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

Orientadora: Profª. Drª. Zulma Felisbina da Silva Ferreira

SÃO PAULO

2016

Ficha Catalográfica

Dargenio-Garcia, L

Efeito da estimulação purinérgica sobre a produção de melatonina por macrófagos da linhagem RAW 264.7. – São Paulo, 2016. 62 p.

Dissertação (Mestrado) –

Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. ATP. 2. Melatonina. 3. P2X7. I. Ferreira, Zulma Felisbina da Silva. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

COMISSÃO JULGADORA

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr.(a). Orientador

Aos meus pais e a minha irmã, pelo amor incondicional.

Agradecimentos

A Deus por me dar a oportunidade de viver. Aos meus pais pelo esforço imensurável para fazer tudo isso acontecer, a minha pequena engenharia por nunca duvidar que esse sonho seria realidade e ao meu namorado que nunca deixou que eu desanimasse mesmo nos dias mais dificeis.

Aos meus avós que já partiram pelo carinho e criação. Eu sei que vocês estão felizes por isso e presentes aqui de coração.

A professora, doutora e amiga Cristiane Lopes por acreditar na minha capacidade e me confiar “a sua casa”. É com grande orgulho que eu carrego o nome do Laboratório de Cronofarmacologia nessa dissertação, assim como você fez anos atrás. Obrigada por ser um exemplo de pesquisadora e carregar um coração tão grande no peito. Foi isso que fez de mim a profissional que sou.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório por todo ensinamento. Em especial os que ja seguiram outros caminhos Du, Kika, Marina, Marco e Victória...E aos que continuam juntos: Michelle, Débora Ruiva, Eli, Priscilla, Débora, Edu, Débora Técnica e Lu. Eu não tenho como agradecer todo apoio de vocês. Obrigada pelos conselheiros, tanto de bancada como os de mesa de bar.

O meu muito obrigada também ao Professor Pedro, a Gabi Kinker, a Stephanie, Ewerton, Ray e Luis. Vocês me ajudaram de bom coração, com todo carinho e atenção, principalmente na reta final. A conclusão deste trabalho tem a dedicação e o tempo que vocês me doaram e que foram essenciais. Serei sempre grata.

As professoras Zulma e Regina pela oportunidade de realizar esse trabalho, por toda sabedoria, por todas as lições e principalmente por toda paciência de ensinar.

E, por fim, ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio finaceiro.

Lista de abreviaturas e siglas

µM - micromolar

5-HT - serotonina

5-HTP - 5-hidroxitriptofano

AA-NAT - arilalquilamina N-acetiltransferase

AC - adenilil ciclase

ADP - adenosina 5'difosfato

AMP - adenosina 5’monofosfato

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

ANOVA - análise de variância

ASMT - acetilserotonina O-metiltransferase

ATP - adenosina 5'-trifosfato

Ca^{2+} - ion cálcio

CREB – elemento responsivo ao Amp ciclíco

DAPI – 4’,6’-diamidino-2-fenilindol

DNA - ácido desoxirribonucléico

E-NPPs - ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDases - ecto-nucleosídeo-trifosfato-difosfohidrolases

epm - erro padrão da média

FITC - isotiocianato de fluoresceína

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-18 – interleucina 18

IP3 - trifosfato de inositol

LPS – Lipopolissacarídeo

NAS - N-acetilserotonina

NFKB – fator de transcrição KB

NTPDase - nucleosídeo--trifosfato--difosfohidrolases

PBS – fosfate buffer saline

PKA - proteína quinase dependente de AMPc

PKC - proteína quinase dependente de cálcio

PLA - foslolipase A

PLC - fosfolipase C

QR2- quinona redutase 2

TAD – domínio de transativação

TNF – fator de necrose tumoral

TPOH - enzima triptofano hidroxilase 1

TRL – receptores do tipo Toll Like

UDP - uridina-5'-difosfato

UTP - uridina-5'-trifosfato

Indice

INTRODUÇÃO 12

1 MELATONINA 12

1. 1 A PRODUÇÃO RITMICA DE MELATONINA 12

1.2 A PRODUÇÃO EXTRA PINEAL DE MELATONINA 14

1.3 RECEPTORES DE MELATONINA 14

1.4 A MELATONINA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO: O EIXO – IMUNE PINEAL 15

2 O SISTEMA PURINÉRGICO 19

2.1 OS RECEPTORES PURINÉRGICOS 20

2.2 O RECEPTOR P2X7 22

2.2 O SISTEMA PURINÉRGICO E A MELATONINA 23

OBJETIVOS 26

MATERIAIS E MÉTODOS 28

CÉLULAS MURINAS DA LINHAGEM RAW 264.7 28

DOSAGEM DE MELATONINA 28

IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DA ENZIMA AA-NAT E ASMT 28

ENSAIO DE FAGOCITOSE 29

ANÁLISE ESTATÍSTICA 30

DROGAS E REAGENTES 31

RESULTADOS 33

1. *EFEITO DA ESTIMULAÇÃO PURINÉRGICA SOBRE A PRODUÇÃO DE MELATONINA EM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7* ... 33
2. *EFEITO DA ESTIMULAÇÃO PURINÉRGICA SOBRE AS ENZIMAS AA-NAT E ASMT EM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7.* 34
3. *ESTUDOS DOS RECEPTORES P2 ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELATONINA EM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7.* 38
4. *EFEITO DA ESTIMULAÇÃO PURINÉRGICA SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7* 41

DISCUSSÃO 45

CONCLUSÕES 53

REFERÊNCIAS 55

RESUMO 61

ABSTRACT 62

“Quem pensa por si mesmo é livre.”

(Renato Russo)

INTRODUÇÃO

1 Melatonina

1.1 A produção ritmica de melatonina

A melatonina foi primeiramente isolada e identificada por Lerner el 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 útlima 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).

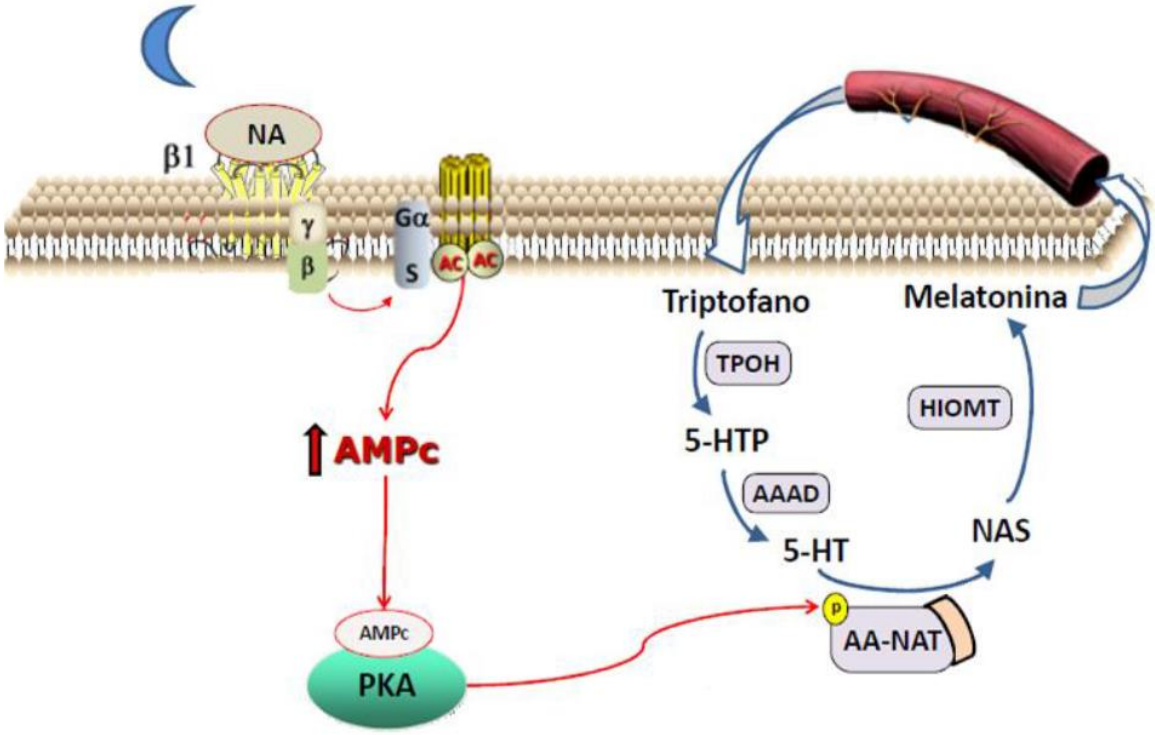


Figura 1 – Produção noturna de melatonina pela glândula pineal. Durante a fase de escuro, a estimulação β1-adrenérgica leva a ativação da subunidade α da proteína Gs, consequente ativação de adenilil ciclase e PKA que fosforila CREB, promovendo sua dimerização e ligação com o cofator CBP. Esse complexo migra para o núcleo e promove a transcrição gênica da enzima AA-NAT. Essa enzima então se liga a chpaerona 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-Viccoet 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 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, ondecada 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 hematopoieticas da médula 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 el al., 2001) o que, consequentemente, dificultaria a montagem da resposta inflamatória visto a importância do recrutamente 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 homologo (RHD), o qual é responsável pela dimerização e ligação ao DNA (Ghoshet 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 homo 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 NFKB 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, consequentemente, aumentando também a fagocitose das partículas de zimosan (Pires-Lapa et al., 2013).

