

Leticia D'Argenio Garcia

**Efeito da estimulação purinérgica sobre a  
produção de melatonina em macrófagos  
da linhagem RAW 264.7**

SÃO PAULO

2016

LETICIA D'ARGENIO GARCIA

**Efeito da estimulação purinérgica sobre a  
produção de melatonina em macrófagos  
da linhagem RAW 264.7**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zulma Felisbina da Silva Ferreira

SÃO PAULO

2016

## Resumo

---

A melatonina é um hormônio produzido de forma rítmica e no período de escuro pela glândula pineal bem como de forma não rítmica por diversos tecidos e células imunocompetentes. É sintetizada pela acetilação e metilação da serotonina pela ação das enzimas arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) e acetilserotonina -O-metiltransferase (ASMT) que levam à formação de N-acetilserotonina (NAS) e melatonina (MEL), respectivamente. Nos últimos anos temos demonstrado que síntese de melatonina pela pineal pode ser negativamente modulada por mediadores inflamatórios e pelo ATP que atua como co-transmissor juntamente com a noradrenalina liberada no terminal nervoso simpático que a inerva. Periféricamente, contudo, estes mediadores inflamatórios apresentam um efeito contrário induzindo a produção de melatonina em células imunocompetentes. Estas observações levaram à criação da hipótese de um eixo imune-pineal. Esse trabalho teve como objetivo verificar o efeito do ATP sobre produção de melatonina em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os dados desse trabalho mostram que o ATP é capaz de induzir de maneira dose dependente a produção de melatonina em macrófagos através da modulação das enzimas AA-NAT e ASMT. Foi demonstrado também que esse efeito é mediado pelo receptor P2X7 e que a melatonina produzida age autocrina e paracrinamente aumentando a fagocitose de partículas de zimosan. Com isso, podemos concluir que o ATP é um ativador endógeno do eixo imune-pineal.

## Abstract

---

During the dark phase, melatonin is produced rhythmically by the pineal gland. Besides, a non rhythmical production is observed in several tissues and immunocompetent cells. In both scenarios, melatonin biosynthetic pathway is dependent on serotonin methylation by the action of arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), leading to the formation of N-acetylserotonin (NAS), which will be a further target for acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT), the last step in melatonin synthesis. In the last years, we have demonstrated that melatonin synthesis by the pineal gland may be negatively modulated by inflammatory mediators such as adenosine triphosphate (ATP), which also acts as co-transmitter released along with noradrenalin by the sympathetic nerve terminals. However, these inflammatory stimuli have the opposite effect inducing melatonin production in immunocompetent cells. These observations led us to the hypothesis of an immune-pineal axis. Therefore, this study aimed to investigate if the ATP was able to induce melatonin production in RAW 264.7 macrophages. ELISA assays demonstrate that high doses of ATP induce melatonin synthesis. Accordingly, ATP is able to induce an increase in the expression of AA-NAT as well as the ASMT. Herein, we also demonstrated that this effect is mediated by P2X7 receptor, and melatonin-ATP induced acted as an autocrine and paracrine message that increases the phagocytosis of zymosan particles. Therefore, we conclude that ATP is an endogenous activator of the RAW 264.7,

## Introdução

---

# 1 Melatonina

### *1.1 A produção ritmica de melatonina*

A melatonina foi primeiramente isolada e identificada por Lerner et al. em 1958 (Lerner et al, 1958) e é conhecida como o principal hormônio secretado pela glândula pineal.

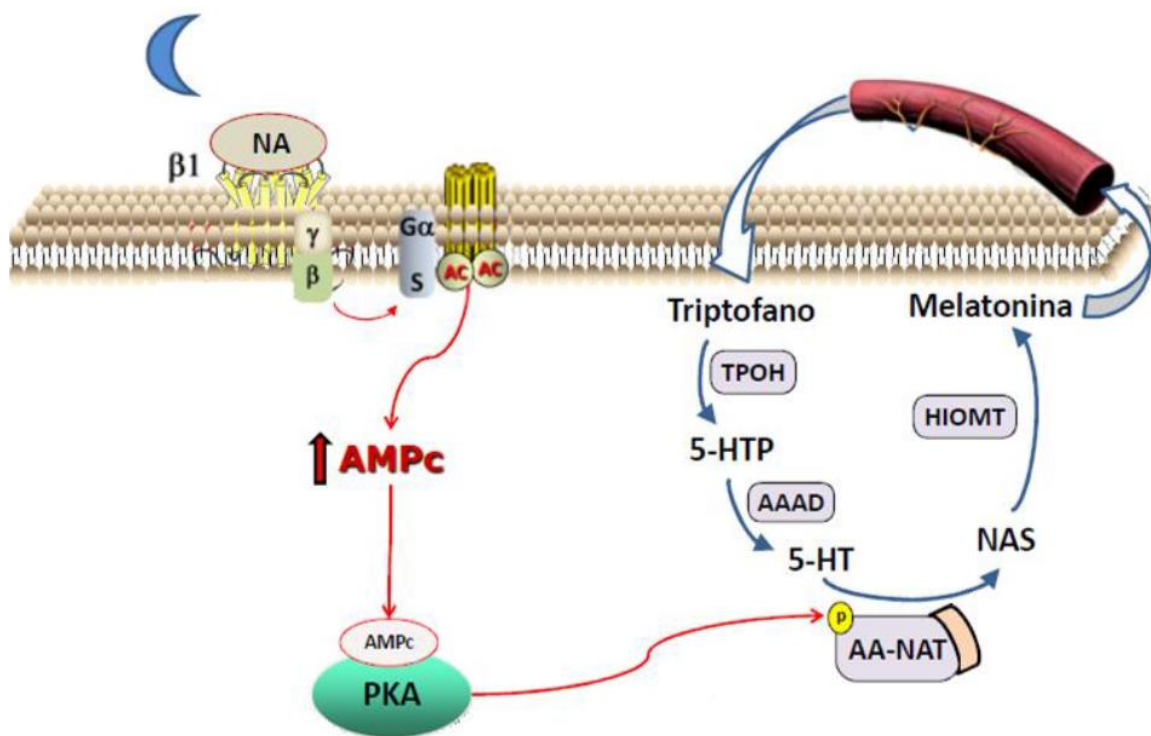
Essa glândula é considerada um órgão neuroendócrino sendo regulada pelo fotoperíodo ambiental. Está localizada entre os dois hemisférios cerebrais, fora da barreira hemato encefálica, e no seu parênquima são encontrados principalmente pinealócitos (Moller et al., 2002) que são neurônios modificados e especializados na produção de melatonina.

