblonga havendo evidências de que esta enzima está transientemente ativa na fenda sináptica durante o desenvolvimento e regeneração (Langer et al., 2008; Schoen, Kreutzberg, 1997).

5.2 Variação temporal de transcritos de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos

Sabendo ser a pineal um órgão associado ao controle da expressão de variações rítmicas, buscamos avaliar a existência de uma variação temporal na expressão dos transcritos identificados. Através do ensaio convencional de RT-PCR, as análises de amostras de cDNA obtidas a partir de RNA total de pineais de animais mantidos em ciclo de iluminação controlado 12:12 h sacrificados a intervalos regulares de 4 h sugeriram a existência de uma variação temporal na expressão dessas enzimas.

Contudo, este ensaio não é verdadeiramente quantitativo e podendo levar a estimativas incorretas dos níveis totais de mensagens realmente presentes devido a fatores como a depleção de reagentes durante a reação, entre outros. Consequentemente, quando produtos de PCR são visualizados no gel, a intensidade das bandas não são proporcionais à quantidade do alvo inicial tornando a análise da imagem duvidosa (Santagati et al., 1997).

Portanto, para confirmar a existência de uma variação temporal na expressão gênica de ecto-nucleotidases na pineal, foi realizada uma análise quantitativa da expressão gênica destas enzimas através do método de RT-PCR em tempo real. Este método, utilizado para simultaneamente amplificar, detectar e quantificar ácidos nucleicos, possibilitou uma quantificação absoluta da expressão gênica a partir da construção de uma curva padrão com quantidades conhecidas de fragmentos de DNA amplificados a partir de pares de oligonucleotídeos iniciadores (Dhanasekaran et al., 2010).

Os resultados evidenciaram uma variação temporal nos transcritos das enzimas NTPDase 1, NTPdase 3, NPP 1 e 5’nucleotidase, com um aumento do RNAm na fase de escuro (ZT 20).

Variações temporais na expressão de muitos genes têm sido observadas na pineal (Bailey et al., 2009). Através de análise *microarray*, a expressão ritmica de 600 genes foi detectada na glândula pineal de ratos com amplitude variando de 2 a 100 vezes na fase de escuro. A dinâmica dessa expressão ritmica foi melhor descrita através de ensaios de RT-PCR em tempo real em amostras coletadas a

intervalos regulares, como realizado neste estudo, permitindo a demonstração precisa dos picos de expressão.

In vitro, 95% dos genes que exibem variações dia/noite são induzidos pelo tratamento das culturas com noradrenalina, dibutiril AMPc ou forskolin. O mecanimo pelo qual o AMPc controla a transcrição gênica pode envolver a fosforilação do fator de transcrição CREB dependente de PKA ou um mecanismo epigenético no qual estados de acetilação e fosforlação de histonas estejam alterados. Estes eventos podem alterar a organização da cromatina levando à exposição de elementos reguladores que favorecerão o acesso e ligação de fatores de transcrição e promoção da transcrição (Kanyo et al., 2009).

Interessantemente, estudos indicam que o promotor do gene da enzima 5'nucleotidase contem elementos responsivos ao AMPc e a ligação ao fator de transcrição CREB é importante para a expressão da enzima (Narravula et al., 2000). O aumento de transcritos desta enzima observado na fase de escuro no presente estudo poderia, portanto, ser explicado em decorrência da indução exercida pela noradrenalina liberada na pineal na fase de escuro.

5.3 Hidrólise de nucleotídeos na glândula pineal de ratos

Buscando avaliar a funcionalidade desse sistema, investigamos a atividade das ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos. Correlacionando-se aos resultados de expressão gênica, um aumento na hidrólise de ATP e de AMP foi detectado em glândulas pineais de animais sacrificados na fase de escuro.

