

**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

## 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  $\beta_1$  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 conseqüente 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  $\beta$ 1 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.

## **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

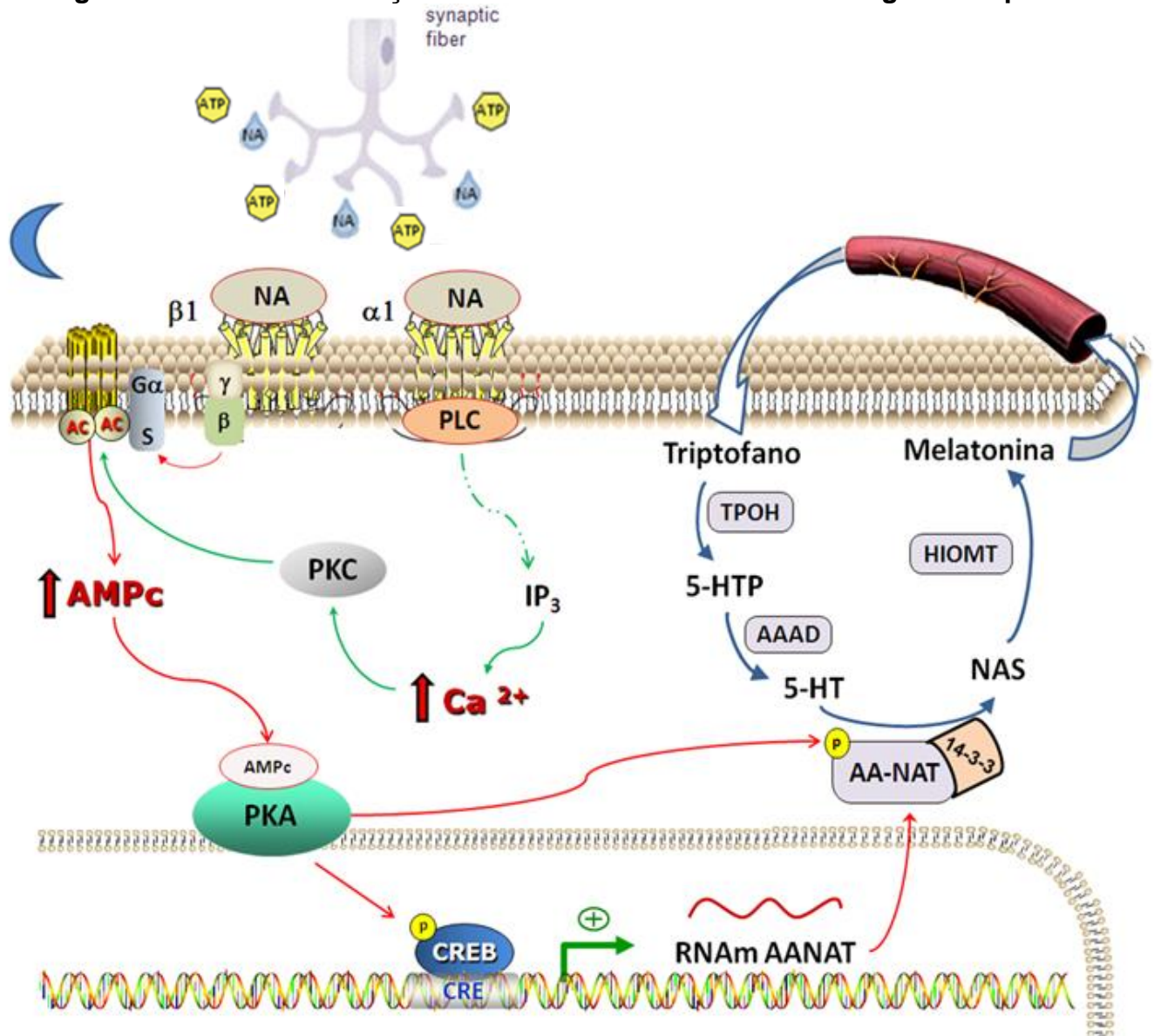
melanopsina chegam ao NSQ via fibras retino-hipotalâmicas e, a partir daí, são transmitidas para a área retro-quiasmática do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que se projeta direta ou indiretamente, sobre a coluna intermediolateral da medula espinal. Esta por sua vez, projeta-se sobre o gânglio 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 hidroxí-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 ( $\beta_1$ ) ativando a adeniliciclase (AC) e aumentando os níveis intracelulares de adenosina de monofosfato cíclica (AMPc) que leva, então, à ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Em roedores, o aumento do AMPc e, conseqüentemente, a ativação da PKA fazem com que a subunidade catalítica da PKA fosforile o fator de transcrição CREB (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  $\beta_1$  é potenciado pela estimulação de adrenoceptores alfa 1 ( $\alpha_1$ ), cuja interação induz a hidrólise de fosfoinosítídeos, 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  $\beta_1$  (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  $\beta_1$  irá deslocar a subunidade  $\alpha_s$  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  $\alpha_1$  irão potenciar essa resposta dos receptores  $\beta$  através do aumento dos níveis de cálcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ). 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 - hidroxí-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 et 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).