A principal inervação da pineal que regula a síntese de melatonina é constituída por fibras pós ganglionares simpáticas (Reuss, 1999; Kappers, 1960) que promovem a liberação de noradrenalina (Drijfhout et al., 1996; Wurtman et al, 1967) durante a fase de escuro e ativam receptores  $\beta_1$  e  $\alpha_1$  adrenérgicos resultando na produção noturna de melatonina.

A melatonina é sintetizada a partir do triptofano, proveniente da circulação, que é inicialmente convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) sob a ação da triptofano hidroxilase 1 (TPOH). Este é descarboxilado, através da enzima 5-HTP descarboxilase, dando origem à serotonina. A serotonina pode ser acetilada pela ação da enzima

arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) originando a N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a NAS é metilada pela enzima acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT), formando a melatonina (MEL) (Simonneaux e Ribelayga, 2003) (Figura 1).

A enzima AA-NAT é considerada a enzima chave na produção de melatonina e apresenta tanto a forma total como a fosforilada, sendo essa última a forma ativa da enzima. O processo de fosforilação ocorre quando a enzima se acopla e se estabiliza a chaperona 14-3-3. A fosforilação do complexo se dá, então, por PKA (Klein, 2007; Ganguly et. al., 2001).



**Figura 1 – Produção noturna de melatonina pela glândula pineal.** Durante a fase de escuro, a estimulação  $\beta$ 1-adrenérgica leva a ativação da subunidade  $\alpha$  da proteína Gs, consequente ativação de adenilil ciclase e PKA que fosforila CREB, promovendo sua dimerização e ligação com o cofator CBP. Esse complexo migra para o núcleo e promove a transcrição gênica da enzima AA-NAT. Essa enzima então se liga a chaperona 14-3-3, estabilizando-se. Com isso, a produção de melatonina é iniciada.

## *1.2 A produção extra pineal de melatonina*

Outros estudos demonstram que a produção de melatonina ocorre também em diversos outros órgãos e tecidos de maneira não rítmica. Esta produção extra pineal já foi constatada na medula óssea (Tanet al., 1999), trato gastrintestinal de ratos (Bubenik et al., 1992), fígado, rim e baço de roedores e primatas (Menendez-Pelaez et al., 1993) e placenta humana (Lanoix et al., 2008).

Em células imunocompetentes, a produção desse hormônio foi verificada em linfócitos humanos (Carrilo-Vicco et al., 2004), macrófagos da cavidade peritoneal (Martins et al., 2004) e células do colostro humano (Pires-Lapa et al., 2013; Pontes et al., 2006, 2007).

## *1.3 Receptores de Melatonina*

A melatonina após ser produzida é liberada e pode atuar em receptores próprios. Em mamíferos, são descritos dois subtipos de receptores, MT1 e MT2, sendo o efeito clássico observado em ambos receptores: uma sinalização através da proteína G que ocasiona a diminuição dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), seguido por diminuição da atividade da proteína quinase dependente de AMPC (PKA) e da fosforilação do fator de transcrição CREB (do inglês, cAMP response element binding) (Dubocovicht et al., 2005).

Outro receptor para a melatonina que também pode ser encontrado nas células, denominado MT3, foi identificado como sendo homólogo a enzima quinonaredutase 2 (QR2), uma enzima envolvida na proteção contra o stress oxidativo nas células (Nosjean et al., 2000).

A melatonina pode, ainda, agir por ação independente de receptores sendo um importante sinalizador do escuro e sincronizador dos ritmos e das funções endógenas às variações ambientais (Reiter, 1993).

#### *1.4 A melatonina e o sistema imunológico: O Eixo – Imune Pineal*

A interação da produção de melatonina com o sistema imunológico e o processo inflamatório ganhou mais importância a partir da década de 80.

A resposta inflamatória é conceituada como a resposta do tecido vascularizado a um agente injuriante, vista como um processo fisiológico e protetor cujo objetivo final é destruir, diluir ou eliminar o agente lesivo. Para que isso ocorra, uma série de eventos são disparados e quando possível ocorre a cicatrização e reconstrução do tecido lesado. As manifestações clínicas da inflamação são conhecidas como os cinco sinais cardinais. São eles: a dor, o calor, o rubor, o tumor e a perda de função, onde cada um deles se associa com uma alteração metabólica do tecido lesado.

