



FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO TEMPORAL NO CATABOLISMO DO
ATP EXTRACELULAR: POSSÍVEL MODULAÇÃO
NORADRENÉRGICA**

BERNARDO CARRARO DETANICO

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO TEMPORAL NO CATABOLISMO DO
ATP EXTRACELULAR: POSSÍVEL MODULAÇÃO
NORADRENÉRGICA**

BERNARDO CARRARO DETANICO

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Médicas, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas.**

Porto Alegre

2010

“Get up, stand up: don't give up the fight!
Make way for the positive day.”

Marley, Bob

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Iraci Lucena da Silva Torres pela disposição, sugestões, críticas, preocupação, ensinamentos e pelo constante incentivo na busca do conhecimento científico.

À Professora Doutora Ana Maria Oliveira Battastini, chefe do Laboratório 22 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelo apoio e confiança. Também agradeço pela ajuda e paciência nos trabalhos realizados em seu laboratório

Ao Professor Doutor Wolnei Caumo pela ajuda e ensinamentos imprescindíveis para a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Maria Paz Loayza Hidalgo pelas sugestões e críticas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas pesquisadoras e doutorandas Liciane Fernandes Medeiros e Joanna Ripoll Rozisky, cujo auxílio direto em várias etapas da pesquisa permitiu a realização deste estudo. Muito obrigado.

Aos amigos do Laboratório 22, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos divertidos e engraçados. Muito obrigado.

À CAPES, pela concessão da bolsa. Também agradeço aos órgãos de fomento CNPq e FINEP que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha mãe Ligia Beatriz Carraro Detanico, ao meu pai Alexandre Antônio Detanico, ao meu irmão Fernando Carraro Detanico e ao meu sobrinho Leonardo Costa Meireles Detanico pelo grande amor e incentivo pelo meu trabalho em busca de meu ideal e felicidade. Muito obrigado.

Aos funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Marta, Fabíola e Everaldo pelo ajuda durante o curso. Muito obrigado.

Agradeço à minha esposa, Camila Menegon Detanico, pela paciência e muito carinho. Esta Dissertação é dedicada a você. Te amo muitão e muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO DA LITERATURA.....	7
1. Os Ritmos Biológicos.....	7
2. Marcadores do Ritmo Circadiano.....	12
3. O Sistema Purinérgico.....	17
OBJETIVOS.....	27
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	28
ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	38
Artigo 1. “24-Hour Temporal Pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum”.	
Artigo 2. “A physiological level of Norepinephrine increases adenine nucleotides hydrolysis in rat blood serum”.	
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	73
ANEXOS.....	74
1. Outros trabalhos realizados durante o mestrado.....	74

RESUMO

Os ritmos circadianos estão presentes em um grande número de organismos, proporcionando uma organização temporal de processos fisiológicos e comportamentais a fim de promover uma efetiva adaptação do organismo às mudanças ambientais. O ATP e seus produtos de degradação, o ADP, o AMP e a adenosina podem atuar como mensageiros extracelulares em uma série de processos biológicos, e estão envolvidos em uma variedade de condições patológicas, incluindo isquemia, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, depressão e câncer. O ATP extracelular, bem como os demais nucleotídeos de adenina, podem ser hidrolisados pela ação das enzimas nucleotidases incluindo as NTPDases e a 5'-nucleotidase, que são consideradas as principais reguladoras da sinalização purinérgica no sangue. O presente trabalho avaliou a possível existência de um padrão temporal nas atividades das enzimas responsáveis pela metabolização destes nucleotídeos, e se estas enzimas poderiam estar sendo moduladas pela melatonina, corticosterona ou norepinefrina, que claramente apresentam robustos padrões circadianos. A hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP foram significativamente maiores durante o ciclo escuro quando comparada com o ciclo claro. Além disso, nós demonstramos que as atividades ATPásica e ADPásica são sensíveis a uma concentração fisiológica de norepinefrina em experimentos *in vitro* e *in vivo* em soro de ratos. Este estudo sugere a existência de um padrão temporal na hidrólise do ATP e do ADP, que pode ser fisiologicamente importante para o funcionamento normal do organismo. Além disso, a norepinefrina pode modular estas atividades enzimáticas, provocando uma diminuição das concentrações de ATP e ADP circulantes.

ABSTRACT

Circadian rhythms are present in a large number of organisms, representing an important mechanism for preparing the organism to environmental changes. ATP and its breakdown products, ADP, AMP and adenosine can act as extracellular messengers in a range of biological processes through the binding to purinergic receptors, and are involved in a variety of pathological conditions including ischaemia, neurodegenerative, depression, cardiovascular and cancer diseases. Extracellular adenine nucleotides are metabolized to adenosine by a number of enzymes including NTPDases and 5'-nucleotidase that are considered to be the major regulators of purinergic signaling in blood. This study evaluated the possible existence of a temporal pattern of enzymatic activities responsible for metabolism of these nucleotides, and its possible modulation by melatonin, corticosterone or norepinephrine, which clearly show robust circadian patterns. The hydrolysis of ATP and ADP nucleotides were significantly higher during the dark cycle when compared with light cycle. Furthermore, we demonstrated that ATPase and ADPase activities are sensitive to a physiological concentration of norepinephrine in *in vitro* and *in vivo* experiments in rat blood serum. This study suggests the existence of a temporal pattern of ATP and ADP hydrolysis, which may be physiologically important for normal functioning of the body. Moreover, the norepinephrine may modulate these enzymatic activities, causing a decrease in the circulating levels of ATP and ADP.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

ADP: Adenosina 5'-difosfato

AMP: Adenosina 5'-monofosfato

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica

GABA: Ácido γ -amino butírico

HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferase

HPA: Hipotálamo-pituitária-adrenal

NAT: Serotonina-N-acetiltransferase

NTPDase: Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

NSQ: Núcleos supraquiasmáticos

SNS: Sistema nervoso simpático

ZT: Zeitgeber time

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos principais mecanismos do sistema temporizador circadiano em mamíferos.....	10
Figura 2. Diagrama dos principais mecanismos de controle da síntese de melatonina.....	14
Figura 3. Potencial ativação dos receptores de nucleotídeos (receptores P2) e de adenosina (receptores P1).....	19
Figura 4. Estruturas dos membros da família das enzimas NTPDases.....	21
Figura 5. Estrutura da enzima (ecto)-5'-nucleotidase.....	22

INTRODUÇÃO

A cronobiologia é a ciência que estuda a organização temporal dos seres vivos, descobrindo e conhecendo os fenômenos relacionados aos ritmos biológicos. A organização temporal é compreendida como a capacidade dos seres vivos de expressarem comportamentos e eventos fisiológicos de uma forma repetitiva e periódica. A ritmicidade biológica pode ser definida como a expressão cíclica de um fenômeno biológico. Os ritmos são constantes, apresentam uma origem genética, são regulados por relógios biológicos endógenos e estão sob influências ambientais externas. A existência de um sistema temporizador biológico é fundamental para a adaptação do organismo, permitindo uma organização temporal dos eventos biológicos em função das necessidades. Ou seja, é fundamental para preparar o organismo para uma mudança ambiental, como por exemplo: antecipar uma mudança no meio interno através da secreção de um determinado hormônio. Além disso, a expressão de um ritmo biológico pode ser fundamental para garantir uma determinada função como os batimentos cardíacos e a respiração. O sistema temporizador circadiano controla vários processos biológicos, tais como: os ciclos de atividade/repouso, atividades cardiovascular e respiratória, sistema endócrino, temperatura corporal, entre outros.

Assim, a fisiologia e a bioquímica dos seres humanos sofrem variações temporais circadianas, e por isso, a intensidade dos sintomas de muitas doenças crônicas apresenta horários precisos e previsíveis durante as 24 horas. Além disso, a perturbação do sistema temporizador biológico pode levar ao desequilíbrio hormonal, doenças psiquiátricas, desordens do sono, doenças cardiovasculares e aumento do risco de câncer. Portanto, o sistema de temporização tem um papel fundamental na sobrevivência dos organismos, estando presentes em todos os níveis de organização dos seres vivos desde os organismos mais simples até os seres evolutivamente mais complexos.

Alguns estudos sugerem uma variação temporal circadiana em elementos do sistema purinérgico, além de uma influência purinérgica sobre o relógio biológico. A sinalização purinérgica participa não somente de processos rápidos como neurotransmissão, neuromodulação, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária e dor, mas também processos de proliferação, de diferenciação e de apoptose em uma ampla variedade de tecidos. Uma variedade de enzimas hidrolisa os nucleotídeos extracelulares através da defosforilação sequencial e completa do ATP pela ação conjunta de enzimas denominadas “nucleotidasas” que incluem: entre outras, as NTPDases e a 5'-nucleotidase, ampla e profundamente estudadas nos últimos anos. Estas enzimas exercem um papel fundamental nos organismo, à medida que podem regular uma variedade de estados fisiológicos incluindo função cardíaca, secreção hormonal, respostas imunes, neurotransmissão e agregação plaquetária, através da modulação dos níveis circulantes de nucleotídeos no sangue.

As variações diurnas nas atividades destas enzimas, como a 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase, responsáveis pelo metabolismo da adenosina, foram estudadas em diferentes regiões do encéfalo, incluindo regiões reguladoras do ciclo atividade/repouso, e verificou-se que exibem variações diurnas em suas atividades, embora não em todas as regiões estudadas. Outros estudos observaram um padrão circadiano da atividade enzimática da 5'-nucleotidase no soro.

Considerando o relevante papel dos ritmos biológicos e da sinalização purinérgica para a biologia dos seres vivos, o presente trabalho avaliou a possível existência de um padrão circadiano temporal nas atividades das enzimas responsáveis pela metabolização de nucleotídeos de adenina em soro de ratos. Além disso, foi investigado se este padrão temporal poderia estar sendo modulado pela melatonina, corticosterona ou norepinefrina, que claramente apresentam robustos padrões circadianos.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Os Ritmos Biológicos

A cronobiologia é a ciência que estuda padrões regulares da ritmicidade biológica e da interação desta com o ambiente. Esta ciência investiga a forma pela qual os seres vivos respondem às variações temporais e como os organismos são capazes de sincronizar as suas atividades a estas mudanças (Markus et al., 2003). A organização temporal dos seres vivos pode ser expressa como uma reação a estímulos ambientais externos aos quais os organismos estão submetidos, que resultará em alterações importantes sobre os ritmos endógenos, promovendo ajustes através de mecanismos biológicos específicos (Menna-Barreto, 2003). Muitos eventos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais expressos pelos organismos vivos apresentam ritmicidade e ocorrem com periodicidades de aproximadamente 24 horas (Moser et al., 2006a). Tais ritmos biológicos são referidos como circadianos (do Latim "*circa diem*", que significa "cerca de um dia"). Porém, nos organismos também estão presentes ritmos com períodos inferiores a 20 horas conhecidos como ritmos ultradianos (por exemplo: respiração, batimentos cardíacos, disparos de neurônios, etc.) e ritmos cujo período é superior a 28 horas e são denominados ritmos infradianos (ciclo menstrual, ciclo sazonal climático, reprodução, etc.) (Marques, 2003).

Ritmos circadianos em processos fisiológicos e comportamentais estão presentes em uma ampla variedade de organismos incluindo desde as bactérias até os mamíferos (Aguzzi et al., 2006). Para que exista esta ritmicidade circadiana é necessário que uma estrutura atue como um marcapasso capaz de gerar oscilações de aproximadamente 24 horas. Marcapassos podem ser definidos como osciladores primários, que exibem um padrão oscilatório geneticamente determinado, auto-sustentado, endógeno, mesmo na ausência de pistas temporais externas (Markus et al., 2003). Em mamíferos, o principal marcapasso circadiano, também chamado de

relógio biológico, são os núcleos supraquiasmáticos (NSQ), compostos por aglomerados de neurônios no hipotálamo (Markus et al., 2003). A base de funcionamento deste relógio biológico esta sob controle genético e depende da interação de múltiplos mecanismos de retroalimentação (feedback) positiva e negativa envolvendo proteínas e fatores de transcrição. Em mamíferos, o principal mecanismo molecular envolvido nas oscilações circadianas é composto principalmente pelos genes Clock, Bmal1, Cry e Per. Os genes Clock e Bmal1 formam um heterodímero, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes Per (Per1 - Per3) e Cry (Cry1 e Cry2). Os mRNAs dos genes Per e Cry são traduzidos no citoplasma para formação das proteínas Per e Cry. No citoplasma os monômeros Per1 e Per2 são fosforilados pela caseína cinase 1-epsilon e formam oligômeros com os monômeros Cry1 e Cry2. Esse complexo é transportado para o núcleo, onde bloqueiam sua própria transcrição ao inibir a ação de Clock/Bmal1, formando um sistema de autorregulação (Okamura et al., 2002; Ko et al., 2006). Outro mecanismo regulatório é induzido pelo heterodímero Clock/Bmal1 que ativa a transcrição de Rev-erb α , que reprime o processo de transcrição de Bmal1. As respostas a estas oscilações gênicas ocorrem por vias eferentes neurais e humorais (Richter et al., 2004). A eferência neural para os órgãos periféricos inclui o sistema nervoso autonômico principalmente via sistema nervoso simpático através da conexão dos NSQ à coluna intermediolateral da medula (Bartness et al., 2001). A melatonina é responsável pela eferência humoral. Sua síntese é realizada pela glândula pineal através dos neurotransmissores norepinefrina e ATP originários do gânglio cervical superior (um gânglio simpático). Os NSQ apresentam um papel fundamental em coordenar uma grande variedade de ritmos neuroendócrinos na medida em que lesões nestes núcleos geram transtornos de secreção destes fatores humorais incluindo perda dos ritmos secretórios do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), dos glicocorticóides (Moore e Eichler, 1972;

Meyer-Bernstein et al., 1999; Szafarczyk et al., 1983) e do hormônio estimulante da tireóide (Abe et al., 1979).