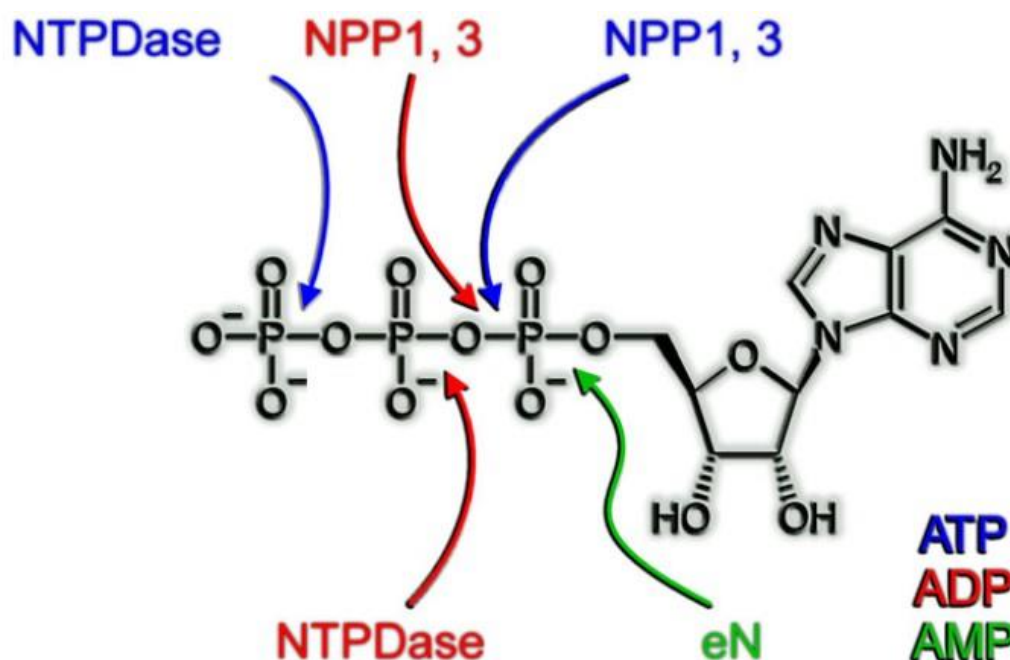
A metabolização realizada pelas enzimas é funcionalmente importante, uma vez que o ATP e seus metabólitos atuam como ligantes fisiológicos em diferentes receptores purinérgicos (Zimmermann, 2006).

### **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 γ 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  $\text{Ca}^{2+}$  no caso das enzimas NTPDases, de magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) no caso da enzima 5' nucleotidase e de zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), no caso das enzimas NPPs (Bonan, 2012).

**Tabela 1- Mecanismo de hidrólise das ecto-nucleotidases**

Enzimas	Mecanismo de Hidrólise
<b>NTPDases</b>	
NTPDase 1	$ATP \rightarrow ADP + P_i \rightarrow AMP + 2P_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$
NTPDase 2	$ATP \rightarrow ADP + P_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$
NTPDase 3 NTPDase 5 NTPDase 8	$ATP \rightarrow ADP + P_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$
<b>NPPs</b>	
NPP 1 NPP 3	$ATP \rightarrow AMP + PP_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$ $3',5'\text{-cAMP} \rightarrow AMP$
NPP 2	$ATP \rightarrow AMP + PP_i$ $ADP \rightarrow AMP + P_i$ $3',5'\text{-cAMP} \rightarrow AMP$
Ecto-5'nucleotidase	$AMP \rightarrow \text{adenosina} + P_i$

Abreviaturas: NTPDase - ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolase; NPP - ecto-nucleosídeo-pirofosfatase/fosfodiesterase; ATP - adenosina 5'-trifosfato; ADP - adenosina 5'-difosfato; AMP - adenosina 5'monofosfato;  $P_i$  - 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 extracelular 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 constituída por 7 membros. As NPP1 e NPP3 se caracterizam com um domínio transmembrana, uma pequena região n-terminal citoplasmática e um loop extracelular com a porção C-terminal. A NPP2 é uma enzima secretada e não apresenta domínio transmembrana. As demais NPPs, 4, 5, 6 e 7 possuem seu ecto-domínio invertido, podemos ver que sua região C-terminal é