A montagem e resolução desse processo consiste em duas fases, sendo uma pró e outra anti-inflamatória, com eventos organizados na linha do tempo e integrados entre os sistemas nervoso, endócrino e imune (Markus et al, 2007).

Na fase pró-inflamatória o que vemos é um grande recrutamento celular que ocorre quando as células do sistema fagocítico mononuclear são ativadas, sendo essas células derivadas de células hematopoiéticas da medula óssea. Os monócitos, precursores dos macrófagos, são liberados na circulação e se alojam, por exemplo, no baço que serve como um grande reservatório para células imaturas. Quando os monócitos migram para os locais de injúria, eles se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (Janeway, 2001).



Os macrófagos, juntamente com os monócitos e as células dendríticas, são considerados as células fagocíticas profissionais devido a eficiência no processo de fagocitose que as mesmas realizam. Essa maior eficiência se dá graças a expressão de múltiplos receptores de membrana que detectam sinais que, na maioria das vezes, estão ausentes em tecidos saudáveis (Mosser DM , Edwards JP, 2088).

Com isso, inicia-se a cascata de eventos da reação da fase aguda. Há secreção de citocinas pró- inflamatórias como interleucina-1 beta (IL-1B), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) (Baumann e Gauldie, 1990). Essas moléculas agem sobre células da matriz, principalmente fibroblastos e células endoteliais, o que causa a liberação de um segundo grupo de citocinas que incluem interleucina-6, interleucina-8, proteínas inflamatórias e quimiotáxicas. Todos esses fatores, juntamente com o fator de crescimento, causam a atração células para o foco inflamatório.

A orientação periférica dos leucócitos da inicio ao processo denominado viagem leucocitária. Nesse processo ocorre marginalização, rolagem e adesão dos leucócitos na camada endotelial antes de transmigrarem para o tecido. Esses eventos são mediados por interação entre moléculas de adesão expressas na membrana plasmática dos neutrófilos e das células endoteliais ativas (Bienvenu e Granger, 1993). Essas células, por fim, secretam outras citocinas que retroalimentam o processo. (Baumann e Gauldie, 1994)

Dados do nosso grupo demonstram que, assim como as células do sistema imunológico, a glândula pineal também integra a resposta imune inata já que é equipada para reconhecer e responder a diferentes mediadores inflamatórios como o lipopolissacarídeo (LPS - componente da membrana de bactérias gram-negativas) e a

citocina TNF pois expressa tanto receptores do tipo Toll Like (TRL) como receptores para citonina TNF (TNFR1) (Carvalho-Souza et al., 2011; da Silveira Cruz-Machado et al., 2010).

Essa maquinaria presente na glândula pineal se explica uma vez que nosso grupo também reportou que a melatonina noturna circulante impede a adesão e rolamento dos leucócitos na camada endotelial (Lotufo et al., 2001) o que, conseqüentemente, dificultaria a montagem da resposta inflamatória visto a importância do recrutamento celular já citado.

Sendo assim, na vigência de um processo inflamatório, a ativação de receptores Toll-4 (TLR4) por LPS na glândula pineal induz a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010).

O NFkB é formado por cinco proteínas diferentes: p105/p50, p100/p52, p65 (Rel-A), Rel-B e c-Rel. Essas proteínas possuem um domínio REL homologado (RHD), o qual é responsável pela dimerização e ligação ao DNA (Ghosh et al., 1998). Embora todas as subunidades possuam o domínio RHD, somente a p65, Rel-B e c-Rel contêm o domínio de transativação (TAD) necessário para regulação positiva da expressão gênica (Hayden & Ghosh, 2008). Acredita-se que os homô e heterodímeros formados por p50 e p52 são repressores da transcrição gênica (a não ser na presença de outros co-fatores) e que os dímeros formados por pelo menos uma unidade que contenha a TAD ativem a transcrição gênica (Zhong, 2002; Baer et al., 1998).

A translocação nuclear de dímeros p50/p50 e p50/RelA de NFkB nesta glândula, inibe a produção de NAS bem como a indução da transcrição do gene da citocina TNF, além de aumentar a expressão dos receptores TNFR1 (Carvalho-Souza et al., 2011; da

Silveira Cruz-Machado et al., 2010). Esses eventos competem para a supressão da produção noturna de melatonina pela glândula pineal.