O ajuste entre o relógio biológico e o meio ambiente (aferência) é realizado por via neural (Markus et al., 2003). Este ajuste ocorre diariamente e é necessário para sincronizar o sistema circadiano ao período de aproximadamente 24 horas (Hofstra e de Weerd, 2008). Os fatores externos (aferências), conhecidos como sincronizadores ou “zeitgebers” ou ZTs (do alemão, Zeit=tempo; geber=dar) são definidos como pistas/dicas exógenas (externas) que sincronizam o sistema temporal endógeno (interno) do organismo. Um poderoso “zeitgeber” é a alternância claro-escuro. Outros zeitgebers incluem temperatura, interação social e comportamento alimentar (Moser et al., 2006b; Smolensky e Peppas, 2007). Estes zeitgebers induzem alterações em componentes moleculares presentes no relógio biológico (NSQ). Por exemplo, a alternância claro-escuro em mamíferos é percebida via retino-hipotalâmica que informa aos NSQ as variações claro-escuro. Esta fotorrecepção é realizada pela retina por células especializadas, conhecidas como cone, bastonetes e células ganglionares. As células ganglionares contêm moléculas de melanopsina que estão presentes em células que se projetam diretamente para os NSQ. Assim, além de enviar informações luminosas para o córtex cerebral e formar a visão, a retina envia informações para o relógio biológico, promovendo o ajuste do mesmo (Markus et al., 2003).

Sumarizando, o sistema de temporização dos vertebrados envolve três elementos principais: componentes capazes de perceber pistas/dicas ambientais (aferências), uma estrutura marcapasso de ritmos (relógio biológico, os NSQ), e vias de comunicação neural e hormonal (eferências) das informações para órgãos periféricos e tecidos (Boden e Kennaway, 2006) (Figura 1).

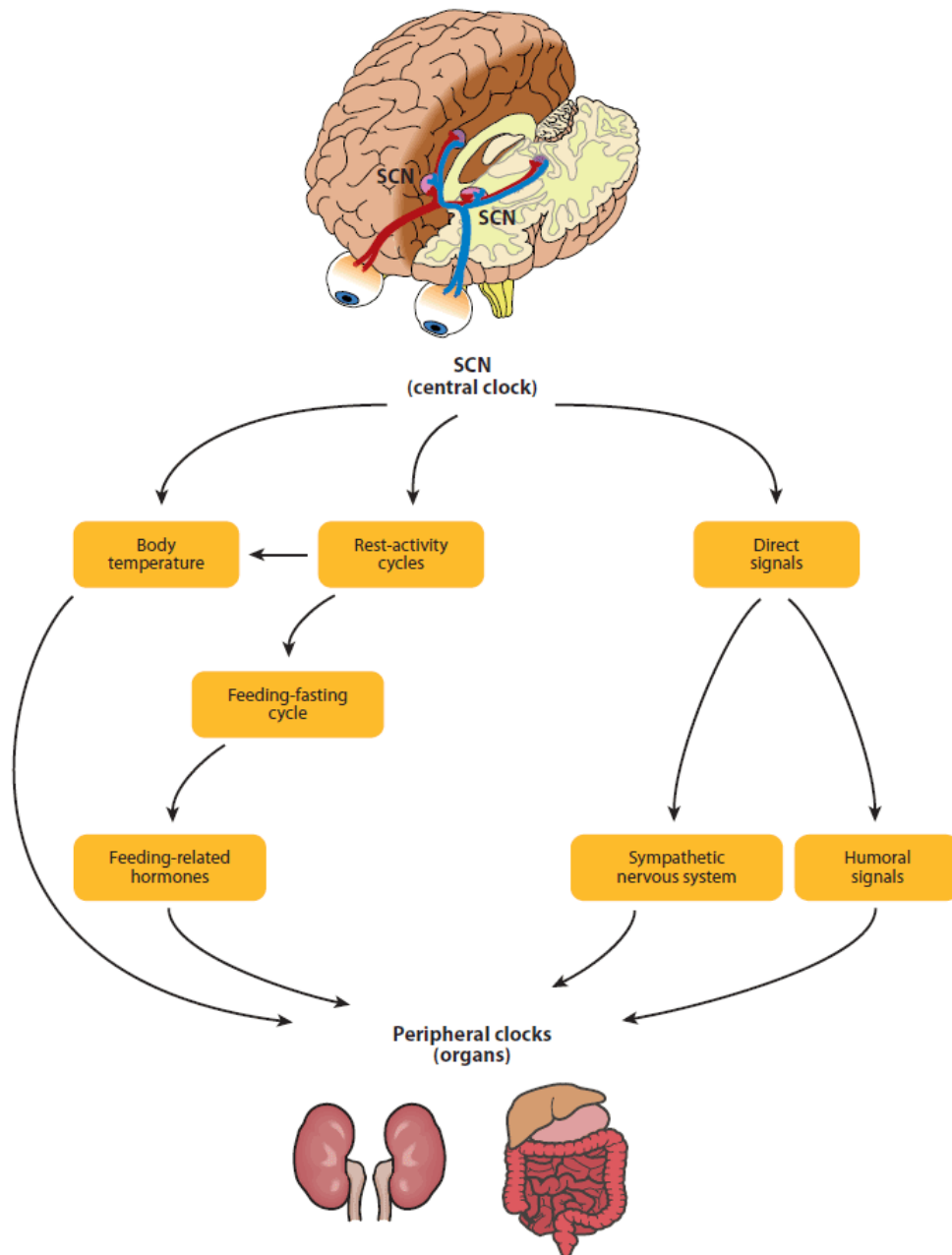


Figura 1. Esquema dos principais mecanismos do sistema temporizador circadiano em mamíferos (Dibner et al., 2010). O ritmo da temperatura corporal, assim como o ciclo atividade/repouso, são influenciados diretamente pelos núcleos supraquiasmáticos. Os núcleos supraquiasmáticos enviam informações aos órgãos e tecidos da periferia através de sinais neurais (sistema nervoso simpático) e humorais. SCN = Núcleos Supraquiasmáticos.

Tem sido proposto que a função do sistema rítmico circadiano é proporcionar uma organização temporal de processos fisiológicos e comportamentais a fim de promover uma efetiva adaptação do organismo às variações ambientais (Moore-

Ede,1986; Hastings et al., 2003). Exemplificando, durante o avanço da noite, o hormônio melatonina é secretado e a temperatura corporal diminui para facilitar o sono, que promoverá a secreção do hormônio do crescimento. Para a preparação física e mental necessárias ao despertar do organismo antes do amanhecer é ativado o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Hastings, 1991).

Fatores relativos ao estilo de vida, como o trabalho noturno ou transtornos de sono, ou exposição a agentes em particular, como a exposição à luz durante a noite, causam transtornos no ritmo circadiano (Czeisler e Klerman, 1999). Trabalhadores noturnos, por exemplo, estão expostos a ciclos claro/escuros não-habituais, resultando em transtornos circadianos no ciclo atividade/repouso, no comportamento alimentar e no ritmo social (Haus e Smolensky, 2006). Estes transtornos circadianos, além de prejudicarem o desempenho do trabalhador, podem induzir alterações em diversos sistemas incluindo o metabolismo de lipídeos e de carboidratos e a secreção de glicocorticóides e do hormônio do crescimento (Haus e Smolensky, 2006). Além disto, estudos epidemiológicos demonstraram que trabalhadores noturnos apresentam um maior risco de desenvolverem doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer (Rüger e Scheer, 2009). Sabe-se que diversos componentes do sistema cardiovascular apresentam um potente ritmo circadiano como, por exemplo, a pressão arterial, a frequência cardíaca, o fluxo sanguíneo, os fatores de coagulação e as funções plaquetárias e endoteliais (Haus, 2007a; Rüger e Scheer, 2009). Diversos estudos apontam que transtornos circadianos que afetem o sistema cardiovascular podem levar a estados de hipercoagulabilidade/trombose ou hipocoagulabilidade/hemorragia (Haus, 2007b), sendo fatores de risco para o desenvolvimento de hipertensão, doença cardíaca coronariana e infarto do miocárdio (Haus e Smolensky, 2006).

Os eventos fisiológicos estão sob controle circadiano e variações circadianas podem levar a doenças. Por exemplo, a ocorrência de incidentes cardiovasculares

incluindo isquemia miocárdica, infarto do miocárdio, morte súbita cardíaca e arritmia ventricular são mais frequentes durante o período matutino, e esta associada com variações circadianas no sistema nervoso simpático, pressão sanguínea, frequência cardíaca, agregação plaquetária, vasodilatação e secreção de cortisol (corticosterona em roedores) (Pepine, 1991; Hastings et al., 2003). Uma meta-análise evidenciou que o risco de infarto agudo do miocárdio e morte súbita cardíaca é maior 40% e 30%, respectivamente, durante o período da manhã (Cohen et al., 1997).

Assim sendo, a cronobiologia tem contribuído para a compreensão dos mecanismos básicos das respostas fisiológicas e comportamentais, principalmente pela inclusão da dimensão temporal. Portanto, existe a necessidade de estudos cronobiológicos para um melhor entendimento a respeito da (pato) fisiologia dos seres vivos.

2. Marcadores do Ritmo Circadiano

Em teoria, todos os ritmos gerados pelo sistema temporizador que são capazes de serem medidos ou avaliados podem ser utilizados para avaliar a fase (um momento determinado de um ciclo), período (duração de um ciclo completo de uma variável rítmica) e amplitude (valor obtido da diferença entre o valor máximo e o mínimo de um ritmo) de ritmos circadianos (Hofstra e Weerd, 2008). No entanto, na prática, dentre as variáveis mais utilizadas estão a temperatura corporal e a produção de melatonina e cortisol (corticosterona em roedores). Os hormônios melatonina e cortisol são robustos marcadores biológicos do marcapasso circadiano central (NSQ), pois atuam como marcadores do sistema de temporização circadiana (Goichot et al., 1998). A utilização destes diminui a possibilidade de que a avaliação de determinado ritmo circadiano possa ser confundida por uma disfunção presente no sistema temporal do organismo.

2.1. Melatonina

As variações rítmicas do relógio biológico (NSQ) são transmitidas para todo o organismo, principalmente via sinalização humoral através do hormônio melatonina, que funciona como um transdutor neuro-endócrino, preparando o organismo para responder às condições da fase escura (Reiter e Hester, 1966). A Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio que apresenta ampla distribuição na natureza, incluindo organismos unicelulares, plantas, animais e humanos. Em vertebrados ela é sintetizada durante o ciclo escuro principalmente pela glândula pineal, e em menor quantidade por tecidos extra-pineal como a retina, trato gastrointestinal, pele, linfócitos e células da medula óssea (Nowak et al., 1998; Pandi-Perumal et al., 2006). Este hormônio é um importante regulador das funções fisiológicas, principalmente na transmissão de informações relativas ao ciclo claro/escuro para a organização da ritmicidade sazonal e circadiana dos diversos eventos fisiológicos e comportamentais (Arendt, 1998).

A produção de melatonina ocorre a partir do triptofano proveniente da corrente sanguínea que com a participação das enzimas triptofano hidroxilase e descarboxilase de aminoácido aromático convertem triptofano a serotonina no pinealócito. A enzima NAT (Serotonina-N-acetiltransferase) apresenta um marcante ritmo diário, atingindo concentrações 100 vezes superiores na fase escura, quando comparado à fase clara. A NAT é a enzima passo limitante da síntese da melatonina, responsável pela conversão de serotonina a N-acetilserotonina. Esta é metilada e convertida a melatonina pela enzima HIOMT (Hidroindol-O-metiltransferase) (Figura 2), que apresenta um papel importante na regulação sazonal da produção de melatonina (Ribelayga et al., 2000). A produção de melatonina é gerada pelos NSQ pela influência do ciclo claro/escuro atuando via trato retino-hipotalâmico. As fibras nervosas da retina captam a luminosidade do ambiente e transmitem essa informação para o NSQ;

durante o dia a retina estimula o NSQ cujos neurônios são inibitórios. Como consequência, os neurônios do núcleo paraventricular deixam de estimular os neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula e a produção de melatonina é baixa durante o dia. Klein et al., (1981) verificou que, durante a noite, ocorre ativação simpática e liberação de norepinefrina juntamente com o ATP que através dos receptores adrenérgicos (α 1 e β 1) e purinérgico (P2Y₁) localizados na superfície dos pinealócitos induzem aumento de cálcio intracelular e AMPc (Adenosina Monofosfato cíclica). O aumento de AMPc, através de ativação da quinase A, é o principal mecanismo regulador da síntese da NAT (Ribelayga et al., 2000).