Tendo em vista as características bioquímicas do método de mensuração da atividade enzimática de ecto-nucleotidases utilizado neste estudo, o aumento observado na hidrólise de ATP aponta para a atividade de enzimas da família NTPDase e não da família NPP, visto que a atividade catalítica da enzima NPP ocorre preferencialmente em pH ácido (Bonan, 2012), diferentemente do pH 7,5 utilizado neste ensaio.

Uma variação no padrão temporal de atividade enzimática de NTPDase também foi observado no soro de ratos com a demonstração de um aumento da hidrólise de ATP e ADP na fase de escuro (Detanico et al., 2010). Neste estudo recente, um papel modulatório para a noradrenalina circulante foi proposto com a

demonstração de que o tratamento exógeno com noradrenalina em concentrações fisiológicas mimetizando uma ativação simpática, estimulou a hidrólise de nucleotídeos no soro (Detanico et al., 2010).

As ecto-nucleotidases apresentam um padrão diferencial de hidrólise extracelular de nucleotídeos na dependência do tipo celular em que se encontram expressas. Em astrócitos, por exemplo, o padrão extracelular de hidrólise de nucleotídeos é diferente do observado em células provenientes do hipocampo, córtex ou cerebelo. A hidrólise de ATP/ADP em hipocampo e córtex é na ordem de 8:1 e em astrócitos do cerebelo na ordem de 5:1. Já a hidrólise de AMP em astrócitos do cerebelo é sete vezes maior comparada às células corticais ou hipocampais (Wink et al., 2003).

5.4 Localização celular de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos

Conhecendo, portanto, esta heterogeneidade funcional e a composição celular da glândula pineal, buscamos também neste trabalho identificar em qual tipo celular as ecto-nucleotidases estariam expressas. Devido ao fato da glândula pineal apresentar diferentes tipos celulares em sua constituição como pinealócitos (que representam o maior componente celular do parênquima), astrócitos e microglias, analisamos a expressão das enzimas ecto-nucleotidases na glândula pineal seguida da caracterização celular através de dupla marcação imunofluorescente.

A análise foi realizada através do método de imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos para as enzimas NTPDase 1, NTPDase 3 e 5’nucleotidase, produzidos, testados e caracterizados pelo Prof. Dr. Jean Sévigny na Universidade Laval de Quebec no Canadá (Fausther et al., 2007; Fausther et al., 2012; Vekaria et al., 2006) bem como marcadores específicos para astrócito e microglia. Detectamos através de dupla marcação imunofluorescente a distribuição proteica destas ecto-nucleotidases na glândula pineal tanto em pinealócitos quanto em células da glia.

Confirmando estudos imuno-histoquímicos já realizados por nosso grupo, os astrócitos estão restritos à região proximal ou pedúnculo por onde penetram artéria, veia e fibras nervosas e a microglia difusa pelo parênquima (Carvalho-Souza et al., 2011). A imunoreatividade positiva para as enzimas NTPDase 1, NTPDase 3 e 5’nucleotidase apresentou-se co-localizada com a imunoreatividade dos marcadores

GFAP para astrócitos e ED-1 para microglia ativada. Todas as células marcadas com anticorpos contra GFAP apresentaram dupla marcação para as ectonucleotidases sugerindo uma expressão constitutiva destas enzimas nos astrócitos. Por outro lado, apenas algumas das células imunorreativas para ED-1 apresentaram-se co-localizadas com NTPDase 1, NTPDase 3 e 5'nucleotidase. Esta marcação parcial da microglia pode ser dependente da existência de diferentes tipos de células, como sugerido em estudo com anticorpos mais seletivos OX-42 e OX-6 (Jiang-Shieh et al., 2003). Desta forma, podemos considerar que nem todas as células que compõe a microglia expressam ecto-nucleotidases. A imunoreatividade para NTPDase 1 no parênquima da pineal foi observada tanto em células que imunorreagiam ao ED-1 e ao GFAP, quanto as que não apresentavam dupla-marcação, sugerindo que os pinealócitos também apresentavam imunorreatividade para NTPDase 1, NTPDase 3 e 5'nucleotidase.