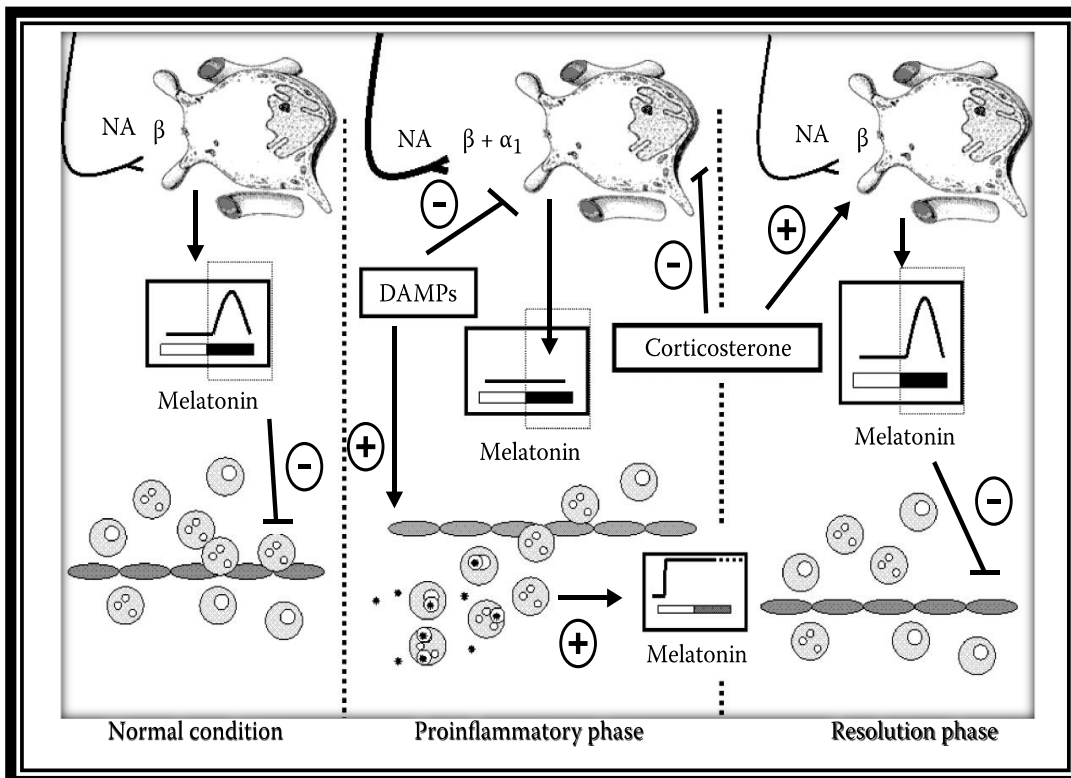
Além disso, nosso grupo também demonstrou que células mononucleares de colostro ativadas por zimosan (componente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*) e macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados por LPS são capazes de produzir melatonina pela ativação do fator de transcrição NFκB que induz a transcrição do gene da enzima AA-NAT (Pires-Lapa et al., 2013; Muxel et al., 2012).

A melatonina produzida nestas células age de maneira autócrina e parácrina aumentando a expressão do receptor Dectina-1 e, conseqüentemente, aumentando também a fagocitose das partículas de zimosan (Pires-Lapa et al., 2013).

Com todos os dados apresentados, nosso grupo propôs a teoria do Eixo Imune-Pineal onde, em condições fisiológicas, a produção de melatonina noturna inibe a migração de leucócitos na camada endotelial e em condições pró- inflamatórias, a produção noturna de melatonina é suprimida pela presença de agentes ou mediadores inflamatórios como o LPS e o TNF e a sua síntese local é induzida em células imunocompetentes ativadas (Figura 2).

Ou seja, o que vemos é uma troca do local de produção desse hormônio, que deixa de ter uma produção central e passa a ter uma produção periférica e localizada.

Nota-se, por fim, que a via de sinalização do fator de transcrição NFκB é central no contexto do Eixo Imune-Pineal, sendo responsável pela supressão da produção de melatonina pela pineal e, simultaneamente, pela indução desta produção por macrófagos no foco de lesão, realizando a alternância entre as fontes de síntese pineal e extra-pineal (Markus et al., 2013).



**Figura 2 - Teoria do Eixo Imune Pineal.** Durante condições fisiológicas, a glândula pineal produz melatonina de forma ritmica durante a fase de escuro. Essa melatonina é liberada na corrente sanguínea e age diminuindo o rolamento e a adesão de leucócitos. Em condições pró inflamatórias, a produção de melatonina pela glândula pineal é bloqueada e esse hormônio passa a ser produzido por células imunológicas ativadas. Numa fase de resolução, a homeostase é reestabelecida (retirada de Markus e Ferreira, 2011).

## 2 O sistema purinérgico

A sinalização purinérgica representa um papel importante na regulação de processos fisiológicos e fisiopatológicos, sendo suas respostas funcionais reguladas por uma série de “cross-talks” de vias de segundos mensageiros. Assim, por exemplo, alterações na expressão de óxido nítrico, citocinas ou NF $\kappa$ B mediadas por receptores purinérgicos têm sido descritas (Franke e Illes, 2006).

O ATP, uma das moléculas sinalizadoras do sistema purinérgico, pode ser liberado, por exemplo, através de canais de conexina ou panexina, canais iônicos, apoptose e necrose celular e até mesmo pelo receptor P2X7 (Brandao-Burch et. al., 2012).

Por causa desta liberação de ATP em tecidos danificados, as células imunes reconhecem essa molécula como um sinal de perigo e isso provoca uma variedade de respostas inflamatórias (Di Virgilio, 2005).

Depois de liberado, O ATP, assim como outras moléculas, pode ser alvo de um grupo de enzimas de metabolização. Essas enzimas são conhecidas como ectoenzimas que agem hidrolisando nucleotídeos multifosfatados, ou seja, convertendo o ATP em ADP, AMP ou adenosina. Essa ação é responsável por finalizar a ativação de receptores P2 além de evocarem outras respostas devido a ação em receptores seletivos de adenosina, por exemplo. (Shirley et. al., 2009).