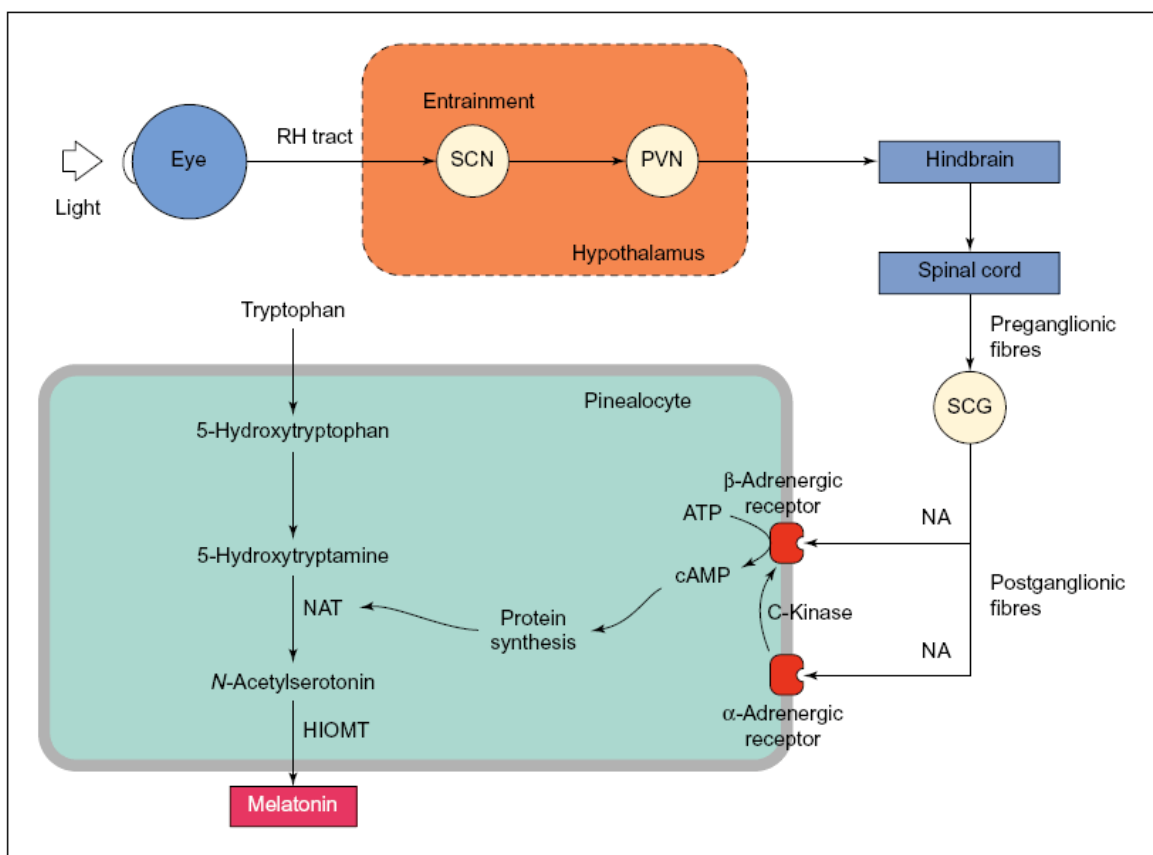


Figura 2. Diagrama dos principais mecanismos de controle da síntese de melatonina (Arendt, 1998). A produção de melatonina é gerada pelos núcleos supraquiasmáticos pela influência da luminosidade do ambiente. Durante a noite ocorre produção de melatonina via ativação simpática. ATP = Adenosina 5'-trifosfato, AMPc = Adenosina

Monofosfato cíclica, HIOMT = Hidroxindol-O-metiltransferase, NA = Norepinefrina, NAT = Serotonina-N-acetiltransferase, PVN = Núcleo Paraventricular, RH = Retino-Hipotalâmico, SCG = Gânglio Cervical Superior, SCN = Núcleos Supraquiasmáticos.

Em espécies de mamíferos, incluindo humanos, os níveis de melatonina na pineal começam a subir gradualmente após a ausência de luz, atingindo valores máximos no meio da noite; depois diminuem lentamente a partir da segunda metade da noite para atingir valores baixos próximo ao início do período claro. Em humanos, os mais altos níveis plasmáticos de melatonina são freqüentemente encontrados entre 2 e 3 horas da manhã (Nowak et al., 1998). A secreção de melatonina é, juntamente com a atividade dos NSQ, um ritmo circadiano que ocorre da mesma forma em espécies noturnas e diurnas. Este ritmo é similar em mamíferos diurnos e noturnos devido à supressão da síntese deste hormônio pela luz (Lewy et al., 1980).

A medida do ritmo da melatonina durante o período de 24 horas é considerado um robusto marcador de fase circadiana (Van Someren e Nagtegaal, 2007). O aumento da produção de melatonina durante o início da noite é usado como um indicador da fase noturna. Além disso, o aumento da melatonina noturna ocorre pela ativação simpática nos pinealócitos, e trabalhos sugerem que a melatonina pode ser um marcador da atividade simpática (Markus et al., 2009; Miller et al., 2001).

A sinalização da melatonina ocorre através de 2 receptores acoplados a proteína G, MT₁ e MT₂ que foram clonados em humanos, e que estão presentes em diversos locais, como: NSQ, cerebelo, córtex, hipotálamo, artérias cerebrais, próstata, rim, adrenais, órgãos linfóides primários e secundários, coração, glândulas mamárias, trato gastrointestinal, entre outros (Delagrange et al., 2003; Macchi et al., 2004). Recentemente foi caracterizado o receptor MT₃ que tem localização intracelular, sendo uma isoforma da enzima quinona redutase 2 (Delagrange et al., 2003).

2.2. Cortisol

Cortisol ou corticosterona é um hormônio glicocorticóide produzido pelo córtex da glândula adrenal e apresenta um robusto ritmo circadiano (Mohawk et al., 2007). O relógio biológico central (NSQ) é um dos responsáveis por gerar esta ritmicidade circadiana, pois através de uma via multisináptica envolvendo os núcleos supraquiasmáticos e as glândulas adrenais as secreções provenientes do eixo HPA apresentam um padrão circadiano (Buijs et al., 1999). Além desta via neural, a produção circadiana de glicocorticóides envolve também a participação dos hormônios ACTH e melatonina (Richter et al., 2008), que da mesma forma apresentam ritmos circadianos. A participação do ACTH na regulação da produção de glicocorticóides é bem conhecida. O ACTH atua em receptores de membrana presentes em células adrenocorticais da glândula adrenal, que geram segundos mensageiros responsáveis pela indução da transcrição de genes envolvidos na produção de glicocorticóides (Elias e Clark, 2000). A ação direta da melatonina sobre a produção de glicocorticóide pela adrenal é controversa. Alguns estudos em ratos sugerem que não exista uma relação evidente entre níveis plasmáticos de melatonina e corticosterona (Hajak et al., 1997; Gromova et al., 1967; Persengiev et al., 1989). Entretanto, outros estudos verificaram a expressão de receptores de melatonina (MT_1) no córtex adrenal em primatas (Torres-Farfan et al., 2003), e que a estimulação destes receptores pela melatonina inibiu a produção de cortisol induzida por ACTH (Torres-Farfan et al., 2003; Campino et al., 2008).

A secreção de glicocorticóide está vinculada à fase de atividade do ritmo atividade/repouso, com níveis plasmáticos máximos coincidentes com o despertar do organismo: manhã para animais diurnos e anoitecer para animais noturnos (Wilkinson, 2008). Em humanos o ritmo circadiano do cortisol (1) atinge o nível máximo nas primeiras horas da manhã; (2) diminui durante o dia até alcançar níveis mínimos e (3)

ocorre um repentino aumento durante a segunda metade da noite (Van Cauter, 1990). Estudo sugere que os níveis máximos e mínimos de cortisol podem ser utilizados no controle de alterações no sistema temporizador circadiano (Van Cauter e Refetoff, 1985).

Em mamíferos, os glicocorticóides apresentam uma grande diversidade de funções, incluindo a regulação do metabolismo de glicose, gordura e proteína, ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, efeitos no humor e em funções cognitivas (Tempel e Leibowitz, 1994; von Zerssen et al., 1987). Em animais noturnos, como os roedores, o aumento dos níveis de corticosterona no final do período de inatividade serve para preparar o animal para um período de atividade, no qual a mobilização de fontes energéticas e o estímulo ao comportamento alimentar são necessários (Verhagen et al., 2004). Da mesma forma, em mamíferos diurnos como os humanos, o nível máximo de cortisol precede o despertar (Van Cauter, 1990). Portanto, as variações circadianas de glicocorticóides, como o cortisol e a corticosterona, são muito importantes para permitir uma rápida adaptação do organismo às mudanças ambientais a fim de manter a homeostase (Mohawk et al., 2007).

Portanto, marcadores do ritmo circadiano, como cortisol e melatonina, podem ser instrumentos muito importantes para estudos clínicos (Mirick e Davis, 2008), pois possibilitam o monitoramento da organização rítmica circadiana dos organismos. Como transtornos de ritmo circadiano podem contribuir para o surgimento de diversas doenças (Rüger e Scheer, 2009), o conhecimento a respeito do status do ritmo circadiano por meio da utilização de marcadores possibilita inferir se um organismo está com seu ritmo circadiano normal ou perturbado com repercussão nos processos de saúde/doença, sendo, portanto, de grande interesse.

3. O Sistema Purinérgico

O conceito de neurotransmissão purinérgica foi introduzido em 1972 (Burnstock, 1972). No entanto, a relevância da adenosina 5'-trifosfato (ATP) extracelular como uma importante molécula sinalizadora, além de seu reconhecido papel no metabolismo energético celular, levou algum tempo para ser aceito (Burnstock, 2006a). Atualmente, a sinalização purinérgica está completamente estabelecida não somente nos efeitos rápidos que incluem entre outros, a neurotransmissão, contração do músculo liso, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária e dor (Ralevic e Burnstock, 1998), mas também em mecanismos que incluem a proliferação, diferenciação e apoptose em uma ampla variedade de tecidos (White e Burnstock, 2006). Sabe-se também que o ATP é co-liberado em vias simpáticas e parassimpáticas juntamente com diversos outros neurotransmissores, tais como: acetilcolina, glutamato, norepinefrina, serotonina, ácido γ -amino butírico (GABA), neuropeptídeo Y e óxido nítrico (Burnstock, 1999; Burnstock, 2004). O ATP pode atuar como neurotransmissor tanto nos neurônios do sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico (Cunha e Ribeiro, 2000; Burnstock, 2007). Além da liberação neuronal como um transmissor ou um co-transmissor, há várias outras fontes de ATP extracelular, incluindo a liberação de ATP por células danificadas ou em processo de morte (Bodin e Burnstock, 2001), ou em resposta à deformação, à hipóxia ou a substâncias como acetilcolina, ATP e trombina as quais não causam danos celulares (Burnstock, 2008).

O ATP juntamente com a adenosina 5'-difosfato (ADP), a adenosina 5'-monofosfato (AMP) e a adenosina, produtos da sua hidrólise, são importantes moléculas sinalizadoras responsáveis por promover múltiplos efeitos biológicos, tais como: neuromodulação, neurotransmissão, e proliferação e crescimento celular (Burnstock, 2008). O sistema purinérgico exerce seus efeitos fisiológicos através dos receptores purinérgicos, que compreendem os receptores ionotrópicos P_2X para ATP (P_2X_{1-7} , permeáveis ao Na^+ , K^+ e Ca^{+2}), os receptores acoplados a proteína-G P_2Y para

ATP/ADP (oito subtipos, $P_2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}$), e finalmente, os receptores acoplados a proteína-G P_1 para adenosina (A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3) (Burnstock, 2006b) (Figura 3). Os receptores purinérgicos são amplamente distribuídos no organismo e estão presentes em diversos órgãos e tecidos, tais como: encéfalo, medula espinhal, coração, pulmão, musculatura lisa, terminais nervosos autônomos, entre outros. Além disso, diversos tipos de células expressam receptores purinérgicos, incluindo astrócitos, plaquetas, células da microglia, epiteliais, endoteliais e imunes (Burnstock, 2008).

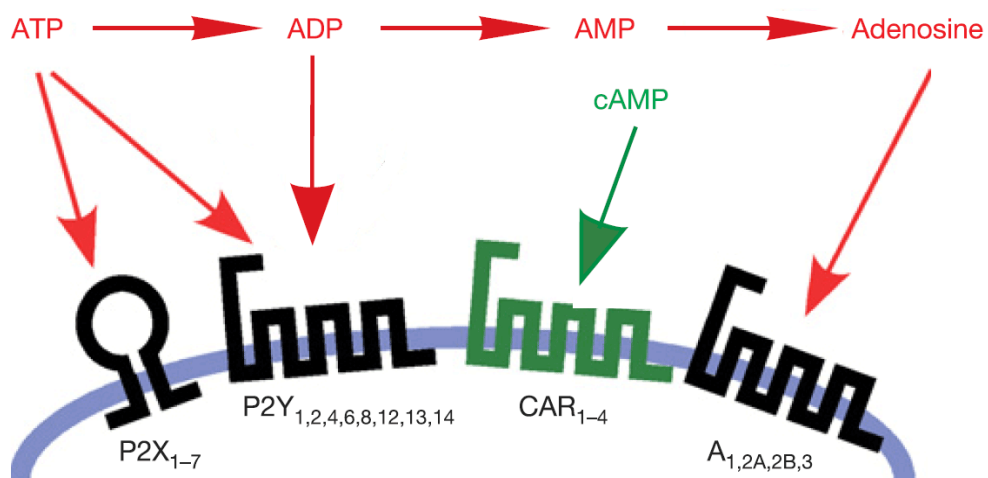


Figura 3. Potencial ativação dos receptores de nucleotídeos (receptores P2) e de adenosina (receptores P1) (Adaptado de Khakh e North, 2006).