A presença constitutiva de NTPDase 1, NTPDase 3 e 5'nucleotidase nos pinealócitos indica que estas células apresentam atividade hidrolítica direta (podem responder diretamente ao ATP). Isso sugere, que independente da ativação de células gliais, as células produtoras de melatonina podem hidrolisar o ATP presente no meio extracelular.

A presença das enzimas NTPDase 1, NTPDase 3 e 5'nucleotidase em pinealócitos, astrócitos e microglia, sugere também o envolvimento da sinalização purinérgica na comunicação celular existente na pineal entre os diferentes tipos celulares como proposto para a síntese de indolaminas por esta glândula (da Silveira Cruz-Machado et al., 2012).

Em resumo, o principal objetivo deste trabalho foi elucidar a presença e o padrão temporal e espacial (celular) de expressão de ectonucleotiodases na glândula pineal de ratos. Nossos resultados evidenciaram a presença constitutiva destas enzimas na glândula pineal de ratos demonstrando uma variação temporal na presença de transcritos e na atividade de hidrólise de ATP e AMP, aumentada no período de escuro. O estudo imuno-histoquímico na presença de anticorpos específicos sugere imunomarcação positiva em pinealócitos e comprova sua presença em astrocitos e micróglia.

Desta forma, este trabalho permitiu a observação de que o sistema de ecto-nucleotidases está presente na glândula pineal e sugere que a hidrólise de ATP seja

um componente importante para a ativação de diferentes receptores purinérgicos que modulam a síntese de melatonina.

Este trabalho permitiu a observação de que o sistema de ecto-nucleotidases está presente na glândula pineal e sugere que a hidrólise de ATP seja um componente importante para a ativação de diferentes receptores purinérgicos que modulam a síntese de melatonina. A variação diurna na expressão e atividade de ectonucleotidases na pineal aponta para o favorecimento da hidrólise de ATP e formação de adenosina no período de escuro, corroborando dados da literatura e de nosso grupo sobre os efeitos modulatórios da ativação de receptores purinérgicos P1 e P2 sobre a síntese de melatonina na glândula pineal.

Portanto, um complexo sistema purinérgico – enzimas, purinas e receptores – participam nos mecanismos de regulação da função neuroendócrina da pineal.

6 CONCLUSÃO

1. A glândula pineal de ratos apresenta a expressão constitutiva dos transcritos das ecto-nucleotidases - NTDase (1, 2, 3, 5), NPP (1, 3, 4) e 5'nucleotidase;
2. Estes transcritos apresentam uma variação ao longo das 24 horas com um pico de expressão na fase de escuro;
3. O aumento de transcrição na fase de escuro pode ser correlacionada à atividade enzimática que também apresentou uma variação ao longo de 24 hs com um aumento de atividade da hidrólise de ATP e AMP na fase de escuro;
4. Estudos de immunohistoquímica permitiram demonstrar que as enzimas testadas NTPDase1, NTPDase3 e 5'nucleotidase encontram-se distribuídas por todo o parênquima da pineal e co-localizadas com astrócitos e microglia.
5. Estes resultados confirmam a presença de ecto-nucleotidases na glândula pineal de ratos e apontam para a participação do sistema purinérgico no mecanismo modulatório da produção de melatonina pela glândula, através do aumento da hidrólise de ATP e AMP durante a fase de escuro com consequente produção de adenosina.

REFERÊNCIAS *

Aerts I, et al. The expression of ecto- nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 (E-NPP1) is correlated with astrocytic tumor grade. Clin. Neurol. Neurosurg. 2011; 113(3):224-9.

Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science. 1960; 131(3409):1312.

Bailey MJ, et al. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: central role of adrenergic/cAMP signaling. J Biol Chem. 2009; 284(12):7606-22.