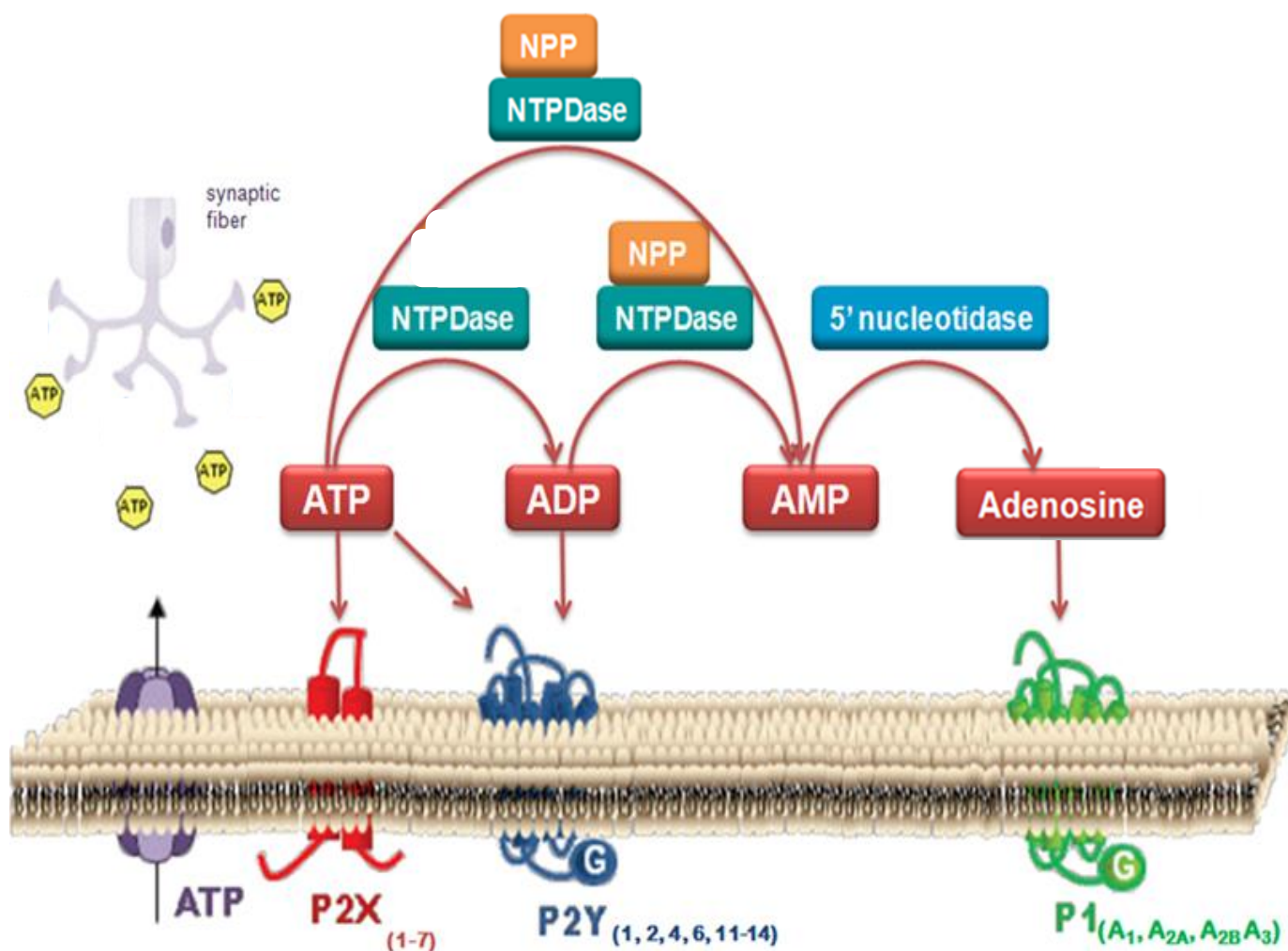
intracelular e a N-terminal extracelular (Bonan, 2012). Essa diferença conformacional e pelo fato da NPP 2 não apresentar domínio transmembrana faz com que somente a NPP1 e NPP3 estejam envolvidas com o sistema purinérgico por serem capazes de hidrolisar nucleotídeos. As enzimas NPP 1 e NPP 3 metabolizam a molécula de ATP em AMP + P<sub>Pi</sub> e a molécula de ADP em AMP + Pi (Cappellari et al., 2012) de maneira mais eficiente do que a NPP 2 (Gijbers et al., 2003). Esta última possui preferência por substratos fosfolípidos, 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 possui 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**