A sinalização purinérgica desempenha um papel tanto em estados fisiológicos quanto patológicos (Burnstock, 2007). O ATP está envolvido em mecanismos que promovem o controle local do tônus vascular, promovendo vasoconstrição ou vasodilatação na musculatura lisa (Burnstock, 2006a), e da agregação plaquetária (Rolf al., 2001). Além de sua participação na regulação de mecanismos de migração, proliferação e morte celular durante a angiogênese e a aterosclerose (Burnstock, 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que o ATP extracelular apresenta um importante papel na inibição do crescimento de diversos tipos de tumores (Burnstock, 2006a). O ADP, produto da hidrólise do ATP, é um potente agregador plaquetário

(Kunapuli e Daniel, 1998) e vasoconstritor (Furukoji et al., 2008). A adenosina, produto da hidrólise do ATP, é um importante modulador da atividade neuronal e atua como mensageira transcelular para sinalizar desequilíbrio metabólico. Há relato do aumento em sua concentração na presença de alterações metabólicas estressantes (Latini e Pedata, 2001). Adicionalmente, a adenosina pode exercer efeitos vasodilatadores através de receptores P_1 presentes na musculatura lisa e, devido a sua ação neuromoduladora, pode atuar como uma molécula endógena cardio e neuroprotetora (Jacobson e Gao, 2006).

3.1. Enzimas nucleotidases

O ATP extracelular, bem como os demais nucleotídeos de adenina, podem ser rapidamente hidrolisados pela ação das nucleotidases presentes na superfície celular, solúveis no meio intersticial ou nos fluidos biológicos (Zimmermann, 2000). As nucleotidases desempenham uma função essencial na sinalização purinérgica, controlando a disponibilidade e os níveis extracelulares de ATP, ADP, AMP e adenosina (Agteresch et al., 1999) e, conseqüentemente, na regulação das respostas mediadas pelos purinoreceptores (Chen e Guidotti, 2001). Assim, a defosforilação completa do ATP ocorre pela ação conjunta das enzimas denominadas “nucleotidases” que incluem: as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), as nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase, as fosfatases alcalinas, e a 5'-nucleotidase (Zimmermann, 2000).

Desta forma, a primeira etapa de degradação dos nucleotídeos (ATP e ADP) pode ser catalisada por enzimas da família das NTPDases (Figura 4). Em mamíferos foram identificados 8 membros desta família: NTPDase 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, as quais catalisam a primeira etapa de degradação do ATP extracelular até AMP. As

NTPDases 1, 2, 3 e 8 são proteínas transmembrana, localizadas na superfície da membrana plasmática celular, com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. A NTPDase 1, enzima que hidrolisa igualmente bem o ATP e ADP com uma razão de aproximadamente 1:0,5 a 1:0,9, tem sido o membro mais estudado da família das NTPDases. Já a NTPDase 2 apresenta clara preferência pelos nucleotídeos trifosfatados em proporção de 30:1, por esta razão também é chamada de ATPase (Zimmermann, 2000). Esta característica pode ser importante em situações patológicas e injúrias onde as células são expostas a elevadas concentrações de ATP extracelular (Burnstock, 2008). As NTPDase 3 e 8 preferem o ATP ao ADP, em proporções de 3:1 e 2:1, respectivamente. As NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas intracelularmente, ancoradas nas membranas de organelas intracelulares, com o sítio catalítico voltado para o lúmen de compartimentos (Robson et al., 2006), tais como aparelho de Golgi (Wang e Guidotti, 1998), vacúolos lisossomais ou retículo endoplasmático (Biederbick et al., 1999). Sua atividade catalítica máxima requer a presença dos cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} , sendo inativas na ausência destes íons (Kukulski et al., 2004). Além disso, as NTPDase 5 e 6 podem sofrer clivagem proteolítica e serem secretadas em uma forma solúvel (Lavoie et al., 2004).

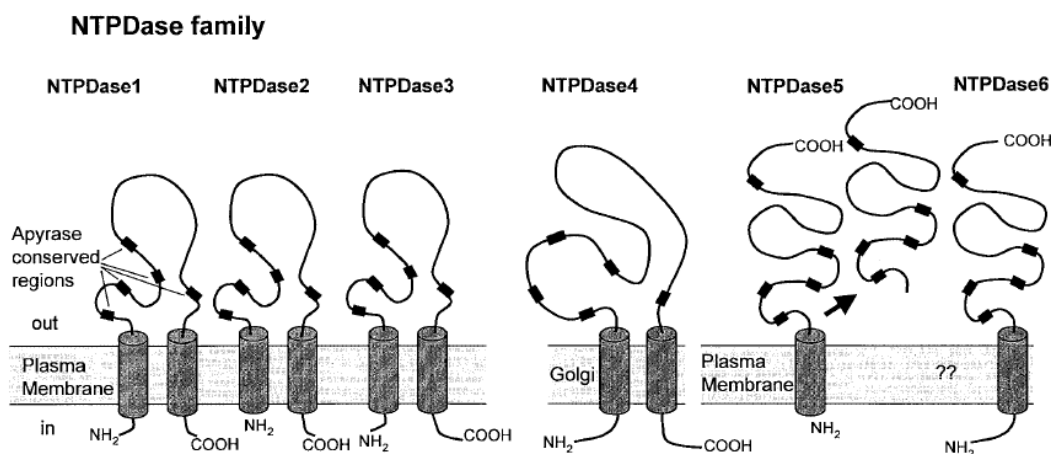


Figura 4. Estruturas dos membros da família das enzimas NTPDases (Adaptado de Zimmermann, 2000).

O AMP resultante da hidrólise do ATP/ADP pela ação das NTPDases é subseqüentemente hidrolisado pela ação da 5'-nucleotidase até adenosina. A 5'-nucleotidase é classificada em quatro grupos de acordo com sua localização celular e propriedades bioquímicas: uma 5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática, uma forma solúvel, e duas formas citoplasmáticas (Kawashima et al., 2000). A 5'-nucleotidase está ancorada à membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Zimmermann, 1992), ligação que pode ser clivada por fosfolipase C, resultando em sua forma solúvel (Figura 5) (Yegutkin et al., 2000; Zimmermann e Braun, 1999).

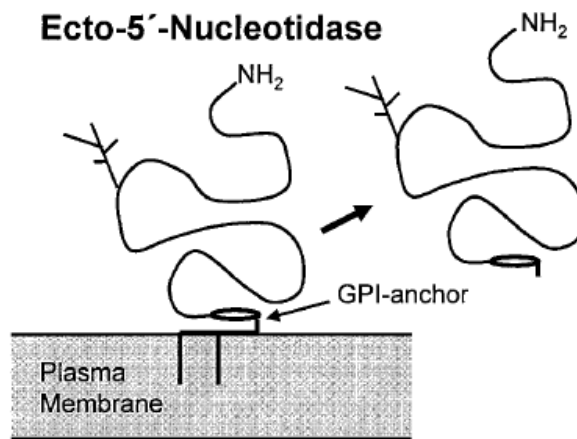


Figura 5. Estrutura da enzima (ecto)-5'-nucleotidase. A enzima pode estar ancorada a membrana plasmática ou ser liberada através de clivagem proteolítica (Adaptado de Zimmermann, 2000).

A família das NTPDases juntamente com a 5'-nucleotidase são amplamente expressas em células endoteliais e hematopoiéticas e são consideradas as maiores reguladoras da sinalização purinérgica no sangue (Robson et al., 2005; Zimmermann, 1999). A NTPDase 1 em particular, apresenta uma evidente interação com o sistema vascular: (1) ampla expressão de NTPDase 1 pelas células da musculatura lisa e endotelial vasculares, (2) previne eventos pró-inflamatórios e pró-trombóticos através da hidrólise do ATP e ADP (Yegutkin, 2008), (3) inibe e reverte a agregação plaquetária na presença de ATP e/ou ADP (Sevigny et al., 1997; Sevigny et al., 2002),

(4) papel crucial na modulação angiogênica e na reconstrução vascular (Erlinge e Burnstock, 2008) e (5) camundongos *knockout* para NTPDase 1 apresentaram transtornos vasculares, hemostáticos e tromboregulatórios (Enjyoji et al., 1999; Erlinge e Burnstock, 2008).

Inicialmente, pensava-se que a metabolização do ATP fosse mediada somente pelas nucleotidases ligadas à membrana plasmática (ecto). No entanto, foi demonstrado que nucleotidases solúveis, provavelmente liberadas por terminações simpáticas, também estão envolvidas (Todorov et al., 1997). Enzimas nucleotidases solúveis juntamente com ecto-nucleotidases nas plaquetas e na membrana plasmática de células endoteliais (Coade e Pearson, 1989; Yegutkin et al., 2000) são responsáveis pela manutenção de nucleotídeos de adenina e adenosina dentro dos níveis fisiológicos (Agteresch et al., 1999; Oses et al., 2004). Portanto, a cascata de nucleotidases é uma via enzimática com dupla função de remover o sinal (ATP) e gerar um segundo sinalizador (adenosina).

3.2. O Sistema Nervoso Simpático e A Transmissão Purinérgica

O sistema nervoso simpático (SNS), juntamente com o sistema nervoso parassimpático compõem o sistema nervoso autônomo que comanda as funções vegetativas/viscerais do organismo e tem como função a manutenção do ambiente interno, ou seja, o controle da homeostase (Brodal, 2004). O SNS estimula as atividades que ocorrem em situações de emergência ou tensão, como por exemplo, na reação de luta ou fuga, na qual ocorre aceleração dos batimentos cardíacos, aumento da pressão arterial, aumento do metabolismo da glicose, dilatação das pupilas e dos vasos da musculatura esquelética, entre outros. Estes efeitos fisiológicos são mediados principalmente pelo transmissor epinefrina liberado pelas glândulas adrenais

através da estimulação simpática e pelo neurotransmissor simpático norepinefrina via receptores α - e β -adrenérgicos presentes em diversos órgãos e estruturas incluindo o coração, a musculatura lisa, os vasos sanguíneos, além de grande quantidade de glândulas secretórias (Sherwood, 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que níveis circulantes de norepinefrina e epinefrina apresentam variações diurnas com aumento ao longo do dia e diminuição durante a noite, sugerindo um evidente padrão temporal circadiano do sistema simpático (Brotman et al., 2010).

Diversos estudos mostraram que o ATP é co-liberado com a norepinefrina por nervos simpáticos pós-ganglionares (Westfall et al., 1991; Burnstock, 1999). Utilizando *vas deferens* de porquinho-da-índia como modelo para o estudo da co-transmissão ATP e norepinefrina, foi observado que a estimulação simpática produz uma resposta bifásica de contração em células da musculatura lisa. O ATP é o responsável pela primeira fase de resposta via receptores P2X (principalmente P2X₁) presentes em células da musculatura. A segunda fase de contração é mediada pela norepinefrina atuando em receptores α_1 (Westfall et al., 2002). Além disso, foi observado em terminais nervosos simpáticos cardíacos que altas concentrações de ATP extracelular estimulam a liberação de norepinefrina, e baixas inibem, via receptores P2X e P2Y, respectivamente (Sesti et al., 2002).

Nucleotidases solúveis, responsáveis pela hidrólise do ATP, ADP e AMP até adenosina, são liberadas via estimulação simpática (Todorov, et al., 1997; Westfall et al., 2000) e foram identificadas como uma ATPDase semelhante à família NTPDase e uma AMPase semelhante à 5'-nucleotidase (Mihaylova-Todorova et al., 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que as nucleotidases (principalmente a NTPDase 1), por meio da metabolização do ATP, podem inibir a liberação de norepinefrina via ativação de receptores P2Y por baixas concentrações de ATP extracelular (Sesti et al., 2002).

3.3. O Sistema Purinérgico e Os Ritmos Circadianos

Alguns estudos sugerem uma variação temporal circadiana em elementos do sistema purinérgico, além de uma influência purinérgica sobre o relógio biológico. Elliott et al. (2001) sugeriram o envolvimento do receptor A_1 de adenosina na regulação da resposta do relógio biológico à luz, corroborando com um estudo no qual células neuronais dos núcleos supraquiasmáticos respondem à adenosina exógena (Chen e Van den Pol, 1997). Adicionalmente, um estudo realizado com células pituitárias de roedores verificou que a expressão temporal do gene *Period1* é dependente da sensibilização de receptores A_{2b} de adenosina, que ocorre por meio do hormônio melatonina (von Gall et al., 2002).

As variações diurnas na atividade de diversas enzimas, como a 5'-nucleotidase e a adenosina deaminase, responsáveis pelo metabolismo da adenosina, foram estudadas em diferentes regiões do encéfalo, incluindo regiões reguladoras do ciclo atividade/repouso, e verificou-se que exibem variações diurnas em suas atividades, embora não em todas as regiões estudadas (Mackiewicz et al., 2003). Outro estudo, realizado em córtex cerebral de roedores verificou um perfil unimodal das enzimas de metabolização da adenosina, com baixa atividade enzimática durante o dia e alta durante a noite (Chagoya de Sánchez et al., 1993). Flutuações diurnas na produção de adenosina e na densidade de seus receptores no encéfalo foram reportadas (Virus et al., 1984; Florio et al., 1991), sugerindo que elementos integrantes da função adenosinérgica estão sob controle circadiano. Adicionalmente, estudos clínicos e pré-clínicos observaram um padrão circadiano da atividade enzimática da 5'-nucleotidase no soro (Chagoya de Sánchez et al., 1983; Chagoya de Sánchez, 1995 ; Chagoya de Sánchez et al., 1996; Rivera-Coll et al., 1993). Estes estudos sugerem que o metabolismo da adenosina desempenha importantes papéis fisiológicos, tais como:

manutenção da homeostase energética, participação no ciclo atividade/repouso, entre outros.

