

Universidade de São Paulo  
Instituto de Biociências  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação Fisiologia Geral – IB-USP

A GLÂNDULA PINEAL E O ATP, ATORES CENTRAIS NA  
RESPOSTA AO DANO CEREBRAL

PINEAL GLAND AND ATP, KEY ACTORS IN THE BRAIN  
DAMAGE RESPONSE

KASSIANO DOS SANTOS SOUSA

São Paulo,

2022

Kassiano dos Santos Sousa

A GLÂNDULA PINEAL E O ATP, ATORES CENTRAIS NA  
RESPOSTA AO DANO CEREBRAL

PINEAL GLAND AND ATP, KEY ACTORS IN THE BRAIN  
DAMAGE RESPONSE

Doctoral Dissertation presented at the  
University of São Paulo, Institute of  
Biosciences to obtain the title of Doctor in  
Sciences in the field of General Physiology

Advisor: Professor Regina Pekermann

Markus

Co-advisor: Zulma Felisbina da Silva  
Ferreira

São Paulo

2022

# RESUMO

A glândula pineal é parte integral da resposta imune aguda. Padrões moleculares associados a danos ou a patógenos (DAMPs e PAMPs) ativam o eixo imune-pineal, através da inibição da síntese do hormônio da escuridão pela pineal, a melatonina. A síntese noturna de melatonina bloqueia a expressão de moléculas de adesão, responsáveis pelo rolamento e adesão de leucócitos, facilitando a entrada de células sanguíneas na área lesionada. Moléculas provenientes de células cerebrais mortas e extravasadas no líquido cefalorraquidiano informam a ocorrência de lesões cerebrais focais em áreas distais. O trifosfato de adenosina (ATP) é uma dessas moléculas. A glândula pineal expressa dois subtipos de receptores purinérgicos, P2Y<sub>1</sub> e P2X<sub>7</sub>. O P2X<sub>7</sub> é um receptor de baixa afinidade ao ATP e está comumente associado a sinais de perigo. A ativação desse receptor em glândulas pineais cultivadas inibe a transcrição do gene que codifica a enzima acetil-serotonina metiltransferase (ASMT) que converte o precursor N-acetilserotonina (NAS) em melatonina. Assim, esse projeto de doutorado foi delineado com objetivo de explorar como a glândula pineal responde a injeção de altas concentrações de ATM (mM) no ventrículo lateral de ratos, como a pineal reconhece injúrias no líquido cefalorraquidiano, e como ela responde a isto. Além disso, em uma abordagem mais ampla, revisamos a literatura com objetivo de atualizar a teoria do eixo imune-pineal à luz das novas descobertas, uma vez que os pinealócitos são instrumentados com receptores para PAMPs/DAMPs, citocinas, ATP, cortisol/corticosterona, moléculas de matriz como sulfato de heparan e diesel particulado no ar poluído. Utilizando abordagens *in vitro* e *in vivo*, demonstramos que: (1) baixas concentrações de ATP estimularam o aumento da liberação de MEL, enquanto que altas concentrações de ATP e do agonista P2X7R BzATP (15.0–50.0 ng) aumentaram as concentrações de NAS plasmático e na pineal; (2) no cérebro, a resposta foi dependente da estrutura, uma vez que houve aumento cortical sem haver alterações nas concentrações de melatonina no cerebelo; (3) todos os efeitos foram mediados por alterações na expressão de genes codificadores da sintetize e metabolização de enzimas melatoninérgicas, a princípio consideramos apenas que as enzimas de síntese poderiam estar envolvidas; (4) demonstramos que a glândula pineal desempenha um papel importante como estrutura responsável pela resposta primária à morte celular no cérebro, transformando o NAS no hormônio do escuro; (5) discutimos como diferentes cenários são operados em nível celular e os principais mecanismos

envolvidos na dinâmica da cicatrização, chegando a um estado fisiopatológico que simula um estado saudável, mas predispõe o surgimento de doenças crônicas e o desequilíbrio do eixo imune-pineal em estados patológicos. Em conjunto, nossos dados contribuem para a literatura por trazerem a luz novos processos e alvos interessantes para entendimento do papel central da via biossintética da melatonina durante uma resposta aguda de defesa. Acreditamos que entender melhor esses processos possibilitaram uma melhoria na utilização dessa molécula multifacetada como uma eficiente ferramenta farmacológica, podendo ser amplamente explorada em projetos futuros.

**Palavras-chave:** N-acetilserotonina, Melatonina, Sinalização purinérgica, BzATP, acetil-serotonina metiltransferase (ASMT), receptores toll-like, TNF.

## ABSTRACT

The pineal gland is an integral part of the acute immune response. Danger- or pathogen-associated molecular patterns (DAMPs and PAMPs) activate the immune-pineal axis, by turning off pineal gland synthesis of the darkness hormone, melatonin.

The nocturnal synthesis of melatonin blocks the expression of adhesion molecules responsible for the rolling and adhesion of leukocytes facilitates the entrance of blood cells to the injured area. The nocturnal synthesis of melatonin blocks the expression of adhesion molecules responsible for the rolling and adhesion of leukocytes, and the absence of this nocturnal indoleamine facilitates the entrance of blood cells to the injured area. Molecules released by dead brain cells in the cerebrospinal fluid inform the occurrence of focal-brain injuries to distal areas. Adenosine triphosphate (ATP) is one of these molecules. The pineal gland expresses two subtypes of purinoreceptors, P2Y1 and P2X7. The P2X7R is a low-affinity ATP receptor and is commonly linked to danger signals. The activation of this receptor in the cultured pineal glands inhibits the transcription of the gene that codes the enzyme acetyl-serotonin methyltransferase (ASMT) that converts the precursor N-acetylserotonin (NAS) into melatonin. Thus, this Ph.D. project was designed to explore how the pineal gland responds to the high ATP (mM) direct injected into the lateral ventricle of rats, how the pineal recognizes this injury in the CSF, and how it responds to that. Furthermore, in a broader approach, we revised the literature to update the Immune-pineal axis theory in the light of the new discoveries, once the pinealocytes are instrumented with receptors for PAMPs/DAMPs, cytokines, ATP, cortisol/corticosterone, matrix molecules such as heparan sulfate, and air pollution diesel particles. Using *in vitro* and *in vivo* approaches, we have shown that: 1) low ATP doses increased MEL output, while high ATP dose and the P2X7R agonist BzATP (15.0–50.0 ng) increased NAS pineal and blood content; 2) in the brain, the response was structure-dependent, once there was an increase in cortical and no change in cerebellar melatonin; 3) all these effects were mediated by changes in the expression of coding genes to synthesize and metabolize melatonergic enzymes, at first we only considered that the synthesis enzymes could be involved; 4) we demonstrated that the pineal gland plays a role as a first-line structure to respond to the death of cells inside the brain by turning NAS into the darkness hormone 5) we discuss how so different scenarios are operated at the cellular level and the main mechanisms involved in the dynamics of healing, reaching a pathophysiological status that simulates a healthy state but predisposes to the onset of chronic diseases, and the unbalance of the immune-pineal axis in pathological states. Taken altogether, these results significantly contributed to the literature as they brought to light new and interesting targets and processes, understanding the pivotal role of the melatonin biosynthetic pathway during acute defense responses will improve the

possibilities of using these multifaceted molecules as an efficient pharmacological tool, which could be explored in future projects.

**Keywords:** N-acetylserotonin, Melatonin, Purinergic signaling, BzATP, serotonin-N-acetyltransferase (SNAT), acetylserotonin N- methyltransferase (ASMT), ATP, immune response, toll-like receptors, TNF