Com todos os dados apresentados, nosso grupo propos 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 NFKB 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).

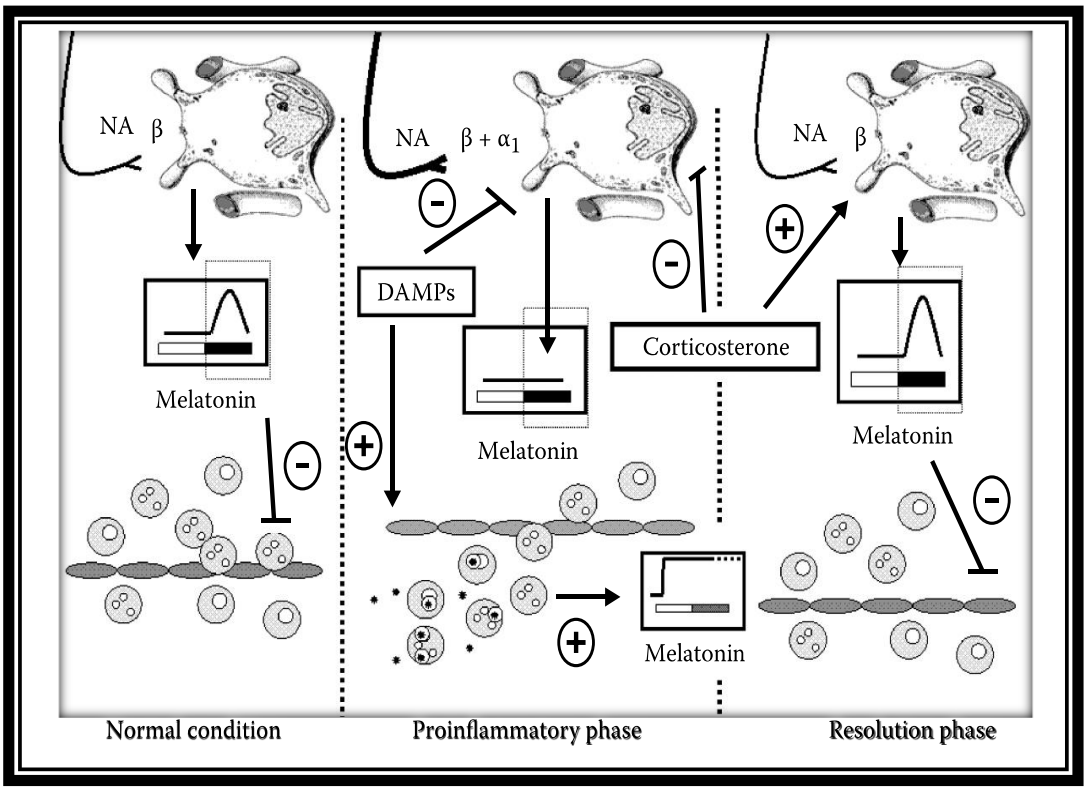


Figura 2 - Teoria do Eixo Imune Pineal. Durante condições fisiológicas, a glândula pineal produz melatonina de forma ritmica durante a fase de escuro. Essa melatonina é liberada na corrente sanguinea e age diminuindo o rolamento e a adesão de leucócitos. Em condições pró inflamatórias, a produção de 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 serie de "cross-talks" de vias de segundos mensageiros. Assim, por exemplo, alterações na expressão de óxido nítrico, citocinas ou NFKB 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 móleculas, 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 responsavel 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 familías das ecto-nucleosídeo-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 proteina 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_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; IP3- trifosfato de inositol; AMPc- adenosina monofosfato cíclica; DAG- diacilglicerol

Os receptores P2Y apresentam 8 subtipos clonados e caracterizados farmacologicamente ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$). Estes receptores quando estimulados ativam numerosas cascatas de sinalização associadas com várias enzimas como fosfolipase C (PLC), adeniliciclase, guanililciclase, proteínas quinases, fosfodiesterases (Erbet al., 2006) e controle de canais iônicos. Estas cascatas de sinalização intracelular regulam reações celulares como liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático com subseqüente ativação de sensores intracelulares de Ca^{2+}, 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 (Ca^{2+} >> Na^{+} > K^{+}) através da membrana plasmática, resultando numa despolarização e aumento na concentração intracelular de 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 efetoras 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 secundo 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 acumulo 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-1B 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-1B é um fator chave na defesa contra infecções primárias.

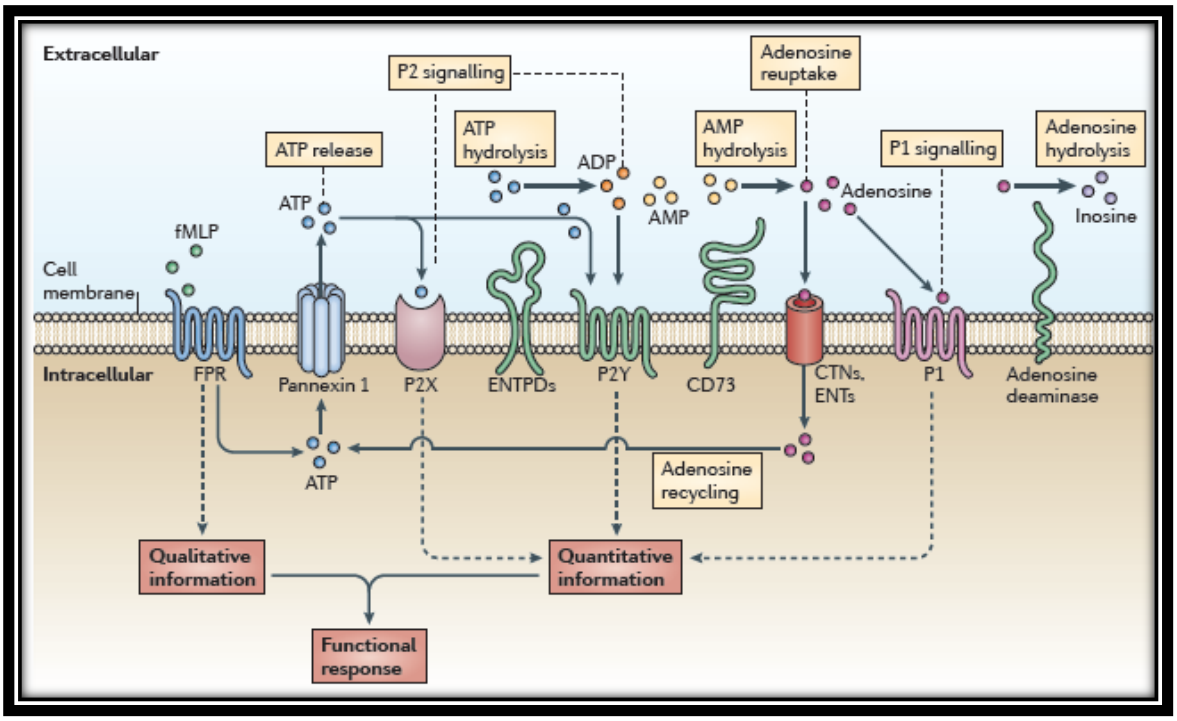


Figura 3 - Esquema representativo da sinalização purinérgica. (retirada Junger, 2011)

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 $P2Y_1$ 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 β1.

O efeito potencializador observado na NAS é mediado pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} 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.

OBJETIVOS

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do ATP sobre a produção de melatonina por macrófagos da linhagem RAW 264.7. Para isto, verificamos:

1. A produção de melatonina induzida pela estimulação com ATP em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.
2. O efeito do ATP sobre as enzimas AA-NAT e ASMT, enzimas chave na produção da melatonina.
3. Qual receptor purinérgico estaria envolvido na produção de melatonina.
4. O efeito do ATP sobre a atividade fagocítica dessas células.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Métodos

Células murinas da linhagem RAW 264.7

Foram utilizadas células murinas da linhagem RAW 264.7 como modelo experimental. Estas células são macrófagos murinos que foram mantidos em cultura em condições constantes de 37º C, 5% CO2, em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina.

Dosagem de Melatonina

Para a dosagem de melatonina, primeiramente macrófagos em cultura (2 x 10^6 células/poço) foram estimulados com ATP (1 ou 3mM) por 1, 2 ou 3 horas. Tendo obtido o tempo ótimo de estimulação, foi realizada uma curva dose resposta de ATP (0,01 mM – 3 mM).