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possível variação do padrão temporal no catabolismo do ATP extracelular em soro de ratos Wistar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Quantificar as atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em soro de ratos em 0 ZT, 6 ZT, 12 ZT e 18 ZT. Zeitgeber time (ZT) é o tempo (em horas) referente ao início da fase clara, ou seja, 0 ZT (hora que as luzes são acesas) e 12 ZT (hora que as luzes são apagadas).
2. Dosar concentrações séricas de melatonina e de corticosterona em soro de ratos em 0 ZT, 6 ZT, 12 ZT e 18 ZT, utilizadas como marcadores biológicos do sistema temporizador circadiano do organismo.
3. Verificar os efeitos *in vivo* e *in vitro* da melatonina, da corticosterona e da ativação simpática (mimetizada pela norepinefrina exógena) sobre as atividades das enzimas nucleotidases em soro de ratos.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Abe, K., Kroning, J., Greer, M.A., Critchlow, V., 1979. Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian-rhythms in plasma-corticosterone, body-temperature, feeding and plasma thyrotropin. *Neuroendocrinology* 29, 119-131.
2. Agteresch, H.J., Dagnelie, P.C., van den Berg, J.W., Wilson, J.H., 1999. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58, 211-232.
3. Aguzzi, J., Bullock, N.M., Tosini, G., 2006. Spontaneous internal desynchronization of locomotor activity and body temperature rhythms from plasma melatonin rhythm in rats exposed to constant dim light. *Journal of Circadian Rhythms* 4, 4-6.
4. Arendt, J., 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction* 3, 13-22.
5. Bartness, T.J., Song, C.K., Demas, G.E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: Implications for biological rhythms. *Journal of Biological Rhythms* 16, 196-204.
6. Biederbick, A., Rose, S., Elsasser, H.P., 1999. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science* 112, 2473-2484.
7. Boden, M.J., Kennaway, D.J., 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 132, 379-392.
8. Bodin, P., Burnstock, G., 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical Research* 26, 959-969.
9. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
10. Brodal, P., 2004. *The Central Nervous System: Structure and Function* (3 ed.). Oxford University Press US. pp. 369–396.
11. Brotman, D.J., Golden, S.H., Wittstein, I.S., 2007. The cardiovascular toll of stress. *The Lancet*, 22;370, 1089-100. Review.
12. Buijs, R.M., Wortel, J., van Heerikhuizen, J.J., Feenstra, M.G.P., Ter Horst, G.J., Romijn, H.J., Kalsbeek, A., 1999. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience* 11, 1535-1544.
13. Burnstock, G., 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24(3), 509-81. Review.

14. Burnstock, G., 1999. Purinergic cotransmission. *Brain Research Bulletin* 50, 355-357.
15. Burnstock, G., 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 22, 364-373.
16. Burnstock, G., 2004. Cotransmission. *Current Opinion in Pharmacology* 4, 47-52.
17. Burnstock, G., 2006a. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27, 166-176.
18. Burnstock, G., 2006b. Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Symp* 276, 26-48; discussion 48-57, 275-281.
19. Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797.
20. Burnstock, G., 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7, 575-590.
21. Campino, C., Valenzuela, F., Arteaga, E., Torres-Farfan, C., Trucco, C., Velasco, A., Guzman, S., Seron-Ferre, M., 2008. Melatonin reduces cortisol response to ACTH in humans. *Revista Medica De Chile* 136, 1390-1397.
22. Chagoya de Sánchez, V., Muñoz, R.H., Suarez, J., Vidrio, S., Yanez, L., Muñoz, M.D., 1993. Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat - possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle. *Brain Research* 612, 115-121.
23. Chagoya de Sánchez, V., 1995. Circadian variations of adenosine and of its metabolism - could adenosine be a molecular oscillator for circadian-rhythms. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 73, 339-355.
24. Chagoya de Sánchez, V., Muñoz, R.H., Suarez, J., Vidrio, S., Yanez, L., AguilarRoblero, R., Oksenberg, A., VegaGonzalez, A., Villalobos, L., Rosenthal, L., FernandezCancino, F., DruckerColin, R., DiazMuñoz, M., 1996. Temporal variations of adenosine metabolism in human blood. *Chronobiology International* 13, 163-177.
25. Chen, G., Van den Pol, A.N., 1997. Adenosine modulation of calcium currents and presynaptic inhibition of GABA release in suprachiasmatic and arcuate nucleus neurons. *Journal of Neurophysiology* 77, 3035-3047.
26. Chen, W., Guidotti, G., 2001. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282, 90-95.
27. Coade, S.B., Pearson, J.D., 1989. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* 65, 531-537.
28. Cohen, M.C., Rohla, K.M., Lavery, C.E., Muller, J.E., Mittleman, M.A., 1997. Meta-

- analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *American Journal of Cardiology* 79, 1512-&.
29. Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., 2000. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences* 68, 119-137.
 30. Czeisler, C.A., Klerman, E.B., 1999. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Progress in Hormone Research*, Vol 54 54, 97-132.
 31. Delagrangé, P., Atkinson, J., Boutin, J.A., Casteilla, L., Lesieur, D., Misslin, R., Pellissier, S., Penicaud, L., Renard, P., 2003. Therapeutic perspectives for melatonin agonists and antagonists. *Journal of Neuroendocrinology* 15, 442-448.
 32. Elias, L.L.K., Clark, A.J.L., 2000. The expression of the ACTH receptor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 1245-1248.
 33. Elliott, K.J., Weber, E.T., Rea, M.A., 2001. Adenosine A(1) receptors regulate the response of the hamster circadian clock to light. *European Journal of Pharmacology* 414, 45-53.
 34. Enjyoji, K., Sevigny, J., Lin, Y., Frenette, P.S., Christie, P.D., Esch, J.S., 2nd, Imai, M., Edelberg, J.M., Rayburn, H., Lech, M., Beeler, D.L., Csizmadia, E., Wagner, D.D., Robson, S.C., Rosenberg, R.D., 1999. Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 5, 1010-1017.
 35. Erlinge, D., Burnstock, G., 2008. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 4, 1-20.
 36. Florio, C., Rosati, A.M., Traversa, U., Vertua, R., 1991. Circadian-rhythm in adenosine-A1-receptor of mouse cerebral-cortex. *Life Sciences* 48, PL25-PL29.
 37. Furukoji, E., Tanaka, N., Yamashita, A., Matsumoto, M., Fujimura, Y., Yamamoto, R., Tamura, S., Asada, Y., 2008. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction. *Thromb Res* 121, 583-585.
 38. Goichot, B., Weibel, L., Chapotot, F., Gronfier, C., Piquard, F., Brandenberger, G., 1998. Effect of the shift of the sleep-wake cycle on three robust endocrine markers of the circadian clock. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 275, E243-E248.
 39. Gromova, E.A., Kraus, M., Krecek, J., 1967. Effect of melatonin and 5-hydroxytryptamine on aldosterone and corticosterone production by adrenal glands of normal and hypophysectomized rats. *Journal of Endocrinology* 39, 345.
 40. Hajak, G., Rodenbeck, A., Ehrental, H.D., Leonard, S., Wedekind, D., Sengos,

- G., Zhou, D., Huether, G., 1997. No evidence for a physiological coupling between melatonin and glucocorticoids. *Psychopharmacology* 133, 313-322.
41. Hastings, M.H., 1991. Neuroendocrine rhythms. *Pharmacology & Therapeutics* 50, 35-71.
 42. Hastings, M.H., Reddy, A.B., Maywood, E.S., 2003. A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 649-661.
 43. Haus, E., 2007a. Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 985-1014.
 44. Haus, E., 2007b. Chronobiology of hemostasis and inferences for the chronotherapy of coagulation disorders and thrombosis prevention. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 966-984.
 45. Haus, E., Smolensky, M., 2006. Biological clocks and shift work: Circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes & Control* 17, 489-500.
 46. Hofstra, W.A., de Weerd, A.W., 2008. How to assess circadian rhythm in humans: A review of literature. *Epilepsy & Behavior* 13, 438-444.
 47. Jacobson, K.A., Gao, Z.G., 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 247-264.
 48. Kawashima, Y., Nagasawa, T., Ninomiya, H., 2000. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96, 2157-2162.
 49. Khakh, B.S., North, R.A., 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.
 50. Klein, D., Moore, R.Y., Reppert, S.M., 1991. *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Oxford University Press: New York.
 51. Kukulski, F., Sevigny, J., Komoszynski, M., 2004. Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Research* 1030, 49-56.
 52. Kunapuli, S.P., Daniel, J.L., 1998. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 336 (Pt 3), 513-523.
 53. Latini, S., Pedata, F., 2001. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry* 79, 463-484.
 54. Lavoie, E.G., Kukulski, F., Levesque, S.A., Lecka, J., Sevigny, J., 2004. Cloning

- and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochemical Pharmacology* 67, 1917-1926.
55. Lewy, A.J., Wehr, T.A., Goodwin, F.K., Newsome, D.A., Markey, S.P., 1980. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 210, 1267-1269.
56. Macchi, M.M., Bruce, J.N., 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology* 25, 177-195.
57. Markus, R.P., Mortani, E.J., Junior, B., Ferreira, Z.S., 2003. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Einstein*, v. 1, p. 143-148.
58. Markus, R., Franco, D., Carvalho, L., Gentil, V., Gorenstein, C., 2009. Acute increase in urinary 6-sulfatoximetatonin after clomipramine, as a predictive measure for emotional improvement. *J Psychopharmacol*.
59. Marques, M. D., Golombek, D. e Moreno, C., 2003. Adaptação temporal. Em: N. Marques; L. Menna-Barreto. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicações* (pp. 55-98). São Paulo: Edusp.
60. Menna-Barreto, L., 2003. O tempo na Biologia. Em: N. Marques; L. Menna-Barreto. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicações* (pp. 26-29). São Paulo: Edusp.
61. Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S.I., Markuns, J.F., Lehman, M.N., Bittman, E.L., 1999. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140, 207-218.
62. Mihaylova-Todorova, S.T., Todorov, L.D., Westfall, D.P., 2002. Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 992-1001.
63. Miller, H.L., Ekstrom, R.D., Mason, G.A., Lydiard, R.B., Golden, R.N., 2001. Noradrenergic function and clinical outcome in antidepressant pharmacotherapy. *Neuropsychopharmacology* 24, 617-623.
64. Mirick, D.K., Davis, S., 2008. Melatonin as a Biomarker of Circadian Dysregulation. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 3306-3313.
65. Mohawk, J.A., Pargament, J.M., Lee, T.M., 2007. Circadian dependence of corticosterone release to light exposure in the rat. *Physiology & Behavior* 92, 800-806.
66. Moore, R.Y., Eichler, V.B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in rat. *Brain Research* 42, 201.
67. Moore-Ede, M.C., 1986. Physiology of the circadian timing system: predictive

- versus reactive homeostasis. *Am J Physiol* 250, R737-752.
68. Moore-ede, M.C., 1986. Physiology of the circadian timing system - predictive versus reactive homeostasis. *American Journal of Physiology* 250, R737-R752.
 69. Moser, M., Fruhwirth, M., Penter, R., Winker, R., 2006a. Why life oscillates - from a topographical towards a functional chronobiology. *Cancer Causes & Control* 17, 591-599.
 70. Moser, M., Penter, R., Fruehwirth, M., Kenner, T., 2006b. Why life oscillates-- biological rhythms and health. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 424-428.
 71. Nowak, J.Z., Zawilska, J.B., 1998. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World & Science* 20, 18-27.
 72. Okamura, H., Yamaguchi, S., Yagita, K., 2002. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell and Tissue Research* 309(1), 47-56.
 73. Oses, J.P., Cardoso, C.M., Germano, R.A., Kirst, I.B., Rucker, B., Furstenau, C.R., Wink, M.R., Bonan, C.D., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., 2004. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci* 74, 3275-3284.
 74. Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin - Nature's most versatile biological signal? *Febs Journal* 273, 2813-2838.
 75. Pepine, C.J., 1991a. Circadian variations in myocardial-ischemia - implications for management. *Jama-Journal of the American Medical Association* 265, 386-390.
 76. Pepine, C.J., 1991b. Therapeutic implications of circadian variations in myocardial ischemia and related physiologic functions. *Am J Hypertens* 4, 442S-448S.
 77. Persengiev, S.P., Kanchev, L.N., Stankov, B.M., 1989. Effect of melatonin on steroid-production by rat adrenals under *in vitro* superfusion conditions. *Life Sciences* 44, 1955-1962.
 78. Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50, 413-492.
 79. Reiter, R.J., Hester, R.J., 1966. Interrelationships of pineal gland superior cervical ganglia and photoperiod in regulation of endocrine systems of hamsters. *Endocrinology* 79, 1168.
 80. Ribelayga, C., Pevet, P., Simonneaux, V., 2000. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 278, R1339-R1345.
 81. Richter, H.G., Torres-Farfan, C., Garcia-Sesnich, J., Abarzua-Catalan, L.,

- Henriquez, M.G., Alvarez-Felmer, M., Gaete, F., Rehren, G.E., Seron-Ferre, M., 2008. Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 149, 995-1003.
82. Richter, H.G., Torres-Farfan, C., Rojas-Garcia, P.P., Campino, C., Torrealba, F., Seron-Ferre, M., 2004. The circadian timing system: Making sense of day/night gene expression. *Biological Research* 37, 11-28.
83. Riveracoll, A., Fuentesarderiu, X., Dieznoguera, A., 1993. Circadian-rhythms of serum concentrations of 12 enzymes of clinical interest. *Chronobiology International* 10, 190-200.
84. Robson, S.C., Sevigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2, 409-430.
85. Robson, S.C., Wu, Y., Sun, X.F., Knosalla, C., Dwyer, K., Enjyoji, K., 2005a. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 31, 217-233.
86. Robson, S.C., Wu, Y., Sun, X.F., Knosalla, C., Dwyer, K., Enjyoji, K., 2005b. Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 31, 217-233.
87. Rolf, M.G., Brearley, C.A., Mahaut-Smith, M.P., 2001. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb Haemost* 85, 303-308.
88. Ruger, M., Scheer, F., 2009. Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 10, 245-260.
89. Sesti, C., Broekman, M.J., Drosopoulos, J.H., Islam, N., Marcus, A.J., Levi, R., 2002. EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:605-611.
90. Sevigny, J., Levesque, F.P., Grondin, G., Beaudoin, A.R., 1997. Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase, identification and localisation by immunological techniques. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1334, 73-88.
91. Sevigny, J., Sundberg, C., Braun, N., Guckelberger, O., Csizmadia, E., Qawi, I., Imai, M., Zimmermann, H., Robson, S.C., 2002. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99, 2801-2809.