Barsotti C, Ipata PL. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(11):2214-25.

Battastini AMO, Zanin RF, Braganhol E. Recentes avanços no estudo das enzimas que hidrolisam o ATP extracelular. Cienc. Cult. [online]. 2011; 63(1):26-8. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252011000100011&lng=en&nrm=iso>. Acessado em janeiro de 2013.

Belcher SM, et al. Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. Neuroscience. 2006; 137(4):1331-46.

Bigonnesse F, et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. Biochemistry. 2004; 43(18):5511-9.

Bonan CD. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. CNS & Neurological Disorders. Drug Targets. 2012; (11):739-50.

Bours MJ, et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol. Ther. 2006; 112(2):358-404.

Bowser DN, Khakh BS. Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. J. Gen. Physiol. 2007; 129(6):485-91.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 7(72):248-54.

Braun N, et al. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. Eur. J. Neurosci. 2000; 12(12):4357-66.

---

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2013 Jul 18].

Braun N, et al. Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. Eur. J. Neurosci. 2003; 17(7):1355-64.

Burnstock G. Purinergic signalling-an overview. Novartis. Found. Symp. 2006; (276): 26-48.

Cappellari AR, et al. Characterization of Ectonucleotidases in Human Medulloblastoma Cell Lines: ecto-59NT/CD73 in Metastasis as Potential Prognostic Factor. PLoS. ONE. 2012; 7(10):e47468.

Carvalho-Sousa CE, et al. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. Front Endocrinol (Lausanne). 2011; (2):10.

Cecon, E. Fator de transcrição NFKB em glândulas pineais de ratos. [Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Fisiologia)] São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2010.

Chan K, et al. A direct colorimetric assay for the Ca 2+ /ATPase activity. Anal Biochem. 1986; 1721:9-15.

Colgan SP, et al. Physiological roles of ecto-5’-nucleotidase. Purinergic. Signal. 2006; (2):351-60.

Detanico BC, et al. 24-hour temporal pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum. Chronobiol Int. 2010; 27(9-10):1751-61.

Dhanasekaran S, Doherty TM, Kenneth J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. J Immunol Methods. 2010; 354(12):34-9.

Fausther M, et al. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007; 292(3):785-95.

Fausther M, et al. Coexpression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with specific NTPDases differentially regulates adenosine formation in the rat liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(4):447-59.

Ferreira ZS, Cipolla-Neto J, Markus RP. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. Br. J. Pharmacol. 1994; (112):107-10.

Ferreira ZS, Markus RP. Characterization of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. Eur. J. Pharmacol. 2001; (415):151-6.

Ferreira ZS, et al. P2Y1 receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. Pharmacology. 2003; (69):33-7.

Ganguly S, et al. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(14):8083-8.

Gharib A, et al. Adenosine analogs elevate N-acetylserotonin and melatonin in rat pineal gland. Neurosci. Lett. 1989; 106(3):345-9.

Gharib A, et al. Evidence for adenosine A2b receptors in the rat pineal gland. Eur J Pharmacol. 1992; 225 (4):359-60.

Gijsbers R, et al.The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. FEBS Lett. 2003; 538(1-3):60-4.

Goding JW, Grobben B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochim. Biophys. Acta. 2003; 1638(1):1-19.

Grobben B, et al. An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma. J. Neurochem. 1999; 72(2):826-34.

Harahap AR, Goding JW. Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. J. Immunol. 1988; (141): 2317-20.

Hardeland R, et al. Melatonin a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. Prog. Neurobiol. 2011; (93):350–84.

Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW. Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. J. Neurochem. 1984; 43(4):971-8.

Iriti M, Varoni EM, Vitalini S. Melatonin in traditional Mediterranean diets. J. Pineal. Res. 2010; (49):101–5.

James G, Butt AM. Adenosine 5' triphosphate evoked mobilization of intracellular calcium in central nervous system white matter of adult mouse optic nerve. Neurosci. Lett. 1999; 268(1):53-56.