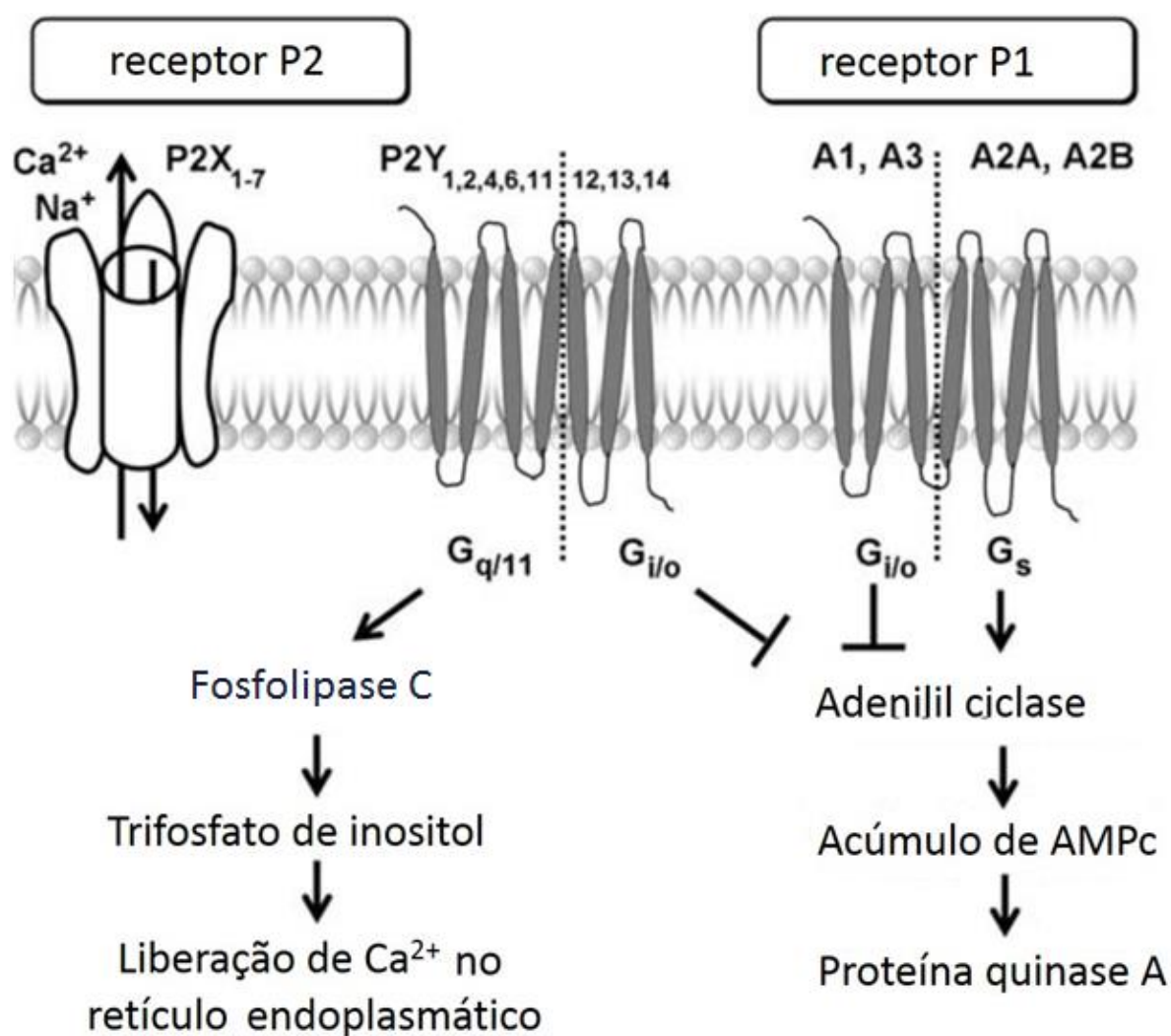
Legenda: O ATP liberado, por exemplo, por exocitose vesicular do terminal nervoso simpático, atua como cotransmissor em receptores purinérgicos P2X e P2Y. ADP e adenosina são gerados através da atividade de ecto-nucleotidasas ativando receptores P2Y e P1, respectivamente. A liberação de ATP pode também 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  $\text{Ca}^{2+}$ , sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). O subgrupo P2Y é um receptor metabotrópico, acoplado a proteína G e sua ativação promove a alteração dos níveis de AMPc e  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  na dependência do acoplamento à proteína G ( $G_s$ ,  $G_i$  ou  $G_q/11$ ). 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	$A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3$		$P2X_{1-7}$	$P2Y_1, P2Y_2, P2Y_4, P2Y_6,$ $P2Y_{11}, P2Y_{12}, P2Y_{13}, P2Y_{14}$
Efeitores	$IP_3, Ca^{2+}, AMPc$		$Ca^{2+} > Na^+ > K^+$	$IP_3, Ca^{2+}, DAG, AMPc$

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 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 imunohistoquímica 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](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 NFκB 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<sup>2+</sup> /ATPase activity. *Anal Biochem.* 1986; 172:9-15.

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

Grobber 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-acetyltransferase 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 endothelial 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, Sévigny 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.