92. Sherwood, L., 2008. Human Physiology: From Cells to Systems (7 ed.). Cengage Learning. pp. 240.
93. Smolensky, M.H., Peppas, N.A., 2007a. Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 828-851.
94. Smolensky, M.H., Peppas, N.A., 2007b. Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 828-851.
95. Sulzman, F.M., Fuller, C.A., Moorede, M.C., 1977. Spontaneous internal desynchronization of circadian-rhythms in squirrel-monkey. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 58, 63-67.
96. Szafarczyk, A., Ixart, G., Alonso, G., Malaval, F., Nouguiersoule, J., Assenmacher, I., 1983. CNS control of the circadian adrenocortical rhythm. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 19, 1009-1015.
97. Tempel, D.L., Leibowitz, S.F., 1994. Adrenal-steroid receptors - interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *Journal of Neuroendocrinology* 6, 479-501.
98. Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T.D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R.A., Westfall, D.P., 1997. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387, 76-79.
99. Torres-Farfan, C., Richter, H.G., Rojas-Garcia, P., Vergara, M., Forcelledo, M.L., Valladares, L.E., Torrealba, F., Valenzuela, G.J., Seron-Ferre, M., 2003. mt1 melatonin receptor in the primate adrenal gland: Inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 450-458.
100. Van Someren, E.J.W., Nagtegaal, E., 2007. Improving melatonin circadian phase estimates. *Sleep Medicine* 8, 590-601.
101. Van Cauter, E., 1990. Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine function - a minireview. *Hormone Research* 34, 45-53.
102. Van Cauter, E., Refetoff, S., 1985. Multifactorial control of the 24-hour secretory profiles of pituitary-hormones. *Journal of Endocrinological Investigation* 8, 381-391.
103. Verhagen, L.A.W., Pevet, P., Saboureau, M., Sicard, B., Nesme, B., Claustrat, B., Buijs, R.M., Kalsbeek, A., 2004. Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Research* 995, 197-204.
104. Virus, R.M., Baglajewski, T., Radulovacki, M., 1984. Circadian variation of H-3 N-6-(1-phenylisopropyl)adenosine binding in rat-brain. *Neuroscience Letters* 46, 219-222.

105. von Gall, C., Garabette, M.L., Kell, C.A., Frenzel, S., Dehghani, F., Schumm-Draeger, P.M., Weaver, D.R., Korf, H.W., Hastings, M.H., Stehle, J.H., 2002. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nature Neuroscience* 5, 234-238.
106. von Zerssen, D., Doerr, P., Emrich, H.M., Lund, R., Pirke, K.M., 1987. Diurnal-variation of mood and the cortisol rhythm in depression and normal states of mind. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 237, 36-45.
107. Wang, T.F., Guidotti, G., 1998. Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Research* 790, 318-322.
108. Westfall, D.P., Dalziel, H.H., Forsyth, K.M., 1991. ATP as neurotransmitter, cotransmitter and neuromodulator. *Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Functions* (Phillis J) pp 295–305, CRC Press.
109. Westfall, T.D., Sarkar, S., Ramphir, N., Westfall, D.P., Sneddon, P., Kennedy, C., 2000. Characterization of the ATPase released during sympathetic nerve stimulation of the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol* 129, 1684–1688.
110. Westfall, D.P., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S.T., 2002. ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(2), 439-44. Review.
111. White, N., Burnstock, G., 2006. P2 receptors and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 211-217.
112. Wilkinson, C.W., 2008. Circadian clocks: Showtime for the adrenal cortex. *Endocrinology* 149, 1451-1453.
113. Yegutkin, G.G., 1997. Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry (Mosc)* 62, 619-622.
114. Yegutkin, G., Bodin, P., Burnstock, G., 2000. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 129, 921-926.
115. Yegutkin, G.G., 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783, 673-694.
116. Yegutkin, G.G., Samburski, S.S., Jalkanen, S., 2003. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J* 17, 1328-1330.
117. Zimmermann, H., 1992. 5'-nucleotidase - molecular-structure and functional -

- aspects. *Biochemical Journal* 285, 345-365.
118. Zimmermann, H., 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 299-309.
119. Zimmermann, H., Braun, N., 1999a. Ecto-nucleotidases - molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Nucleotides and Their Receptors in the Nervous Systems* 120, 371-385.
120. Zimmermann, H., Braun, N., 1999b. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res* 120, 371-385.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1

24-Hour Temporal Pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum. Detanico BC, Souza A, Medeiros LF, Rozisky JR, Caumo W, Hidalgo MPL, Ana Maria Battastini AMO, Torres ILS.

Aceito para publicação na revista *Chronobiology International*

24-Hour Temporal Pattern of NTPDase and 5'-nucleotidase enzymes in rat blood serum

Bernardo Carraro Detanico^{acd}, Andressa de Souza^{acd}, Liciane Fernandes Medeiros^{ad}, Joanna Ripoll Rozisky^{acd}, Wolnei Caumo^{acd}, Maria Paz Loayza Hidalgo^{cd}, Ana Maria Oliveira Battastini^{bc}, Iraci Lucena da Silva Torres^{acd*}.

^a *Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.*

^b *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

^c *Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

^d *Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

Conflict of Interest: There was no financial relationship between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

*** Corresponding author**

Iraci Lucena da Silva Torres
Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.
Rua Sarmiento Leite 500, sala 202.
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: 55 51 3316 3183.
E-mail: iracitorres@gmail.com

Running head: **Temporal Pattern of adenine nucleotides hydrolysis**

ABSTRACT

Circadian rhythms represent an important mechanism for preparing the organism to environmental variations. ATP, ADP, AMP and adenosine can act as extracellular messengers in a range of biological processes and are metabolized by a number of enzymes including NTPDases and 5'-nucleotidase. In the present study, we report that ATPase and ADPase activities present temporal variations during 24-h (higher during dark cycle). These findings suggest that the temporal pattern of enzymes in the serum might be important for the normal working of organism physiology through the maintenance of adenine nucleotides at physiological levels.

Keywords: NTPDase; 5'-nucleotidase; Nucleotide hydrolysis; Temporal pattern; Rats.

INTRODUCTION

Circadian (~24-h) rhythms are present in physiological, biochemical and behavioral events in a wide variety of organisms, including mammals (Moser et al., 2006). It has been proposed that this circadian organization is important to enable an organism to keep the balance in response to the daily external environmental changes and to be prepared accordingly (Moore-Ede, 1986). In mammals, a number of circadian patterns in biologic functions have been described, including hormonal levels (e.g. melatonin, corticosterone or cortisol), activity/rest cycle, body temperature, respiratory rate and blood pressure (Smolensky and Peppas, 2007). The circadian timing system efficiently orchestrates the physiology of organisms including cardiovascular system that display circadian pattern in blood pressure, heart rate, vasodilating effects (Lemmer, 2006), and cell division that is under a circadian control (Wood et al., 2006). Disturbed circadian rhythms could contribute to cardiovascular (Haus and Smolensky, 2006) and cancer diseases (Chen-Goodspeed and Lee, 2007).

The regulation of the cardiovascular system is based on a complex adjustment involving neural (sympathetic and parasympathetic), hormonal, renal and others mechanisms (Laragh, 1985; Levy, 1984). In this line, the purinergic system composed by adenosine 5'-triphosphate (ATP) and its breakdown products, adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-monophosphate (AMP) and adenosine can act as extracellular mediators. These molecules produce marked effects in a range of biological processes (Burnstock, 2007) including neurotransmission and neuromodulation (Burnstock, 2008), and an important role on cardiovascular system regulation (Erlinge and Burnstock, 2008) and cell proliferation (Burnstock, 2006b). ATP and ADP are released into the bloodstream from vascular smooth muscle, endothelium and circulating blood cells including platelets, and via outflow upon cell lysis (Kunapuli and Daniel, 1998). When released, they promote a range of effects over platelets, endothelial and vascular smooth muscle (Kunapuli and Daniel, 1998) through binding to purinergic receptors, which comprises P₂ receptors (P₂X₁₋₇ and P₂Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}), and P₁ (A₁, 2A, 2B, and 3) (Burnstock, 2006b). ATP can also be released as norepinephrine co-transmitter, promoting vasoconstriction or vasodilatation (Burnstock, 2006a), and contributes to platelet aggregation (Rolf et al., 2001). Furthermore, extracellular ATP inhibits the growth of a

variety of human tumors, including prostate, breast, colon, liver, ovarian, colorectal and esophageal (Burnstock, 2006b). Additionally, its hydrolysis produces the ADP, which is the most important platelet aggregator (Kunapuli and Daniel, 1998) and promotes vasoconstriction (Furukoji et al., 2008). The nucleoside adenosine can act as a vasodilator, inhibitor of platelet aggregation and cardioprotector (Jacobson and Gao, 2006).

Inactivation of extracellular adenine nucleotides is performed by the enzymes of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDases), of nucleotide phosphate inhibitor/phosphodiesterase family (NPP), alkaline phosphatases, and 5'-nucleotidase (Zimmermann, 2000). The NTPDase family that hydrolyzes ATP and ADP to AMP and ecto-5'-nucleotidase that breakdowns AMP to adenosine are ubiquitously co-expressed on endothelial and hematopoietic cells, and are considered as the major regulators of purinergic signaling in blood (Robson et al., 2005; Zimmermann, 1999). Previous studies suggested the presence of soluble NTPDases in rat blood serum (Oses et al., 2004) and in human blood (Yegutkin, 2008). These nucleotidases have a role in controlling the availability of ATP, ADP, AMP and adenosine keeping extracellular levels within physiological conditions (Agteresch et al., 1999).

Considering the relevant role of nucleotidases in coordinate cardiovascular system and cellular proliferation, the knowledge about its 24-h temporal pattern is important to better understand the path of degradation of circulating adenine nucleotides. The aim of this study was to verify the existence of a 24-h temporal pattern in ATPase, ADPase and AMPase enzymes activities in blood serum of Wistar rats *in vitro*. In parallel, hormonal levels of corticosterone and melatonin that have well-defined circadian rhythm were measurement.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Reagents: The experiments were carried out with male Wistar (150 - 230 g) rats with 60 days-old. Experimentally naive animals were housed in groups of five in home cages made of Plexiglass material (65 x 25 x 15 cm). They were maintained under a standard LD 12:12 cycle [lights on at 07:00 h, Zeitgeber time (ZT) 0, and off at 19:00 h, ZT 12], in a controlled environment ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, rat chow and water *ad libitum*). The protocol of this experimental study complied with the Ethical and Methodological Standards for Medical Biological Rhythm Research of *Chronobiology International* (Portaluppi et al., 2008). All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Experimental Design: Rats were habituated to the maintenance room for two weeks before the experiment initialization. On the experimental day, animals were killed at 4 time points (ZT 0, 6, 12 and 18) every 6 h throughout the 24-h period. For this purpose, individual rats were quickly transferred to a separate room and decapitated within 1 min. Trunk blood was drawn and blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 min at $5000 \times g$ at room temperature (Yegutkin, 1997). Serum was obtained and frozen at -20°C until assays perform.

Enzymatic assay: ATP and ADP hydrolysis were performed using the method described by Oses and colleagues (2004). The reaction mixture, containing 0.5 to 1.0 mg serum protein in 112.5 mM Tris-HCl, pH 8.0, was preincubated for 10 min to balance the mixture. The reaction was started by the addition of ATP or ADP (final concentration of 3.0 mM) and the incubation was performed at 37°C in a final volume of 200 μl during 40 min. The reaction was stopped by the addition of 200 μl 10% trichloroacetic acid (TCA). All samples were centrifuged at $5000 \times g$ for 5 min to eliminate precipitated protein and the supernatant was used for colorimetric assay. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the Malachite green method (Chan et al., 1986). The AMP hydrolysis was performed essentially as described above for ATP and ADP hydrolysis. The reaction mixture, containing 3.0 mM AMP as substrate in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, was incubated with 0.5 to 1.0 mg serum protein at 37°C in a final volume of 200 μl . All other procedures were the same as described above for ATP and ADP hydrolysis.

The protein concentration was measured by Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Enzyme activities were expressed as nmol of inorganic phosphate (Pi) released per minute per milligram of protein (nmol Pi/min/mg protein).

Blood serum hormonal assays: The hormonal levels in blood serum samples were determined using a corticosterone (IBL-America #IB79112) and melatonin (MP Biomedicals #193596) ELISA kit, according to the manufacturer instructions.

Statistical analysis: Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The comparison among groups was analyzed by One-Way ANOVA followed by Tukey's test. SPSS 17.0 for Windows was used for statistical analysis, and significance was set to $P < 0.05$.