Em outra série de experimentos, os macrófagos em cultura foram pré tratados por 30 minutos com os antagonistas suramina (10^{-5}) e A438079 (10^{-6}) e então estimulados com ATP (3mM).

As dosagens do hormônio foram realizadas através do kit comercial de ELISA (IBL, Hamburg, Germany) conforme especificações do fabricante.

Imunofluorescência para detecção da enzima AA-NAT e ASMT

Para verificar a imunoreatividade da proteína AA-NAT na sua forma total, células RAW 264.7 em cultura (10^5 células/poço) foram estimuladas com ATP (1mM ou 3mM) por 5, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos.

Para verificar a imunorreatividade da forma forsforilada da enzima AA-NAT, as células foram estimuladas com ATP (1mM ou) por 5, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos.

Em outra série de experimentos, a cultura de células foi pré tratada por 30 minutos com os antagonistas suramina (10^{-5}M) e A438079 (10^{-6}M) e depois estimuladas com ATP (3mM).

Para verificar a imunoreatividade da proteína ASMT, as células em cultura (10^5 células/poço) foram incubadas com ATP (1mM ou 3mM), por 1 ou 2 horas.

Após os protocolos de estimulação, as células foram fixadas com metanol:acetona (1:1, 15 min. -200C), permeabilizadas com saponina (1%, 10 min., temperatura ambiente) e incubadas com anticorpo de coelho anti-AA-NAT total, anti-fosfo-AA-NAT ou anti-ASMT (1:200, overnight a 40C). Posteriormente, incubou-se com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200, 1h, temperatura ambiente, câmara escura). Para a marcação do núcleo celular, usou-se DAPI (1:1000, 5 min, temperatura ambiente).

As lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência no microscópio Zeiss Axio Scope A1 instrument (Zeiss Axio Vision 4.8 software,Berlin, Germany). Imagens aleatórias foram obtidas de três campos por poço, com parâmetros iguais para todas as fotos. Para quantificar a intensidade da fluorescência relativa foi usado o software ImageJ.

Ensaio de Fagocitose

Para verificar a atividade fagocítica, as células da linhagem RAW 264.7 (2 x 106 células/poço) foram incubadas com ATP (1mM, 3h). Após esse períodos, as células

foram incubadas com partículas zimosan conjugadas com ao reagente fluorescente FITC (6 x 10^6 partículas/poço, particulas conjugadas com FITC, 90 minutos).

Em outra série de experimentos, as células da linhagem RAW 264.7 (2 x 10^6 células/poço) foram previamente tratados com o antagonista luzindol (1uM) por 30 minutos, depois estimuladas com ATP (1mM, 3h). Após esse períodos, as células foram incubadas com partículas zimosan conjugadas com ao reagente fluorescente FITC (6 x 10^6 partículas/poço, particulas conjugadas com FITC, 90 minutos).

Após o periodo de estimulação, os poços foram lavados três vezes com PBS, as células foram retiradas dos poços por raspagem e colocadas em tubo eppendorf, sendo resuspensas em PBS e incubadas com PAF 4% (1h, 4C). Em seguida os tubos foram centrifugados (10 minutos, 1500 rpm, 4C). As células foram resuspensas em PBS (50uL) e levadas imediatamente para leitura no citometro de fluxo acoplado a microscópio de fluorescência (Amnis, Millipore, Seattle, USA). Foi usado o laser 488 para excitação do fluoróforo no canal 2.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste “t” de Student quando apresentavam somente dois grupos e por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para análise de três grupos ou mais. As amostras foram consideradas significantemente diferentes quando apresentaram $p<0,05$.

Drogas e Reagentes

- A438079 – Tocris Bioscience (Bristol, UK)

- Adenosina 5'-trifosfato (ATP) - Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

- Álcool etílico - Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

- Antibióticos estreptomicina e penicilina - Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA).

- Anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao fluoróforo FITC – Invitrogen Life Technology (Carlsbad, USA).

- Anticorpos anti-AA-NAT, anti-fosfo-AA-NAT e anti-ASMT – Imuny (Campinas, São Paulo, Brasil).

- DAPI - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)

- Kit de melatonina - IBL (Hamburg, Germany)

- Luzindol - Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, Texas, USA)

- Meio de cultura RPMI – Invitrogen Life Technology (Carlsbad, USA)

- Partículas de zimosan conjudagas com FITC – Invitrogen Life Technology (Carlsbad, USA).

- Soro Fetal Bovino - Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA).

- Suramina – Bayer (Leverkusen, Germany)

RESULTADOS

Resultados

---

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

Inicialmente foi realizada uma curva de tempo de produção de melatonina, onde a cultura de macrófagos foi estimulada com ATP (1mM ou 3mM) nos tempos de 1, 2 ou 3 horas.

Ao ser utilizar um 1mM de ATP foi detectada a produção de melatonina em altas concentrações já com 1 hora de estimulação, sendo seu pico de produção detectada após 2 horas e mantendo-se nos mesmos niveis após 3 horas (Figura 4A).

Ao ser utilizada a concentração de 3mM de ATP, foi observado que o pico de produção de melatonina acontece logo em 1 hora, mantendo-se nas horas seguintes.

A partir deste dado, foi selecionado o periodo de 3 horas para realizar a curva dose-resposta do ATP frente a produção de melatonina. Com isso foi observado que a produção de melatonina ocorre de maneira dependente da dose apresentando uma IC_{50} de 630uM (95% IC: 375 – 1055uM) (Figura 4B).

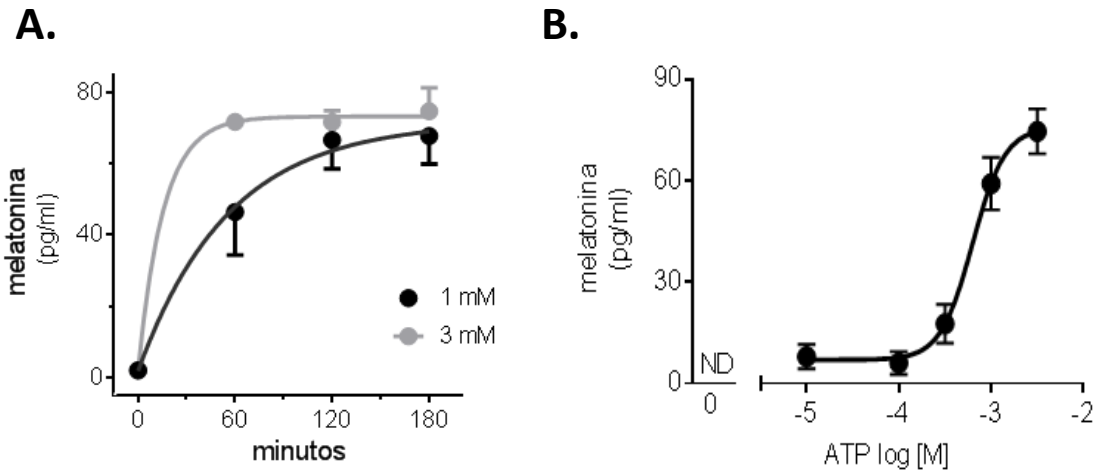


Figura 4 – Produção de melatonina induzida por ATP em macrófagos da linhagem RAW 264.7. A) Decurso temporal. Células RAW 264.7 em cultura (2.10^6 células por poço) foram estimuladas com ATP (1 mM) por 60, 120 e 180 minutos . **B)** Curva concentração-efeito de ATP (0,01 – 3mM, 3h). O ensaio foi realizado com a incubação das células RAW 264.7 (2.10^6 células por poço) na presença de ATP nas concentrações indicadas por três horas. Os dados representam a média ± e.p.m. de 3 a 5 poços por ponto.

2. *Efeito da estimulação purinérgica sobre as enzimas AA-NAT e ASMT em macrófagos da linhagem RAW 264.7.*

Após verificar que a estimulação com ATP é capaz de induzir a produção de melatonina em macrófagos da linhagem RAW 264.7, fomos investigar um possivel mecanismo do ATP sobre a expressão das enzimas AA-NAT e ASMT, enzimas chaves na via biossintética deste hormônio.

Na análise da imunorreatividade da AA-NAT na sua forma total, observou-se que o ATP modula sua expressão de forma dependente do tempo e da dose. Na presença de 1mM de ATP nota-se um aumento após 30 minutos de estimulação, com um pico de expressão aos 45 minutos seguido de uma posterior retorno aos valores basais em 1 e 2 horas (Figura 5A).

Na presença de 3mM de ATP foi observado uma antecipação deste fenomeno, ou seja, o aumento na imunorreatividade da AA-NAT na sua forma total se deu logo após os primeiros 5 minutos de estimulação purinérgica. Esse aumento se manteve em todos os pontos seguintes observados (Figura 5A).