Jiang-Shieh YF, et al. Regional heterogeneity in immunoreactive macrophages/microglia in the rat pineal gland. J Pineal Res. 2003; 35(1):45-53.

Kanyo R, et al. Salt-inducible kinase 1 in the rat pinealocyte: adrenergic regulation and role in arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcription. Endocrinology. 2009; 150(9):4221-30.

Klein DC, Moore RY. Pineal N-acethyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. Brain. Res. 1979; (174):245-62.

Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; (80):599-603.

Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: “the Timezyme”. J Biol Chem. 2007; 282(7):4233-7.

Kukulski F, et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. Purinergic Signal. 2005; (1):193-204.

Kukulski F, Levesque SA, Sevigny J. Impact of ectoenzymes on P2 and P1 receptor signaling. Advances in Pharmacology. 2011; (61):263–99.

Laliberté JF, Beaudoin AR. Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphospho- hydrolase from pig pancreas. Biochim. Biophys. Acta. 1983; (742): 9–15.

Langer D, et al. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. Cell Tissue Res. 2008; (334):199-217.

Mortani-Barbosa EJ, Ferreira ZS, Markus RP. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. Eur. J. Pharmacol. 2000; (401):59-62.
Møller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. Cell Tissue Res. 2002; (309):139-50.

Narravula S, et al. Regulation of endothelial CD73 by adenosine: paracrine pathway for enhanced endo- thelial barrier function. J Immunol. 2000; (165):5262–8.

Nikodijevic O, Klein DC. Adenosine stimulates adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat pinealocytes: evidence for a role for adenosine in pineal neurotransmission. Endocrinology. 1989; 125(4):2150-7.

Pankratov Y, et al. Quantal release of ATP in mouse cortex. J. Gen. Physiol. 2007; 129(3):257-65.

Petrilli CL. Regulação da atividade da glândula pineal por estimulação purinérgica. [Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Fisiologia)] São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2012.

Provêncio I, et al. A novel human opsin in the inner retina. J. Neurosc. 2000; (20):600-5.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol.Rev. 1998; (50):413-92.
Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia. 1993; (49):654-64.

Reiter RJ, Tan, DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. Prog. Brain Res. 2010; (181):127–51.

Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic. Signal. 2006; (2):409–30.

Santagati S, et al. Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods. Brain Res Brain Res Protoc. 1997; 1(3):217-23.

Schetinger MR, et al. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. Neurochem Res. 2000; 25(7):949-55.

Schmidt AP, Lara DR, Souza DO. Proposal of a guanine- based purinergic system in the mammalian nervous system. Pharmacol. Ther. 2007; (116):401-16.

Schoen SW, Kreutzberg GW. 5'-nucleotidase enzyme cytochemistry as a tool for revealing activated glial cells and malleable synapses in CNS development and regeneration. Brain Res. Brain Res. Protoc. 1997: 133-43.

Sévigny J, et al. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. Blood. 2002; 15;99(8):2801-9.

Shirley DG, Vekaria RM, Sévigny J. Ectonucleotidases in the kidney. Purinergic. Signal. 2009; 5(4):501-11.

Shukla V, et al. Functional expression of the ecto- ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. J. Neurosci. Res. 2005; 80(5):600-10.

da Silveira Cruz-Machado S, et al. Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). PLoS One. 2012; 7(7):e40142.

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. 2003; (55):325-95.

Slominski A, et al. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. Trends. Endocrinol. Metab. 2008; (19):17–24.

Souza-Teodoro L. Caracterização do receptor P2X7 na fisiologia e na fisiopatologia da glândula pineal de ratos. [Dissertação (Mestrado em Ciências, na Área de Fisiologia)] São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2013.

Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. Oncogene. 2010; (29):5346–58.

Stehle JH, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function, and chronobiological diseases. J. Pineal. Res. 2011; (51):17–43.