RESULTS

The hydrolysis of ATP, ADP and AMP were evaluated in blood serum during 24-h at ZT 0, 6, 12 and 18. The variations of adenine nucleotide hydrolysis in serum are shown in Figure 1. One-Way ANOVA followed by Tukey's test revealed significant differences at 24-h profile on ATPase ($F_{3,31}=6.75$, $P < 0.05$) and ADPase ($F_{3,31}=7.26$, $P < 0.05$). The results were expressed as mean \pm S.E.M. specific activity (nmoles of Pi produced/min/mg protein). ATPase activity was significantly higher at ZT 12 (1.381 ± 0.106) and 18 (1.357 ± 0.074) when compared with ZT 0 (0.958 ± 0.074) and 6 (1.022 ± 0.079). In the same way, ADPase activity was significantly higher at ZT 12 (1.297 ± 0.094) and 18 (1.399 ± 0.129) when compared with ZT 0 (0.910 ± 0.080) and 6 (0.910 ± 0.076). The minimum values of ATPase and ADPase activities were observed at ZT 0 and ZT 6 (light cycle), whereas the maximum values activities were verified at ZT 12 and ZT 18 (dark cycle). In terms of percentage, ATPase and ADPase activities were 38.2% and 48.1% higher in dark cycle than in light cycle, respectively. AMPase activity did not exhibit a temporal pattern ($F_{3,31}=0.915$, $P > 0.44$), ZT 0 (1.375 ± 0.120), ZT 6 (1.474 ± 0.109), ZT 12 (1.528 ± 0.086) and ZT18 (1.633 ± 0.107). No differences in ATPase/ADPase ratio at 24-h pattern were observed ($F_{3,31}=0.605$, $P > 0.61$).

Figure 2 shows the physiological levels of melatonin and corticosterone in blood serum during 24-h period (ZT 0, 6, 12 and 18). One-Way ANOVA followed by Tukey's test revealed significant differences on 24-h levels of corticosterone ($F_{3,12}=9.49$, $P < 0.01$) and melatonin ($F_{3,13}=4.87$, $P < 0.05$). As expected, the peak of corticosterone and melatonin levels occurred at ZT 12 (821.84 ± 127.91 ng/mL) and ZT 18 (214.05 ± 28.49 pg/mL), respectively.

DISCUSSION

Our results demonstrated that ATPase and ADPase activities were increased during the dark period (ZT12 and ZT18) while AMPase activity did not display this temporal pattern (Figure 1). The ATPase/ADPase ratio (~ 1.0) did not show temporal pattern, demonstrating a paralelism between both activities, and it suggests that a single enzyme is acting on nucleotide hydrolysis. This is the first study in our knowledge that verifies the temporal pattern of serum nucleotidases enzymes responsible for ATP and ADP degradation.

Circadian temporal variations on extracellular adenosine levels in basal forebrain (Murillo-Rodriguez et al., 2004), blood (Chagoya de Sánchez et al., 1983), and in density of adenosine receptors in brain (Florio et al., 1991) were reported. The involvement of adenosine receptor in regulating the biological clock response to light (Elliott et al., 2001) and the temporal expression of *Per1* gene (von Gall et al., 2002) was demonstrated, Diurnal variations of 5'-nucleotidase were verified in different brain regions, including regulatory regions of the activity/rest cycle (Mackiewicz et al., 2003). Furthermore, it was reported ATP, ADP and AMP fluctuations during the 24-h in human blood (Chagoya de Sánchez et al., 1996).

Both ATP and ADP hydrolysis were increased during dark phase with no change of ATPase/ADPase ratio, suggesting the possibility that most likely candidate in serum is a soluble NTPDase 1-like activity, since paralelism ($\sim 1:1$) between both activities (ATPase and ADPase) was observed. Although the NTPDase 1 is expressed on cell surface of vascular endothelial, and smooth muscle cell (Marcus et al., 2003), it may be released through proteolytic cleavage of the membrane-bound NTPDase (Mihaylova-Todorova et al., 2002) or co-released with ATP and norepinephrine via sympathetic stimulation (Todorov et al., 1997). These soluble nucleotidases enzymes together with ecto-nucleotidases in platelets (Frassetto et al., 1993) and endothelial cells (Yegutkin et al., 2000) may be responsible for the maintenance of physiological levels of adenine nucleotides (Oses et al., 2004). NTPDase 1 is important to maintain levels of circulating ATP and ADP preventing its proinflammatory and prothrombotic effects (Yegutkin et al., 2008). Mice NTPDase 1 knockout exhibited hemostatic and thromboregulatory disturbances (Enyoloji et al., 1999).

Circadian rhythms are regulated by the circadian pacemaker or "clock", an input mechanism responsible for receiving environmental information and an output mechanism

which regulates physiological processes. In mammals, the master circadian clock is located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) and synchronizes the peripheral clock (tissues) via neural and humoral signals (Reppert and Weaver, 2002). In mammalian cells, it were identified clock genes in brain and peripheral tissues, including *Per* (1-3), *Cry* (1 and 2), *Clock*, *Bmal1*, among others (Ko and Takahashi, 2006). These genes clocks are self sustained through transcriptional and translational feedback loops of approximately 24-h (Reppert and Weaver, 2002). The peripheral clock can coordinate locally clock controlled gene (CCG) expression in each tissue generating a local rhythm (Jin et al., 1999). Therefore, physiological and behavioral rhythms are directly influenced by the molecular clockwork (Yang, 2010). In relation to the vascular system, oscillations in clock genes have been observed in murine vascular tissue (Reilly et al., 2007).

The temporal variation of ATP and ADP hydrolysis (probably soluble NTPDase 1-like) observed in this study can be driven by: (1) an increased release of these enzyme due to raise of sympathetic activity during dark period, (2) the rhythmicity of genes clock present in vascular system, or (3) the direct modulation of enzymatic activity by melatonin, corticosterone or norepinephrine that have their highest levels during the dark phase. Although, there is evidence that physiological levels of melatonin and dexamethasone (mimics the endogenous corticosterone) did not modulate the hydrolysis of ATP and ADP, and that physiological concentration of epinephrine modulate positively adenine nucleotides hydrolysis (Detanico et al., unpublished results).

These findings suggest that this temporal variation of nucleotidases enzymes can present a great importance in the regulation of the vascular system, since ATP is able to induce vasoconstriction and platelet aggregation together with ADP (Burnstock, 2006a; Rolf et al., 2001; Kunapuli and Daniel, 1998) that can contribute to pathophysiological cardiovascular events. Moreover, the increased hydrolysis of ATP and ADP nucleotides during night hours (corresponding to wake period in humans), could form compensatory-like mechanism of soluble nucleotidase activity in blood serum. These mechanism can act upon a variety of systems including sympathetic nervous system activity, blood pressure, heart rate, aggregability of platelets and cortisol secretion (corticosterone in rodents) (Pepine, 1991) that may contribute to the emergence of cardiovascular events more frequently during the morning hours in humans

(Maemura et al., 2007). Moreover, a recent study indicates the relevant role of ATP in tumor-mediated angiogenesis (Rumjahn et al., 2009). The vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important mediator of angiogenesis. It activates P2Y receptors (P2YR) on vascular endothelial cells through ATP and ADP nucleotides that transactivate VEGF receptor 2 (VEGFR2) to induce angiogenesis (Buxton et al., 2010). In addition, data shows that angiogenesis undergoes a circadian variation as well as the anti-angiogenic agents efficacy that is affected by circadian timing (Lévi et al., 2010). Related to this, it is plausible to hypothesize that the 24-h temporal pattern of ATPase and ADPase activities may have a key role in angiogenesis and consequently on tumor growth.

In this context, we suggest that some circadian disturbances in these activities may contribute to the occurrence of harmful changes in cardiovascular system and to the development of cancer disease. Additionally, we suggest that the 24-h temporal pattern of adenine nucleotides metabolism in blood serum must be taken into consideration during pharmacological manipulation in the control of human vascular diseases. Further studies are necessary to establish the origin and relevance of soluble purinergic enzymes into the bloodstream in (patho) physiological conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work received financial support by the Brazilian funding agencies: Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Dr I.L.S., Torres – Grant # 08-150); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - B.C., Detanico.

REFERENCES

- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. (1999). Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58:211-232.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Burnstock G. (2006a). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:166-176.
- Burnstock G. (2006b). Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found. Symp.* 276:26-48; discussion 48-57:275-281.
- Burnstock G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87:659-797.
- Burnstock G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:575-590.
- Buxton IL, Yokdang N, Matz RM. (2010). Purinergic mechanisms in breast cancer support intravasation, extravasation and angiogenesis. *Cancer Lett.* 28:131-41.
- Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Villalobos R, Glender W, Vidrio S, Suárez J, Yañez L. (1983). Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance. *Life Sci.* 33(11):1057-64.
- Chagoya de Sánchez V, Munoz RH, Suarez J, Vidrio S, Yanez L, Aguilar-Roblero R, Oksenberg A, Vega-Gonzalez A, Villalobos L, Rosenthal L, Fernandez-Cancino F., Drucker-Colin R, Diaz-Munoz M. (1996). Temporal variations of adenosine metabolism in human blood. *Chronobiol. Int.* 13, 163-177.
- Chan KM, Delfert D, Junger KD. (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380.
- Chen-Goodspeed M, Lee CC. (2007). Tumor suppression and circadian function. *J. Biol. Rhythms* 22:291-298.
- Elliott KJ, Weber ET, Rea MA. (2001). Adenosine A(1) receptors regulate the response of the hamster circadian clock to light. *Eur. J. Pharmacol.* 414, 45-53.
- Enyoloji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. (1999). Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* 5:1010-1017.
- Erlinge D, Burnstock G. (2008). P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal.* 4:1-20.
- Florio C, Rosati AM, Traversa U, Vertua R. (1991). Circadian-rhythm in adenosine-A1-receptor of mouse cerebral-cortex. *Life Sci.* 48, PL25-PL29.
- Frassetto SS, Dias RD, Sarkis JJ. (1993). Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (APYRASE, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* 129:47-55.
- Furukoji E, Tanaka N, Yamashita A, Matsumoto M, Fujimura Y, Yamamoto R, Tamura S, Asada

- Y. (2008). Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction. *Thromb. Res.* 121:583-585.
- Haus E, Smolensky M. (2006). Biological clocks and shift work: Circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes & Control* 17:489-500.
- Jacobson KA, Gao ZG. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 5:247-264.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96(1):57-68.
- Ko CH, Takahashi JS. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15: R271–R277.
- Kunapuli SP, Daniel JL. (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336:513-523.
- Laragh JH, Flier JS, Solomon R, Mitch WE, Williams GH, Epstein FH. (1985). Atrial natriuretic hormone, the renin aldosterone axis, and blood-pressure electrolyte homeostasis. *New England Journal of Medicine* 313:1330-1340.
- Lemmer B. (2006). The importance of circadian rhythms on drug response in hypertension and coronary heart disease - from mice and man. *Pharmacology & Therapeutics* 111:629-651.
- Levi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J. (2010). Circadian Timing in Cancer Treatments. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50:377-421.
- Levy RI. (1984). Causes of the decrease in cardiovascular mortality. *American Journal of Cardiology* 54:C7-C13.
- Mackiewicz M, Nikonova EV, Zimmerman JE, Galante RJ, Zhang L, Cater JR, Geiger JD, Pack AI. (2003). Enzymes of adenosine metabolism in the brain: diurnal rhythm and the effect of sleep deprivation. *J. Neurochem.* 85(2):348-57.
- Maemura K, Takeda N, Nagai R. (2007). Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: role of the biological clock in cardiovascular diseases. *J. Pharmacol. Sci.* 103:134-138.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. (2003). Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:9-16.
- Mihaylova-Todorova ST, Todorov LD, Westfall DP. (2002). Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:992-1001.
- Moore-Ede MC. (1986). Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am. J. Physiol.* 250:R737-752.
- Moser M, Penter R, Fruehwirth M, Kenner T. (2006). Why life oscillates--biological rhythms and health. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 1:424-428.

- Murillo-Rodriguez E, Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ, Shiromani PJ. (2004). The diurnal rhythm of adenosine levels in the basal forebrain of young and old rats. *Neuroscience* 123(2):361-70.
- Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ. (2004). Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* 74:3275-3284.
- Pepine CJ. (1991). Therapeutic implications of circadian variations in myocardial ischemia and related physiologic functions. *Am. J. Hypertens.* 4:442S-448S.
- Portaluppi F, Touitou Y, Smolensky M. (2008). Ethical and Methodological Standards for Laboratory and Medical Biological Rhythm Research. *Chronobiol. Int.* 25:999-1016.
- Reilly DF, Westgate EJ, FitzGerald GA. (2007). Peripheral circadian clocks in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27(8):1694-705.Review.
- Reppert SM, Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941.
- Robson SC, Wu Y, Sun XF, Knosalla C, Dwyer K, Enjyoji K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 31:217-233.
- Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. (2001). Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb. Haemost.* 85:303-308.
- Rumjahn SM, Yokdang N, Baldwin KA, Thai J, Buxton ILO. (2009). Purinergic regulation of vascular endothelial growth factor signaling in angiogenesis. *British Journal of Cancer* 100:1465-1470.
- Smolensky MH, Peppas NA. (2007). Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:828-851.
- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP. (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387:76-79.
- von Gall C, Garabette ML, Kell CA, Frenzel S, Dehghani F, Schumm-Draeger PM, Weaver DR, Korf HW, Hastings MH, Stehle JH. (2002). Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat. Neurosci* 5, 234-238.
- Wood PA, Du-Quiton J, You SJ, Hrushesky WJM. (2006). Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Molecular Cancer Therapeutics* 5:2023-2033.
- Yang X. (2010). A wheel of time: the circadian clock, nuclear receptors, and physiology. *Genes Dev.* 24(8):741-7.
- Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. (2000). Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 129:921-926.
- Yegutkin GG. (1997). Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood

serum. *Biochemistry (Mosc)* 62:619-622.