O efeito tempo-dependente observado na imunorreatividade da enzima AA-NAT na sua forma total após estimulação com ATP também foi observado no estudo da forma fosforilada desta enzima.

Na presença de 1mM de ATP, após 1 hora, evidenciou-se um aumento na imunorreatividade da forma fosforilada da AA-NAT. Esse aumento foi seguido de um retorno aos niveis basais após 2 horas (Figura 5B).

Após 1 hora de estimulação, ATP (3mM) levou ao mesmo aumento na imunorreatividade da AA-NAT fosforilada observado na presença de ATP (1mM) (Figura 5C).

Após verificar que a estimulação com ATP altera a imunorreatividade da enzima AA-NAT, tanto na forma total como na forma fosforilada, fomos verificar se a molécula ATP era também capaz de alterar a imunorreatividade da enzima ASMT, enzima esta responsavel pela conversão de NAS em melatonina.

Os resultados mostram que há um aumento na imunorreatividade da enzima ASMT na presença de 1mM de ATP, após 1 hora. Após 2 horas, a imunorreatividade desta enzima retorna aos niveis basais. Na presença de 3mM de ATP, nenhum aumento na imunorreatividade desta enzima foi detectado nos tempos observados (Figura 5D).

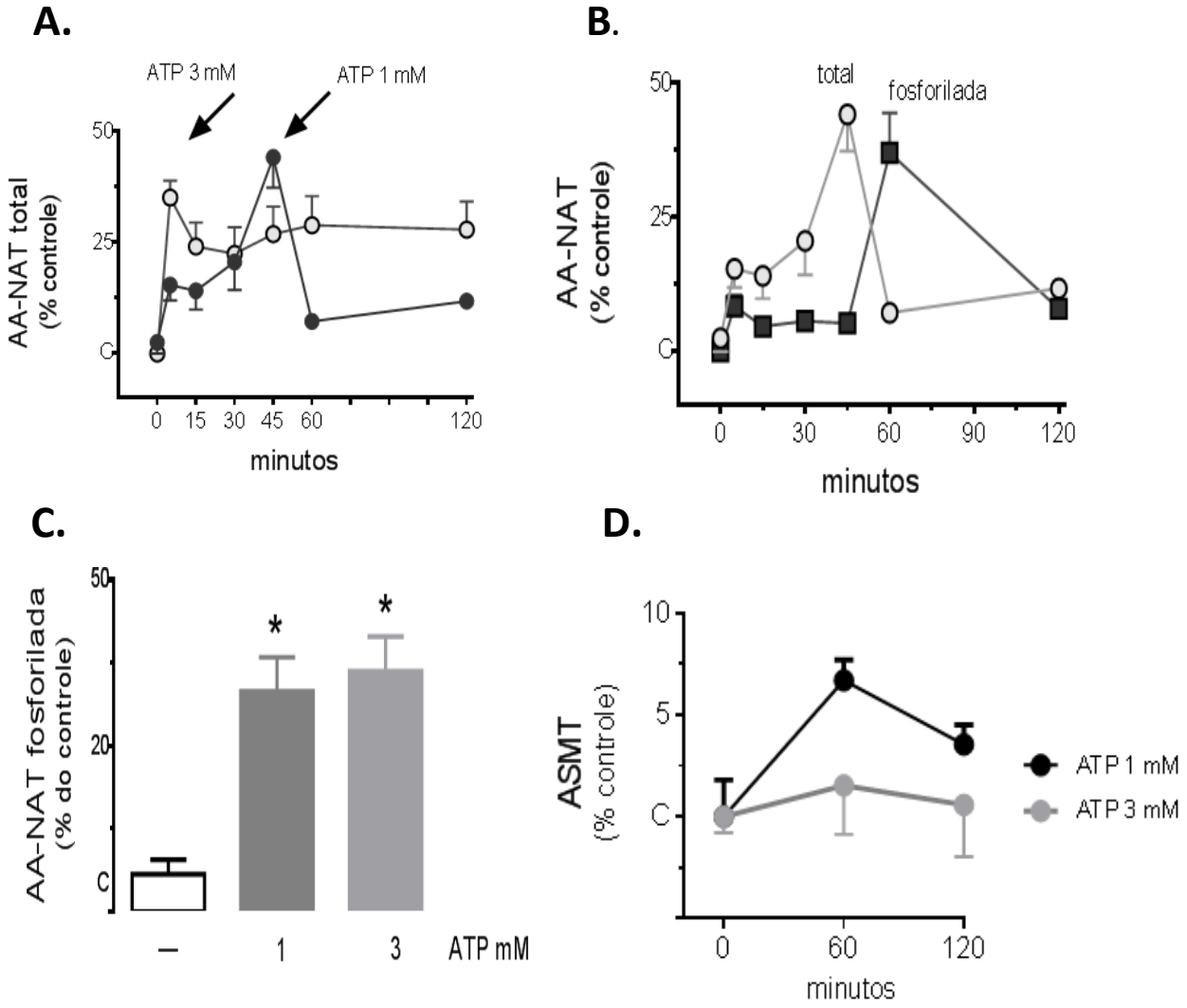
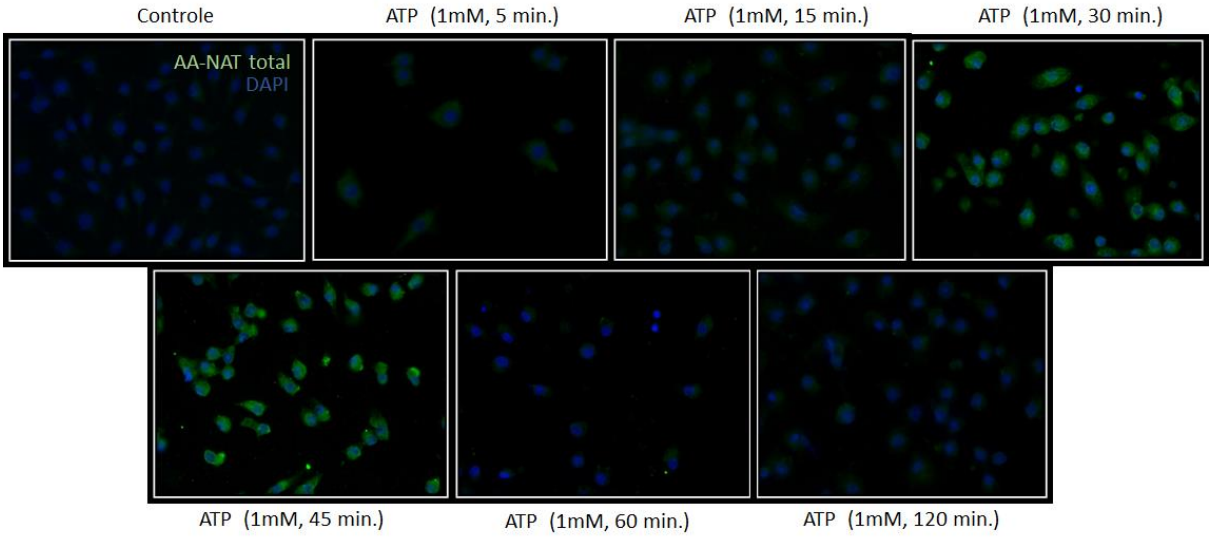
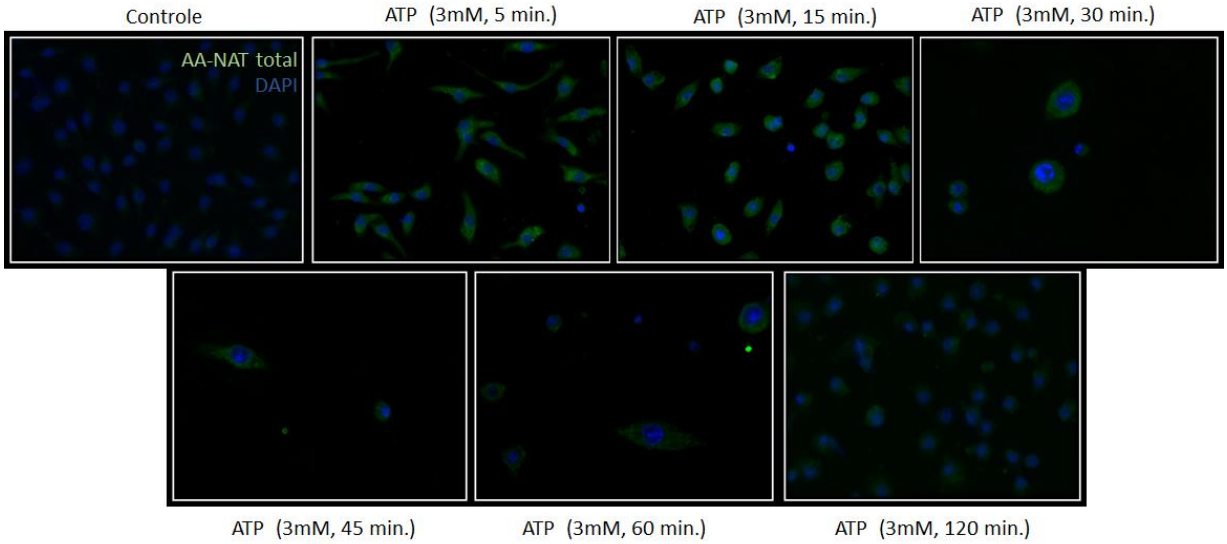
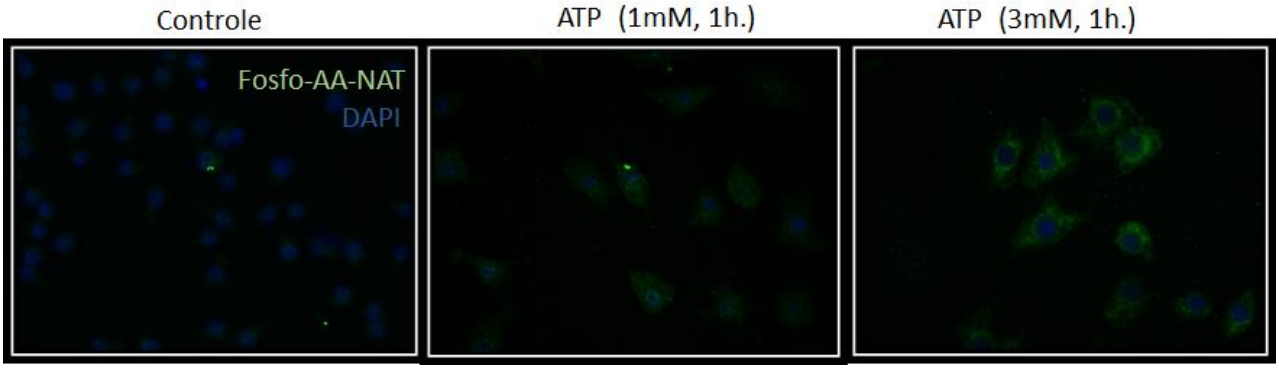