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. Experientia. 1989; 45(10):922-32.

Tan DX, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. J. Pineal Res. 2003; (34):75–8.

Torres IL, et al. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 2002; 74(1):181-6.

Vekaria RM, et al. Immunolocalization of ectonucleotidases along the rat nephron. Am J Physiol Renal Physiol. 2006; 290(2):550-60.

Vorhoff T, et al. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. Purinergic Signal. 2005; (1):259-70.

Wink MR, et al. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. Cancer Lett. 2003 Aug 20;198(2):211-8.

Wink MR, et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) is the dominant ectonucleotidase expressed by rat astrocytes. Neuroscience. 2006; (138):421-32.

Zhang Z, et al. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. Nat. Cell Biol. 2007; 9(8):945-53.

Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. Trends Pharmacol. Sci. 1999; 20(6):231-6.

Zimmermann H. Ecto-nucleotidases. In: Purinergic and pyrimidinergic signalling. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, 2001; (151):209–25.

Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. Novartis Found Symp.2006; (276):113-28.

Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signal. 2012; (8):437–502.

ANEXO I- Certificado de apresentação do trabalho: FASEB

FASEB
Federation of American Societies for Experimental Biology

301.634.7000
www.faseb.org

9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814

Representing over 100,000 researchers

The American Physiological Society
American Society for Biochemistry and Molecular Biology
American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
American Society for Investigative Pathology
American Society for Nutrition
The American Association of Immunologists
American Association of Anatomists
The Protein Society
Society for Developmental Biology
American Peptide Society
Association of Biomolecular Resource Facilities
The American Society for Bone and Mineral Research
American Society for Clinical Investigation
Society for the Study of Reproduction
The Teratology Society
The Endocrine Society
The American Society of Human Genetics
Environmental Mutagen Society
International Society for Computational Biology
American College of Sports Medicine
Biomedical Engineering Society
Genetics Society of America
American Federation for Medical Research
The Histochemical Society
Society for Pediatric Research
Society for Glycobiology

CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

This letter certifies that

Attendee Name: **Flavia Ornelas**

Affiliation: University of Sao Paulo

Presented a poster at the FASEB Science Research Conference

Abstract Title: Functional characterization of ectonucleotidases in rat pineal glands.

Conference Title: Melatonin Biology: Actions & Therapeutics

Date: July 7- 12, 2013

Location: Niagara Falls, NY

If you have any questions, I can be reached at (301) 634 -7010 or via email at the following: src@faseb.org

Sincerely,

Kristen Hagy

Kristen Hagy, CMP
Conference Manager

ANEXO II- Certificado de apresentação do trabalho: Clube de Purinas

We hereby certify that

Flávia Gomes IllaOrnelas

presented the abstract entitled: **"FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ECTONUCLEOTIDASES IN RAT PINEAL GLANDS – IMPACT FOR THE DAY-NIGHT MODULATION OF THE DARKNESS HORMONE MELATONIN"** by authors: **Ornelas FG; Souza-Teodoro LH; D'Argenio-Garcia L; Carvalho-Sousa, CE; Muxel SM; Stefanello N; Zanini D; Schetinger, MRC; Fernandes PA; Markus RP; Ferreira ZS,** during the 4th Brazilian Purine Club Meeting – Perspectives of Purinergic Signaling: From Structures to Functions and Translational Research in the Grande Hotel Canela, on September 6 - 8, 2013, in Canela, Rio Grande do Sul, Brazil.

Maria Rosa Chitolina Schetinger
Comissão Organizadora 2013

Henning Ulrich
Presidente Clube Brasileiro
de Purinas 2013

Universidade Federal de Santa Maria 1960 · CCNE Centro de Ciências Naturais e Exatas · CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico · CAPES · Fapergs · FAPERJ Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

ANEXO III- Certificado de apresentação do trabalho: SBFTe