Essas enzimas são classificadas em duas famílias, sendo elas: a família das ectonucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases (E-NTPDase1,2,3,8) e a família das ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP1,2,3). Também são conhecidas as enzimas ecto-5'-nucleotidase e a fosfatase alcalina que não fazem parte das duas famílias citadas (Zimmermann et. al., 2012)

## *2.1 Os receptores purinérgicos*

Existem duas grandes famílias de receptores purinérgicos: receptores P1 (ou receptores para adenosina) e receptores P2, que reconhecem principalmente ATP, ADP, UTP e UDP. A família de receptores P1 compreende quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3, todos os quais acoplados à proteína G. Os receptores P2, por sua vez, são subdivididos em duas grandes subfamílias: a de receptores que são canais iônicos (P2X) e os

receptores com 7 domínios transmembrânicos acoplados a proteína G (P2Y) (Abbracchio et al., 2006).

**Tabela 1 – Classificação 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 <sub>s</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub>	Canal iônico	Acoplados à proteína G: G <sub>q/11</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>s</sub>
Subtipos	A <sub>1</sub> , A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , A <sub>3</sub>	P2X <sub>1-7</sub>	P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , P2Y <sub>12</sub> , P2Y <sub>13</sub> , P2Y <sub>14</sub>
Efetores	IP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup> , AMPc	Ca <sup>2+</sup> > Na <sup>+</sup> > K <sup>+</sup>	IP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup> , DAG, AMPc

Abreviaturas: ATP- adenosina 5'-trifosfato; ADP- adenosina 5'-difosfato; UTP- uridina-5'-trifosfato; UDP- uridina-5'-difosfato; IP<sub>3</sub>- trifosfato de inositol; AMPc- adenosina monofosfato cíclica; DAG- diacilglicerol

Os receptores P2Y apresentam 8 subtipos clonados e caracterizados farmacologicamente (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>). Estes receptores quando estimulados ativam numerosas cascatas de sinalização associadas com várias enzimas como fosfolipase C (PLC), adenilicilase, guanilicilase, proteínas quinases, fosfodiesterases (Erbet al., 2006) e controle de canais iônicos. Estas cascatas de sinalização intracelular regulam reações celulares como liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático com subsequente ativação de sensores intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, proliferação, diferenciação, morte celular programada, migração celular etc. No sistema nervoso central os receptores P2Y modulam a liberação de vários neurotransmissores como glutamato e GABA (North e Verkhratsky, 2006; Illes e Ribeiro, 2004).

Os receptores P2X medeiam a passagem não seletiva de cátions ( $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Na}^+ > \text{K}^+$ ) através da membrana plasmática, resultando numa despolarização e aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes receptores compreendem uma família de, pelo menos, sete proteínas (P2X1 – P2X7) encontradas em todo o organismo. Como outros canais iônicos, são oligoproteínas compostas de mais de uma subunidade por receptor funcional (Figura 3).

Estudos bioquímicos mostraram que 11 diferentes tipos de receptor P2X podem ser formados à partir da combinação de duas subunidades, a saber: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2X2/3, P2X4/6, P2X1/5, P2X2/6 (Pankratov et al., 2009).

### ***1.5 O receptor P2X7***

O receptor purinérgico P2X7 representa um subtipo bastante peculiar, uma vez que só é ativado por altas concentrações de ATP e pelo agonista seletivo BzATP e sua ativação é seguida pelo aparecimento de um grande poro que permite a passagem de moléculas até 900 Kd (Duan e Neary, 2006). Além disso, este receptor pode atuar sinalizando outros componentes, como enzimas efectoras e proteínas quinases, regulando a expressão gênica e efeitos de longa duração como crescimento celular, proliferação e apoptose.

Desde a clonagem do receptor P2X7 em 1996, ele vem sendo apontado também como um potencial e importante segundo estímulo para a ativação do receptor TLR4 dependente de IL-1B e IL-18. Dados da literatura mostram que ao primar os macrófagos com LPS, ligante do TLR4 e componente da parede celular de bactérias gram negativas, ocorre um acúmulo intracelular de pró IL-1B e pró IL-18. Em seguida, ao estimular o receptor P2X7 ocorre uma ativação do inflamossoma e da caspase – 1 culminando na

liberação de IL-1 $\beta$  ativo e IL-18, sendo as mesmas detectadas no meio após 20 – 30 minutos de estimulação do receptor purinérgico (Hanley et al., 2012). A citocina IL-1 $\beta$  é um fator chave na defesa contra infecções primárias.