Figura 5 – Efeito da estimulação com ATP sobre as enzimas AA-NAT e ASMT. A) Decurso temporal da imunorreatividade da enzima AA-NAT total. O ensaio foi realizado com a incubação das células RAW 264.7 (1.10^5 células por poço) na presença de ATP (1 ou 3mM). **B)** Decurso temporal da imunorreatividade da forma fosforilada da enzima AA-NAT. O ensaio foi realizado com a incubação das células (1.10^5 células por poço) com ATP (1Mm). **C)** Imunorreatividade da enzima AA-NAT fosforilada. As células (1.10^5 células por poço) foram incbadas com ATP (1 ou 3Mm, 1h). **D)** Imunorreatividade da enzima ASMT. O ensaio foi realizado com a incubação das células de linhagem (10^5 células por poço) estimuladas com ATP (1 ou 3 mM, 60 OU 120 minutos)Em cada ponto, pelo menos 20 células de três experimentos distintos foram contadas. Os dados representam a média ± e.p.m.


Controle
ATP (1mM, 5 min.)
ATP (1mM, 15 min.)
ATP (1mM, 30 min.)
AA-NAT total
DAPI
ATP (1mM, 45 min.)
ATP (1mM, 60 min.)
ATP (1mM, 120 min.)


Controle
ATP (3mM, 5 min.)
ATP (3mM, 15 min.)
ATP (3mM, 30 min.)
AA-NAT total
DAPI
ATP (3mM, 45 min.)
ATP (3mM, 60 min.)
ATP (3mM, 120 min.)


Controle
ATP (1mM, 1h.)
ATP (3mM, 1h.)
Fosfo-AA-NAT
DAPI

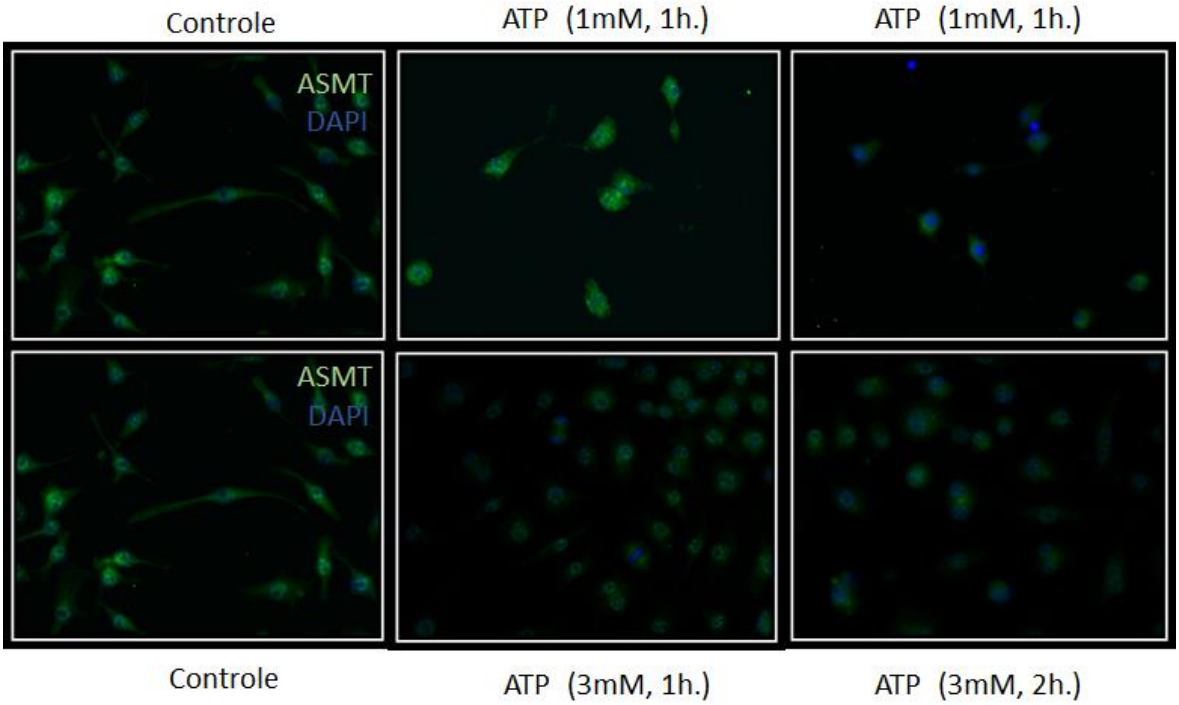


Figura 6 – Imagem representativa do efeito da estimulação purinérgica sobre as enzimas AA-NAT e ASMT. O ensaio foi realizado com a incubação das células RAW 264.7 (1.10^5 células por poço) com ATP (1 ou 3mM).). As imagens da fluorescência celular foram obtidas no microscópio Zeiss Axio Scope A1 instrument.

3. *Estudos dos receptores P2 envolvidos na indução da produção de melatonina em macrófagos da linhagem RAW 264.7.*

Tendo em vistas a alta concentração de ATP envolvida na indução da produção de melatonina nestas células, foi utilizado inicialmente utilizado o antagonista A438079, antagonista este seletivo para o receptor P2X7, pois esse receptor é o único receptor purinérgico que também apresenta a caracteristica de só ser ativado frente a altas concentrações de ATP.

Os resultados mostram que o conteúdo de melatonina está diminuido na cultura de macrófagos que foi previamente incubada com A438079 em relação a cultura que foi incubada somente com ATP (3mM) (Figura 7A).

Afim de continuar o estudo em relação a modulação da via biossintetica de melatonina, foi utilizado novamente o antagonista A438079 para verificar se ocorreria o bloqueio também da expressão da enzima AA-NAT na sua forma fosforilada. As células foram pré tratadas por 30 minutos com o antagonista e posteriormente desafiadas com ATP (3mM, 1h).

A análise da intensidade de fluorescência realizada através do Programa Image J demonstra que na presença do antagonista A438079 ocorre o bloqueio do aumento da imunorreatividade da forma fosforilada da enzima AA-NAT induzida por ATP (3mM) após uma hora (Figura 7B)

A partir desta análise, sugerimos que a produção de melatonina seja induzida pela ativação do receptor P2X7 porém, afim de verificar se algum outro receptor P2 seria capaz de modular o processo de produção de melatonina foi utilizado um segundo antagonista, a suramina, sendo este um antagonista inespecífico de receptores P2.

Na presença de suramina, notamos um aumento ainda maior no conteúdo de melatonina frente as células que foram tratadas somente com ATP (3mM). O mesmo aumento foi observado em relação a imunorreatividade da enzima AA-NAT na sua forma fosforilada (Figura 7C e 7D).

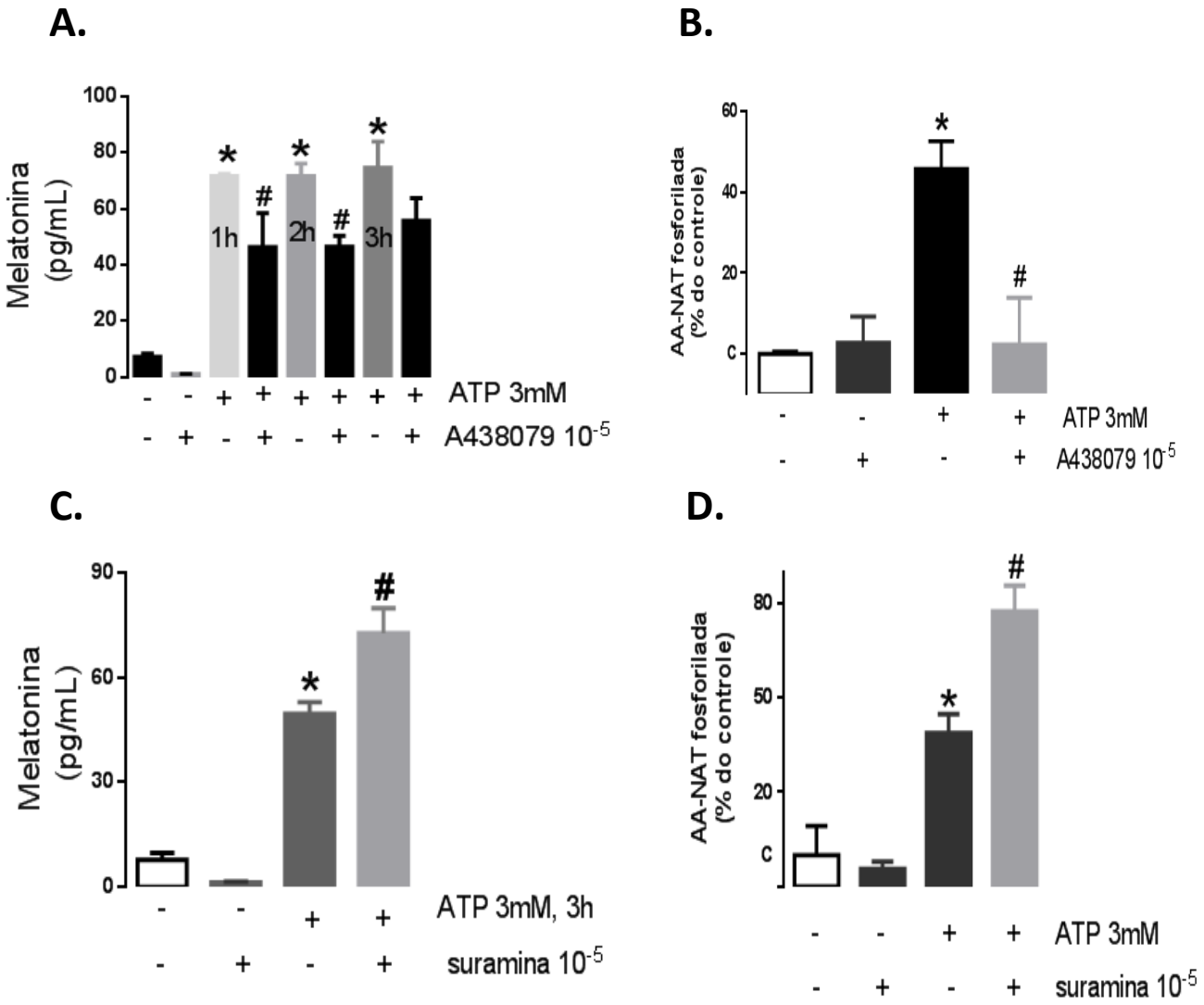


Figura 7 – Efeito dos antagonistas suramina e A438079sobre a produção de melatonina e sobre a expressão da enzima fosfo–AA-NAT. A) As células foram previamente incubadas com o A438079 (10^{-6}, 30min) e depois estimuladas com ATP (3mM, 1 ou 2h). Os dados representam a média ± e.p.m. de 2 poços por ponto**. B)** O ensaio foi realizado com a incubação das células de linhagem (10^5 células por poço) estimuladas com ATP (3 mM, 1 h) na presença ou na ausência prévia do A438079 (10^{-6}). Em cada ponto, pelo menos 20 células de três experimentos distintos foram contadas. Os dados representam a média ± e.p.m. **C)** As células foram previamente incubadas com suramina (10^{-5}, 30min) e depois estimuladas com ATP (3mM, 3h). Os dados representam a média ± e.p.m. de 2 poços por ponto**. D)** O ensaio foi realizado com a incubação das células de linhagem (10^5 células por poço) com ATP (3 mM, 1 h) na presença ou na ausência prévia do antagonista suramina (10^{-5}). Em cada ponto, pelo menos 20 células de três experimentos distintos foram contadas. Os dados representam a média ± e.p.m.

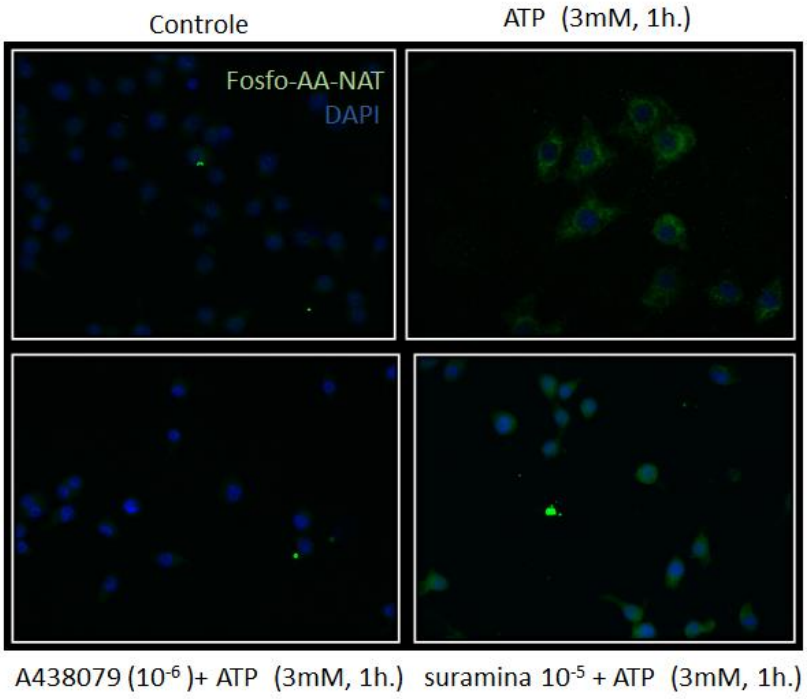


Figura 8 – Imagem representativa do efeito da estimulação purinérgica na ausência ou na presença de bloqueadores de receptores purinégicos sobre a expressão da enzima fosfo–AA-NAT em cultura de células RAW 264.7. Os antagonistas suramina (10^{-5}) ou A438079 (10^{-6}) foram previamente incubados por 30 minutos e a seguir as células foram estimuladas por ATP (3mM, 1 h). As imagens da fluorescência celular foram obtidas no microscópio Zeiss Axio Scope A1 instrument.

4. *Efeito da estimulação purinérgica sobre a atividade fagocítica de macrófagos da linhagem RAW 264.7*

Depois de verificar que o ATP é capaz de aumentar tanto a expressão da enzima AA-NAT como ASMT e com isso induzir a produção de melatonina, fomos verificar se a melatonina produzida pela estimulação com ATP era capaz de induzir o aumento da fagocitose como visto anteriormente pelo nosso grupo frente ao estimulo com LPS ou zimosan (Muxel et al., 2012 e Pires-Lapa et al., 2013). Para isso, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram pré tratadas com luzindol (1uM, 30min) e depois com ATP (1mM, 3h). A seguir, foram estimulados com particulas de zimosan fluorescentes por 90 minutos. Após esse período, as células foram levadas ao citometro de fluxo Amnis

onde 12 mil células foram contadas e a fluorescência verificada através da excitação da mesma pela laser 488 (Figuras 9).

Ao incubar os macrófagos da linhagem RAW 264.7 com ATP (1mM, 3 horas), foi observado que o número de células que fagocitam 2 ou mais particulas de zimosan aumenta depois de 90 minutos de incubação com as particulas (Figura 10A).

Quando essas mesmas células são pré tratadas com luzindol (1uM, 30 min) e desafiadas com ATP (1mM, 3h) e depois por 90 minutos com particulas de zimosan, o que vemos é que o aumento induzido por ATP no número de células que fagocitam duas ou mais particulas de zimosan é bloqueado (Figura 10B).