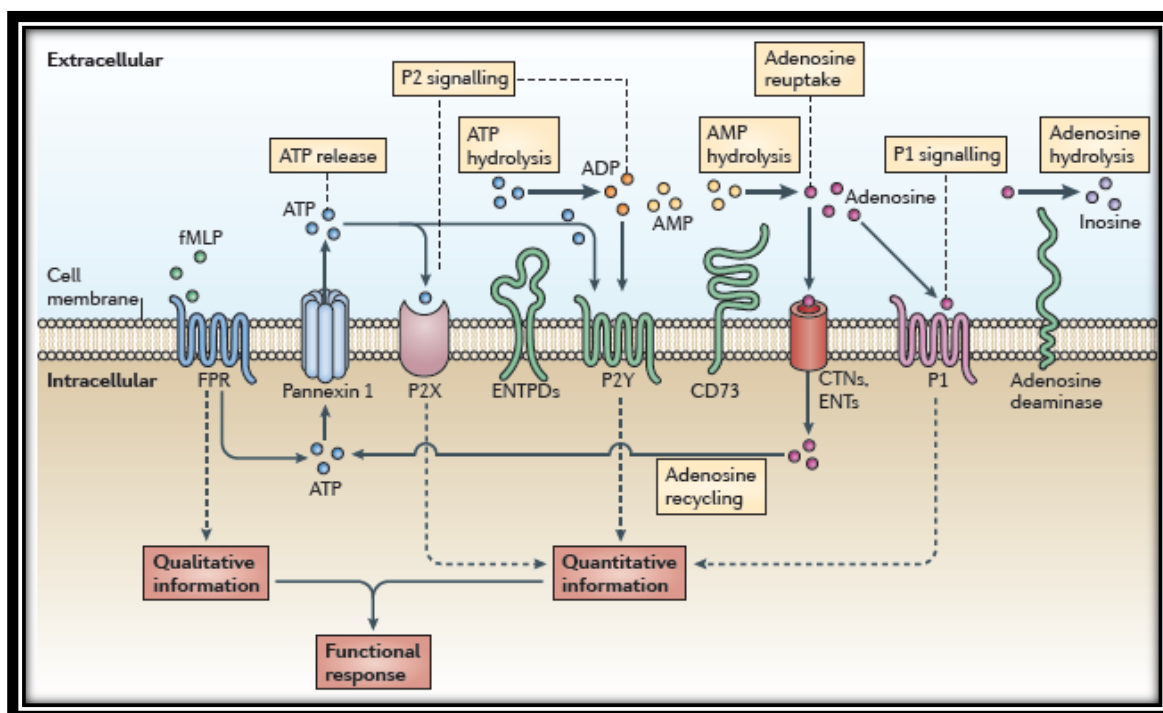


Figura 3 - Esquema representativo da sinalização purinérgica. (retirada Junger, 2011)

## 2.2 O sistema purinérgico e a melatonina

Nosso grupo demonstrou que o ATP, na glândula pineal, é co-liberado com noradrenalina (Mortani-Barbosa et al., 2000) e liga-se a receptores P2Y<sub>1</sub> presentes na glândula. A ativação destes receptores modulam de forma diferencial a via biossintética da melatonina potenciando a produção do precursor NAS e inibindo o conteúdo de melatonina induzida por ativação de adrenoceptores  $\beta$ 1.

O efeito potencializador observado na NAS é mediado pelo aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> em pinealócitos (Ferreira e Markus 2001; Ferreira et al., 2003). Já o efeito inibitório visto na melatonina é mediado por uma supressão gênica



e proteica da enzima ASMT (Souza-Teodoro et al., 2016). Esse efeito dual do ATP sobre a via biossintética da melatonina abre uma nova perspectiva dos mecanismo envolvidos na regulação do Eixo Imune Pineal.

Visto todos os fatos, esse trabalho visou investigar o efeito da estimulação com ATP sobre a produção de melatonina por macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os resultados obtidos permitirão avaliar a participação purinérgica do ponto de vista periférico do Eixo Imune-Pineal.

## Conclusões

---

1. Em altas concentrações (1 ou 3mM), o ATP é capaz de induzir a produção de melatonina;
2. O ATP 1 e 3mM é capaz de induzir o aumento na forma total da enzima AA-NAT;
3. O ATP 1 e 3mM é capaz de induzir o aumento na imunorreatividade da forma fosforilada da enzima AA-NAT;
4. O ATP 1mM é capaz de aumentar a imunorreatividade da enzima ASMT;
5. O antagonista específico P2X7, A438079, é capaz de inibir o aumento induzido pelo ATP tanto na imunorreatividade da fosfo-AA-NAT como no conteúdo de melatonina;
6. A incubação previa com suramina aumenta ainda mais a imunorreatividade da enzima fosfo-AA-NAT e do conteúdo de melatonina induzidos por ATP;
7. O ATP é capaz de aumentar o número de macrófagos que fagocitam zimosan;
8. O uso prévio do luzindol inibe o efeito do ATP em aumentar número de células que fagocitam zimosan ;
9. O ATP é capaz de ativar o Eixo-Imune pineal do ponto de vista das células imunocompetentes.

## Referências

---

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):281-341, 2006.
- Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. (1998). Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* 18:5678-5689.
- Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med.* 1990 Apr;7(2):147-59. Review.
- Baumann H1, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994 Feb;15(2):74-80.
- Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J.* 2004 Jan;18(1):149-51. Epub 2003 Nov 3.
- Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J.* 2004 Jan;18(1):149-51. Epub 2003 Nov 3.
- Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. *FASEB J.* 2004 Jan;18(1):149-51.
- Benítez-King G, Antón-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia.* 1993 Aug 15;49(8):635-41.
- Benítez-King G, Huerto-Delgado L, Antón-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993;53(3):201-7.
- Bienvenu K, Granger DN. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Bienvenu K, Granger DN. Blood Cells.* 1993;19(2):279-88; discussion 288-9. Review.
- BRADFORD, M. D.; SOLTOFF, S. P. P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem J*, v. 366, n. Pt 3, p. 745-55, Sep 15 2002
- BROWNE, L. E. et al. P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat Neurosci*, v. 14, n. 1, p. 17-8, Jan 2011.
- Bubenik, G.A., Ball, R.O. & Pang, S.F. (1992). The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5- hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J Pineal Res.*, 12 (1): 7 – 16.
- Bubenik, G.A., Ball, R.O. & Pang, S.F. (1992). The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5- hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J Pineal Res.*, 12 (1): 7 – 16.

- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, v. 64, n. 12, p. 1471-83, Jun 2007.
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., Garciamaurino, S., Reiter, R.J. & Guerrero, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.*, 18(3): 537-539
- Carvalho-Sousa CE, da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK, Fernandes PA, Pinato L, Muxel SM, Cecon E, Markus RP. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011 May 13;2:10
- Carvalho-Sousa CE, da Silveira Cruz-Machado S, Tamura EK, Fernandes PA, Pinato L, Muxel SM, Cecon E, Markus RP. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011 May 13;2:10
- Cecon, E. Fernandes, P.A.C.M.; Pinato, L.; Ferreira, Z.S.; Markus, R.P. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in rat pineal gland. *Chronobiol Int*. 2010 Jan;27(1):52-67
- Charles H.V. Hoyle, Gillian E. Knight & Geoffrey Burnstock. Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br. J. Pharmacol.* (1990), 99, 617-621
- Corriden, R. and Insel, P.A. (2012) New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine, and their receptors. *Purinergic Signal*. 8 (3), 587–598, 2012
- Coutinho-Silva, R.& Ojcius, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect*. 14, 1271–1277 (2012).
- Da Silveira Cruz-Machado, S., Carvalho-Sousa, C. E., Tamura, E. K., Pinato, L., Cecon, E., Fernandes, P. A. C. M., De Avellar, M. C. W., Ferreira, Z. S. and Markus, R. P. (2010), TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. *Journal of Pineal Research*, 49: 183–192.
- Di Virgilio, F. Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signa*. 2005 (1):205 – 209.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L. et al. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol*, v. 157, n. 7, p. 1203-14, Aug 2009.
- DONNELLY-ROBERTS, D. L.; JARVIS, M. F. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol*, v. 151, n. 5, p. 571-9, Jul 2007.
- Duan S, Neary JT. P2X(7) receptors: properties and relevance to CNS function. *Glia*. 2006 Nov 15;54(7):738-46.
- Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):343-80. Epub 2010 Jul 6.
- Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005 Jul;27(2):101-10. Review.
- Erb L1, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch*. 2006 Aug;452(5):552-62.
- Falzoni, S. et al. The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible

- physiological role. *J. Clin. Invest.* 95, 1207–1216 (1995).
- FERRARI D, WESSELBORG S., BAUER MK, et al. Extracellular ATP activates transcription factor NF kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *J Cell Biol* 1997; 139:1635-1643.
- Ferreira Z. S., Garcia, C.R.S., Spray, D.C., Markus RP. P2Y1 receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology* 69:33-37, 2003
- Ferreira Z.S., Markus R.P. Characterization of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. *Eur J Pharmacol* 415: 151-156, 2001.
- Francesco Di Virgilio. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling* (2005) 1: 205–209
- Franke, H & Illes, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther.* 109(3):297-324, 2006.
- Franke, H & Illes, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol Ther.* 109(3):297-324, 2006.
- 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*, v. 98, n. 14, p. 8083-8, Jul 3 2001.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM: Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res* 2000;29: 129–137
- Ghiringhelli, F. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1b-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Med.* 15, 1170–1178 (2009).
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998). NF-κB and REL proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225–260.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFκappaB activation. *FASEB J.* 1998 Jun;12(9):685-93.
- Gombault, A., Baron, L. and Couillin, I. (2013) ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front. Immunol.* 3 (414).
- GU, L. Q. et al. Association of XIAP and P2X7 receptor expression with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine*, v. 38, n. 2, p. 276-82, Oct 2010.
- Guerrero, J.M, Reiter, R..J. A brief survey of pineal gland – immune system interrelationships. *Endocrine Research*, 1992, (18): 91-113.
- Hanley PJ, Kronlage M, Kirschning C, del Rey A, Di Virgilio F, Leipziger J, Chessell IP, Sargin S, Filippov MA, Lindemann O, Mohr S, Königs V, Schillers H, Bähler M, Schwab A. Transient P2X7 receptor activation triggers macrophage death independent of Toll-like receptors 2 and 4, caspase-1, and pannexin-1 proteins. *J Biol Chem.* 2012 Mar 23;287(13):10650-63.
- Hayden MS, Ghosh S. (2008). Shared principles in NF-κB signaling. *Cell* 132:344–362.
- Illes P, Ribeiro JA. Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Curr Top Med Chem.* 4(8):831-

8, 2004

Janeway CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001;; 3:1167-1171.

KAPPERS, J. A. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, v. 52, p. 163-215, 1960.

KLEIN, D. C. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem*, v. 282, n. 7, p. 4233-7, Feb 16 2007.

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

Lanoix, D., Beghdadi, H., Lafond, J. & Vaillancourt, C. (2008). Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J. Pineal Res.*, 45(1): 50-60.