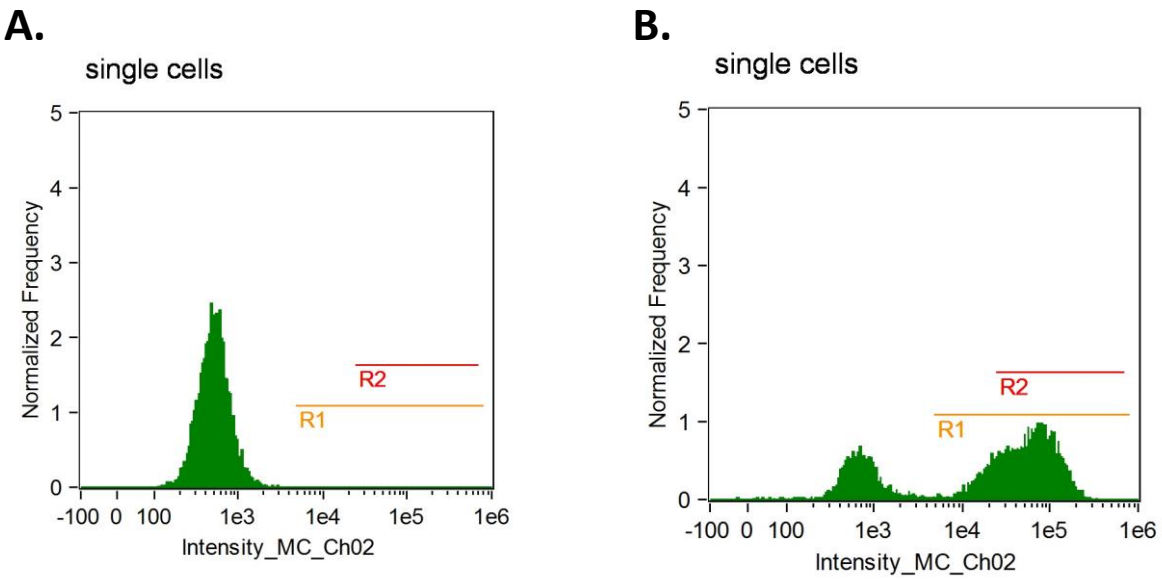


Figura 9 – Parametros utilizados para selecionar as células positivas para a fagocitose de zimosan. Na figura A verificamos a auto fluorescência da célula no canal 2. Na figura B verificamos a fluorescência devido a fagocitose de zimosan. As células presentes na região R2 foram escolhidas para análise por apresentarem mais fluorescência, o que indica a fagocitose de duas ou mais partículas. Essas células foram consideradas positivas para fagocitose.

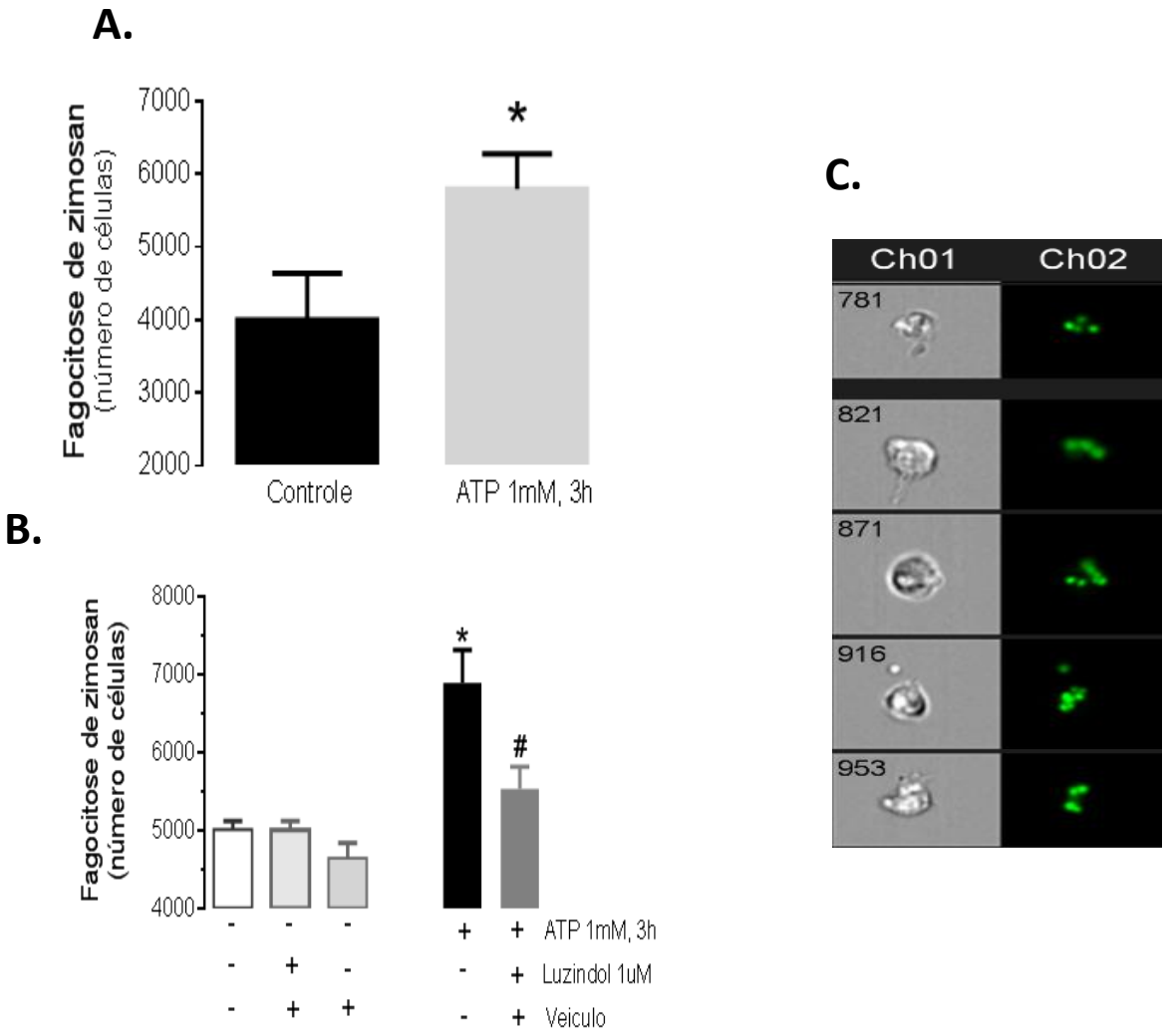


Figura 10 – **Efeito do ATP e do luzindol sobre a fagocitose de particulas de zimosan**. **A)** Células da linhagem RAW 264.7 foram incubadas com ATP (1mM, 3h) e depois estimuladas com particulas de zimosan (6x 10^6 particulas por poço, 90min). **B)** Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram pré incubados com luzindol (1uM, 30min), depois desafiados com ATP (1mM, 3h) e posteriormente estimulados com particulas de zimosan (6x 10^6 particulas por poço, 90min). A fluorescência foi excitada pelo laser 488 e verificada no canal 2 do citometro de fluxo acoplado a microscópio de fluorescência (Amnis, Seattle, USA). Três experimentos distintos foram realizados onde, pelo menos, duas amostras foram lidas a cada experimento. Por amostra, 12 mil células foram lidas. Os dados representam a média ± e.p.m. **C)** Imagem representativa da fagocitose.

DISCUSSÃO

Discussão

A inflamação é um processo fisiológico que está envolvido em várias doenças e é um grande alvo no desenvolvimento de novas terapias. A resposta inflamatória clássica começa com o reconhecimento de patógenos ou de dano através dos chamados PAMPs (padrão molecular associado a patógeno) e DAMPs, respectivamente (padrão molecular associado a dano) (Adamson E Leitinger, 2014). Esses sinais de perigo induzem a expressão de genes e citocinas que desencadeiam a montagem da fase pró inflamatória da resposta.

O ATP, em condições de higidez, se encontra em altas concentrações dentro das células mas em baixas ou quase nulas concentrações no meio extracelular, sendo que a presença desta molécula em concentrações altas no meio extracelular é uma forte mensagem de perigo e iniciadora da resposta inflamatória (Di Virgilio, 2003). Logo, o ATP extracelular é um importante DAMP para o sistema imunológico, sendo capaz de ativar respostas associadas à inflamação, como a ativação do inflamassoma (Gombault et al., 2013), translocação de NF-kB (Ferrari et al., 1997; Liu et al., 2011), e o aumento do infiltrado celular (Corriden et al., 2012).

Em relação a melatonina, dados da literatura mostram que a presença deste hormônio no local da injúria, entre outras coisas, reduz o estresse oxidativo (Tamura et al., 2006; Beni et al., 2003;) diminui a expressão de NO e iNos (Gilad et al., 1998) e em linfócitos e monócitos humanos aumenta a produção de IL-2 e IL-6 (Garcia-Maurino et al., 2000).

Por isso esse trabalho teve como principal objetivo investigar se a estimulação com ATP era capaz de induzir a produção de melatonina em macrófagos da linhagem RAW 264.7.