Lee DH, Park KS, Kim DR, Lee JW, Kong ID. Dual effect of ATP on glucose-induced insulin secretion in HIT-T15 cells. *Pancreas*. 2008 Oct;37(3):302-8.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori N: Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.

Lissoni, P., Barni, S., Archili, C., Rovelli, F., Conti, A., Maestroni, G.JM & Tancini, G. Endocrine effects of a 24:00 hour intravenous infusion of interleulin-2 in immunotherapy of cancer. *Anticancer Res*. 1990 (10): 753-756.

LIU Y, XIAO Y, LI Z. P2X7 receptor positively regulates MyD88-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Cytokine* 2011; 55:229-236

Lotufo, C.M., Yamashita, C.E., Farsky, S.H., Markus, R.P. (2006). Melatonin effect on endotelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotrieno B4. *Eur J Pharmacol*. 534(1-3): 258-63

Maestroni, G.J.M. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J. Pineal Res*. 1995, (18): 84-89

Maestroni, G.J.M., Conti, A. Melatonin in relation to imune system. In: *Melatonin Biosynthesis, Physiological effects and Clinical applications* edited by Yu,H.S. and Reiter, R.J. CRC Press, London, 1993, p.289-310.

Maestroni, G.J.M., Conti, A., Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity: II Melatonin enhances the antibody response via an opiatergic mechanism. *Clin. Exp. Immunol*. 1987 (68): 384-391.

MARKUS, R. P. et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, v. 14, n. 3-4, p. 126-33, 2007.

Markus, RP., Cecon, E., Pires-LAPA, MA. Regina P Markus, Erika Cecon, Marco Antonio Pires-Lapa. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF-KB) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cell. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14, 10979-10997

Martins, E., Ferreira, A.C.F., Skorupa, A.L., Afeche, S.C., Cipollaneto, J. & Costa-Rosa, L.F.B.P. (2004). Tryptophan consumption and ndoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 75:1116-1121.

- Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Barlow, L., Pablos, M.I. & Tan, D.X. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell. Biochem.*, 53(4): 373 - 382.
- Møller M e Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 2002; 309:139-50.
- Mortani Barbosa, E.J., Ferreira, Z.S. and Markus, R.P. - Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur. J. Pharmacol.* 401: 59-62, 2000.
- Mosser DM , Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;; 8:958--69.
- Muller, T. et al. A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 456–464 (2011).
- Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AW, Cecon E, Tamura EK, Floeter-Winter LM, Markus RP. NF- $\kappa$ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One.* 2012;7(12):e52010.
- North RA, Verkhatsky A. Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch.* 452(5):479-85, 2006.
- North RA, Verkhatsky A. Purinergic transmission in the central nervous system.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31311-7.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008 Jul;85(3):335-53
- Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhatsky A. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158(1):137-48, 2009.
- Pires-Lapa MA, Tamura EK, Salustiano EM, Markus RP. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res.* 2013 Oct;55(3):240
- Pontes, G.N., Cardoso, E.C., Carneiro-Sampaio, M.M. & Markus, R.P. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrums phagocytes. *J. Pineal Res.*, 41(2): 136-141.
- Pontes, G.N., Cardoso, E.C., Carneiro-Sampaio, M.M. & Markus, R.P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J. Pineal Res.*, 43(4): 365-371.
- Queiroz G1, Talaia C, Gonçalves J. ATP modulates noradrenaline release by activation of inhibitory P2Y receptors and facilitatory P2X receptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Nov;307(2):809-15
- Reiter R.J. the melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-64, 1993.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.*

- 1991 May;12(2):151-80.
- Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993;49: 654-664.
- REUSS, S. Trigeminal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech*, v. 46, n. 4-5, p. 305-9, Aug 15-Sep 1 1999.
- Samantha E. Adamson, Norbert Leitinger. The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V., 2014
- Schröder H, Bendig A, Dahl D, Gröschel-Stewart U, Vollrath L. Neuronal markers in the rodent pineal gland—an immunohistochemical investigation. *Histochemistry*. 1990;94(3):309-14.
- Simonneaux, V. & Ribelayga, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*, 55, 325-395, 2003.
- SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*, v. 55, n. 2, p. 325-95, Jun 2003.
- Souza-Teodoro, L. H.; Dargenio-Garcia, L., Petrilli-Lapa, C. L.; Souza, E. S.; Fernandes, P.A. C. M ; Markus, R. P.; Ferreira, Z. S. Adenosine triphosphate (ATP) inhibits melatonin synthesis in the rat pineal gland. *J Pineal Res*. 2016 Jan 6.
- SPERLAGH, B.; VIZI, E. S. Is the neuronal ATP release from guinea-pig vas deferens subject to alpha 2-adrenoceptor-mediated modulation? *Neuroscience*, v. 51, n. 1, p. 203-9, Nov 1992.
- Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res* 2009;46:268-274.
- Tamura EK, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res*. 2006 Oct;41(3):267-74.
- Tamura EK, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res*. 2006 Oct;41(3):267-74. KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 51-69, Oct 4 2012
- WILEY, J. S. et al. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, v. 78, n. 5, p. 321-32, Nov 2011.
- Wolfgang G. Junger. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *NATuRe ReviewS | Immunology*. 18 February 2011
- YOUNG, M. T. P2X receptors: dawn of the post-structure era. *Trends Biochem Sci*, v. 35, n. 2, p. 83-90, Feb 2010.
- Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 9:625-6.