Para isso, foi realizada uma curva dose-resposta de ATP afim de verificar a produção de melatonina. Observou-se que somente as concentrações de 1mM e 3mM de ATP são capazes de induzir a produção deste hormônio e, na presença da concentração mais alta, o pico de produção deste hormônio ocorre mais rapidamente.

Em relação a enzima AA-NAT, o ATP nas concentrações de 1 e 3mM, é capaz de induzir um aumento em sua imunorreatividade tanto em sua forma total como em sua forma fosforilada, sendo que a concentração de 3mM induz o aumento da AA-NAT total de forma mais rápida. Em células RAW 264.7, a ativação dessa enzima foi demonstrada por PAMPs, como LPS (Muxel et al., 2012) sendo um diferencial neste trabalho a ativação desta enzima por um sinalizador endógeno.

Classicamente, o receptor P2X7 distingue-se dos demais receptores purinérgicos por ser o único que demanda concentrações superiores a 300uM para ser ativado (Khkakh et al., 2001; Donnelly-Roberts e Jarvis 2007, Donnelly-Roberts et al., 2009), enquanto os demais receptores P2 são ativados com concentrações inferiores a 100uM de ATP (Khakh et al., 2001). Com isso, esses foram os primeiros indicios de que a produção de melatonina seria dependente da ativação do receptor P2X7, visto que só altas concentrações de ATP foram capazes de modular a via biossintetica deste hormônio.

O adiantamento da síntese de melatonina e da expressão da enzima AA-NAT na sua forma total mediados por concentrações ainda mais elevadas de ATP (3mM) também sugerem a participação desse receptor. Dados da literatura apontam que mediante um estímulo mais potente e/ou prolongado, a resposta dependente de P2X7 é acentuada (Browne et al., 2010; Young, 2010), e que permite, além da passagem de ions, o tréfego de moléculas de alto peso molecular (Sperlágh et al., 2006; Burnstock, 2007).

Para verificar se a hipótese da ativação do receptor P2X7, e consequentemente a produção de melatonina, era verdadeira, foi utilizado o antagonista especifico A438079, com o qual demonstramos que tanto a melatonina induzida por ATP como o aumento na imunorreatividade da enzima AA-NAT na forma forforilada são dependentes da ativação do receptor P2X7.

Apesar de ser um receptor inotrópico, a sinalização do receptor P2X7 pode ocorrer por múltiplas vias, inclusive ativando PKC, o que é comumente atrelado a vias metabotrópicas (Bradford e Soltoff, 2002; Wiley et al., 2011). Dados da literatura mostram também que os efeitos observados pela ativação dos receptores P2X podem ser modulados pela ativação de receptores P2Y e vice-versa. Esse mecanismo já foi demostrado em relação a liberação de glicose por células HIT-T15 (Lee et al., 2088) e na liberação de noradrenalina em ducto deferente de ratos (Queiros et al., 2003).

Com isso, e afim de verificar se outros receptores P2 poderiam estar modulando a sinalização observada nas células RAW 264.7 em relação a sintese de melatonina dependente do receptor P2X7, foi utilizado o anatagonista suramina,

clássico bloqueador inespecífico de receptores P2 (Abbracchio et al., 2006; Khakh et al., 2001;).

O pré tratamento dos macrófagos RAW 264.7 com suramina levou a um aumento ainda maior na produção de melatonina do que o verificado somente com ATP. O mesmo resultado foi verificado para a expressão da enzima AA-NAT fosforilada: o bloqueio inespecífico de receptores P2 com suramina aumentou ainda mais a imunorreatividade desta enzima frente as células que foram tratadas somente com ATP.

Uma hipótese é que esse efeito inibitório seria gerado a partir da ativação dos receptores $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$ ou $P2Y_{13,}$ visto que esses são os únicos receptores P2 acoplados a proteína $G_{i,}$ e agiria como uma alça de feedback negativa e autócrina nessas células.

Ou seja, quando as concentrações de ATP diminuissem sinalizando o fim da resposta inflamatória, esse outro recceptor seria ativado inibindo a ação do P2X7. Com isso, teriamos a inibição da produção de melatonina e o “desligamento” desta célula.

Frente a esses resultados, podemos hipotetizar que em macrófagos da linhagem RAW 264.7, o receptor P2X7 exerce um efeito positivo na via biossintética da melatonina, enquanto outro receptor purinérgico estaria exercendo um papel negativo sobre a mesma via. Efeitos duais da estimulação purinérgica são descritos pela literatura. Por exemplo, a liberação de TNF induzido por LPS em astróticos é aumentada mediante baixas concentrações de ATP, enquanto é diminuída quando mediante estímulo com um 1mM dessa purina (Kucher and Neary, 2005).

A partir destes dados, concluimos que a produção de melatonina em macrófagos da linhagem RAW 264.7 é induzida pela ativação do receptor P2X7, que modula a expressão das enzimas AA-NAT e ASMT na produção deste hormônio .

Dentre os receptores P2X, o receptor P2X7 é o predominantemente expresso nas células imunes porém a ação deste receptor na resposta imunológica é controversa.

Já foi demostrado que na tuberculose a ativação deste receptor leva a formação de macrófagos gigantes multinucleados sendo este um passo importante para o controle da doença (Falzoni el al., 2005), que a ativação deste receptor é importante também na eliminação de patógenos intracelulares (Coutinho-Silva, 2012) e até mesmo em pacientes com cancer de mama pois pacientes que apresentam mutação para o gene do P2X7 apresentam maior risco de progressão e metastase da doença (Ghiringhelli el al., 2009).

Por outro lado, a participação do receptor P2X7 na polarização de células T efetoras realizada por células dendríticas contribui para a indução e manutenção da inflamação crônica, sensibilização em doenças alérgicas como a asma e até mesmo rejeição a transplantes (Muller, 2001).

Podemos concluir também que, apesar da diferença observada na modulação da enzima AA-NAT total e ASMT dependente da dose de ATP, sugerimos que essas diferenças não influenciam na produção de melatonina após um longo periodo pois a quantidade deste hormônio produzida ao fim de três horas é igual para as duas concentrações (1 e 3mM).

Neste trabalho a enzima AA-NAT na sua forma fosforilada parece ser a enzima limitante da via biossintetica, diferentemente da glândula pineal onde o ATP modula tanto a expressão gênica como proteica na enzima ASMT e ela passa a ser a enzima limitante na produção de melatonina frente a este estimulo (Souza-Teodor et al., 2016).

A partir do momento que essa melatonina está sendo produzida, fomos investigar um possivel papel fisiológico para esse hormônio. Dados anteriores do nosso grupo mostram que macrófagos da linhagem RAW 264.7 fagocitam mais quando na presença de melatonina (Muxel et al., 2012; Pires-Lapa et al., 2013). Para testar se isso aconteceria também na presença de ATP, as células foram incubadas com essa molecula e a fagocitose foi aumentada.

Na presença de ATP, o número de células que fagocitam particulas de zimosan aumenta, mostrando uma eficiência maior nesse processo. Para testar se esse feito era mediado pela melatonina produzida, as células foram pré tratadas com luzindol, antagonistas dos receptores MT1 e MT2, e depois estimuladas com ATP. Observamos que o aumento induzido por ATP no número de células que fagocitam é bloqueado na presença do luzindol. Esses dados confirmam que a melatonina produzida age de maneira autocrina e paracrina nessas células sinalizando para uma melhor resposta frente ao agente agressor.

Interessantemente, a fagocitose de partículas não opsonizadas, como as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, por células monocíticas é mediada pelo receptor P2X7 (Gu et al., 2010).

De acordo com os resultados inéditos obtidos, podemos sugerir que a ativação do receptor P2X7 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 apresenta um papel importante na montagem da resposta inflamatória, uma vez que a sua ativação culmina na produção de melatonina, o que promove maior eficiência na fagocitose.

Corroboramos com os dados literatura que mostram que o ATP age como um importante sinal de perigo, levando a célula mais rapidamente a um estado ativado. Deste modo, este trabalho abre novas perspectivas sobre os mecanismos envolvidos na ativação e modulação da resposta inflamatória pois mostramos, pela primeira vez, que um sinal endógeno sozinho é capaz de ativar o Eixo Imune – Pineal.

CONCLUSÕES

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 especifico 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

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-kappaBb 50. 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-Delgadillo 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-κB) 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 imune 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 NFkappaB 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. Endrocrine 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-κB 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 κB (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-κB 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, Verkhratsky A.Purinergic transmission in the central nervous system. Pflugers Arch. 452(5):479-85, 2006.

North RA, Verkhratsky A. Purinergic transmission in the central nervous system.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrange 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, Verkhratsky 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 melatoninrhythm: 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 9:625–636.

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. Perifericamente, 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 demostrado também que esse efeito é mediado pelo receptor P2X7 e que a melatonina produzida age autocrina e paracrinamente aumentando a fagocitose de particulas 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 serotonina 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 synthes. 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,