Yegutkin GG. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783:673-694.

Zimmermann H. (1999). Nucleotides and CD39: principal modulatory players and thrombosis. *Nat. Med.* 5:987-8.

Zimmermann H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362:299-309.

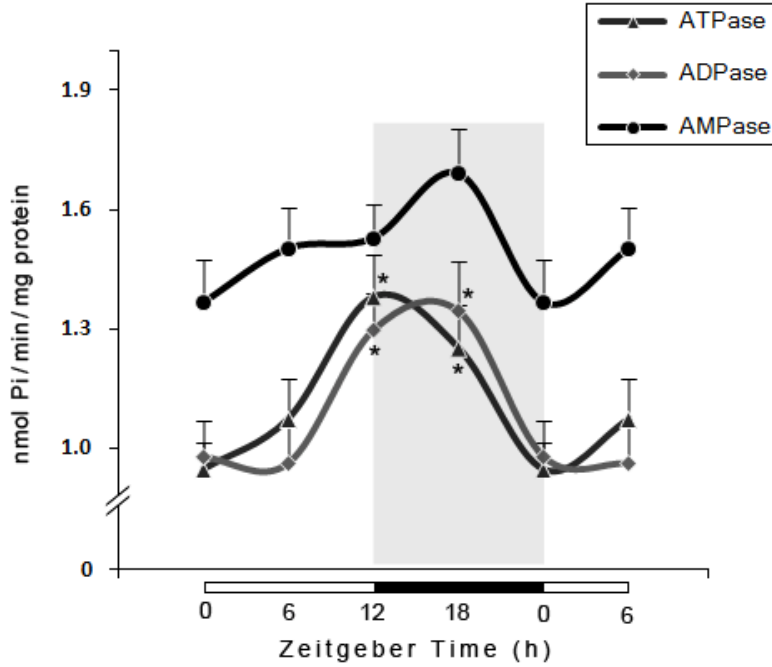
LEGENDS

Figure 1. 24-h temporal pattern on ATPase, ADPase and AMPase activities in blood serum. Values are expressed as mean \pm S.E.M. specific activity (nmoles of Pi produced/min/mg protein). Number of animals per group = 7-11. Asterisks indicate significant different (One-Way ANOVA/Tukey, $P < 0.05$). Horizontal bar at the base of graph represent day (white) and night (black) phase, with Zeitgeber times (ZT) indicated below.

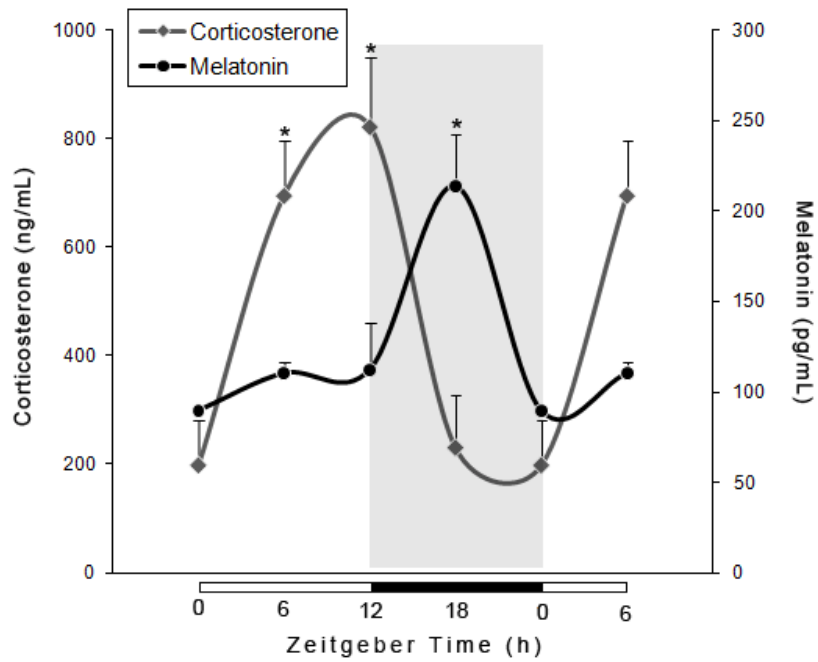
Figure 2. Physiological levels of corticosterone and melatonin during 24-h in blood serum. Values are expressed as mean \pm S.E.M (ng/mL for corticosterone and pg/mL for melatonin). Number of animals per group = 7-9. Asterisks indicate significant different (One-Way ANOVA/Tukey, $P < 0.05$). Horizontal bar at the base of graph represent day (white) and night (black) phase, with Zeitgeber times (ZT) indicated below.

FIGURES

1. 24-h temporal pattern on ATPase, ADPase and AMPase activities in blood serum.



2. Physiological levels of corticosterone and melatonin during 24-h in blood serum.



ARTIGO 2

Norepinephrine increases adenine nucleotides hydrolysis in rat blood serum. Detanico BC, Rozisky JL, Battastini AMO, Torres ILS.

Será submetido para publicação na revista *Life Sciences*

**A physiological level of norepinephrine increases adenine nucleotides hydrolysis in rat
blood serum**

Bernardo Carraro Detanico^{acd}, Joanna Ripoll Rozisky^{acd}, Ana Maria Oliveira Battastini^{bc}, Iraci Lucena da Silva Torres^{acd*}.

^a *Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.*

^b *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

^c *Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

^d *Unidade de Experimentação Animal, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

Conflict of Interest: There was no financial relationship between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

*** Corresponding author**

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite 500, sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 55 51 3308 3183; FAX: 55 51 3308 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

Running head: **Norepinephrine on adenine nucleotides hydrolysis**

ABSTRACT

Extracellular ATP, and its breakdown products, ADP and adenosine, have significant effects in a variety of biological processes including neurotransmission, contraction of smooth muscle, immune response, inflammation, platelet aggregation, and have an important role on cardiovascular system regulation and cell proliferation. Enzymes including NTPDases and ecto-5'-nucleotidase, responsible for adenine nucleotides breakdown, are considered to be the major regulators of purinergic signaling in the blood, since have a protective function by keeping extracellular ATP/ADP and adenosine levels within physiological conditions. Previous work of our group demonstrates that ATP and ADP hydrolysis is higher at night period when compared with light phase in rat blood serum. In nocturnal animals (e.g. rats), during the dark cycle important physiological changes occur, such as: increased secretion of melatonin and corticosterone, and increased circulating levels of norepinephrine. The aim of this study was to investigate the physiological effects *in vivo* and *in vitro* of melatonin, dexamethasone (exogenous corticoid) and norepinephrine upon nucleotides hydrolysis in rat blood serum. Exogenous norepinephrine (physiological concentration) promotes increase in adenine nucleotides hydrolysis in both *in vitro* and *in vivo* treatments. This study suggests a modulatory role of norepinephrine on nucleotidases pathway, inducing a decrease of extracellular ATP and ADP, and raise the notion that norepinephrine might modulates its own release by increasing soluble nucleotidases activities.

Keywords: NTPDase; Nucleotide hydrolysis; Melatonin; Corticosterone; Norepinephrine.

1. INTRODUCTION

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is an important extracellular signaling molecule, besides its well-established role in cellular energy metabolism (Burnstock, 2006). Extracellular ATP, and its breakdown products, adenosine 5'-diphosphate (ADP) and adenosine, have marked effects in a variety of biological processes, that include among others, neurotransmission, contraction of smooth muscle, immune response, inflammation, platelet aggregation and pain (Ravelic and Burnstock, 1998), and upon mechanisms proliferation, differentiation and apoptosis in a wide variety of tissues (White and Burnstock, 2006). In addition to this, the purinergic signaling is involved in a wide variety of pathological conditions such as: brain trauma and ischaemia, neuroinflammatory and neuropsychiatric disorders, neurodegenerative and cardiovascular diseases (Burnstock, 2008; Erlinge and Burnstock, 2008).

Circulation ATP can be released with norepinephrine (NE) and neuropeptide Y from sympathetic nerves causing vasoconstriction via P2X receptors, mainly the P2X₁ subtype, on smooth muscle (Westfall et al., 2002; Ralevic, 2009). Extracellular ATP is also released by non-adrenergic non-cholinergic nerves promoting vasodilatation on vascular smooth muscle or endothelium via P2Y receptors (Ralevic, 2009). ATP, as well as ADP, exerts effects on the vascular endothelium by stimulating cellular production of vasodilators such as prostacyclin and nitric oxide (Motte et al., 1995). The ADP is a potent platelet aggregator (Kunapuli and Daniel, 1998) and it promotes vasoconstriction (Furukoji et al., 2008). Additionally, the nucleoside adenosine, produced by ATP breakdown, can act as a vasodilator via smooth muscle P₁ receptors, inhibitor of platelet aggregation, and it may act as an endogenous cardioprotective and neuroprotective substance (Jacobson and Gao, 2006). Adenine nucleotides promote their physiological effects through binding to purinoreceptors, which comprises P₂ ionotropic ATP receptors (P2X₁₋₇, permeable to Na⁺, K⁺ and Ca⁺²) and G-protein coupled to ATP/ADP receptors (eight subtypes, P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}), and P₁ G-protein coupled to adenosine receptors (A_{1, 2A, 2B, and 3}) (Burnstock, 2006). These purinergic receptors are widely distributed throughout the body and are present in various organs and tissues including brain, spinal cord, heart, perivascular

nerves, vascular smooth muscle, endothelium bladder, sympathetic neurons, among others (Kunapuli and Daniel, 1998; Burnstock, 2008).

The importance of adenine nucleotides in homeostasis and thrombosis is closely associated with the essential role of an enzymatic system which provides an adequate control of these signaling molecules in the extracellular medium (Yegutkin, 2008). The enzymes responsible for adenine nucleotides breakdown were identified as (ecto)nucleotidases, and, comprises the nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDases), nucleotide phosphate inhibitor/phosphodiesterase family (NPP), alkaline phosphatases, and 5'-nucleotidase (Zimmermann, 2000). The NTPDase family that hydrolyzes ATP and ADP to AMP is composed of eight members: NTPDase 1, 2, 3 and 8 that are expressed on cell surface with catalytic site facing to the extracellular space and NTPDase 4, 5, 6 and 7 that display intracellular localization (Zimmerman, 2000). The NTPDase family is ubiquitously presents in endothelial and hematopoietic cells, and it is considered as the major regulators of purinergic signaling in blood (Robson et al., 2005; Zimmermann, 1999). Studies have demonstrated a possible soluble NTPDase in rat blood serum (Rücker et al., 2003; Oses et al., 2004). Additionally, the release of soluble NTPDases from the nerve terminals (Todorov et al., 1997; Westfall et al., 2000) and from vascular endothelial cells (Yegutkin et al., 1997) was described. Soluble nucleotidases may contribute counterbalancing the reduced activity of membrane-bound ectonucleotidases in certain inflammatory conditions or trauma where the integrity of the blood vessel is impaired (Yegutkin et al., 2003). Mice NTPDase 1 knockout exhibited perturbation in vasculature and immune systems and presented hemostatic and thromboregulatory disturbances (Enjyoji et al., 1999), and NTPDase 1-null hearts have been shown to develop thrombotic infarcts (Imai et al., 2000). Moreover, the recombinant soluble form of human NTPDase 1 was capable to inhibit thrombosis and tissue injury (Pinsky et al., 2002). Therefore, NTPDases are important for hemostasis and thromboregulation.

Previous work of our group demonstrate that ATPase and ADPase activities exhibit a circadian temporal pattern in rat blood serum, with the highest enzymes activities during the dark period (Detanico et al., unpublished results), which corresponds to the period of greatest activity in rodents. This increase in enzymatic activities during the night phase is accompanied by an increase in secretion of melatonin, corticosterone (Detanico et al., unpublished results)

and an increase in sympathetic activity, since rodents (e.g. rats) are nocturnal animal and its activity increases during the dark period. In this sense, the present study investigated the physiological effects *in vivo* and *in vitro* of melatonin, dexamethasone (to mimics endogenous corticosterone levels) and norepinephrine (to mimics the effects of sympathetic activation) upon nucleotides hydrolysis in rat blood serum.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals: Male Wistar rats (50-70 days old; 150-240 g of weight). The animals were housed in groups of 4-5 in home cages made of Plexiglass (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust. They were maintained under a standard 12 h-light/dark cycle [lights on at 07:00 h and off at 19:00 h, in a controlled environment ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, rat chow and water *ad libitum*). Declaration of Helsinki and the National Institutes of Health (NIH) "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments. The protocol of this experimental study was approved by the Ethics Committee at the Institution where the work was conducted.

2.2. Experimental Design: Rats were habituated to the maintenance room for two weeks before the beginning of experiment. For all experiments, the animals were killed around of 08:00 h (light phase), since, in this time, the enzymes activities (ATPase and ADPase) are low when compared with the dark phase (Detanico et al., unpublished results), similarly with the secretion of hormones melatonin and corticosterone, and the sympathetic activity. For this purpose, individual rats were quickly transferred to a separate room and decapitated within 1 min without anaesthesia. Trunk blood was drawn and blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 min at $5000 \times g$ at room temperature (Yegutkin, 1997). Serum was obtained and frozen at -20°C until the enzymatic assays perform.

2.3. *In vivo* treatments: Animals receive one single intraperitoneal injection of physiological dose of melatonin (0.05 mg/kg of body weight, dissolved in 0.4% ethanol solution) (Somova et al., 2001), dexamethasone sodium phosphate (0.1 mg/kg of body weight - an appropriate dose of exogenous corticoid that mimics the surge in serum endogenous corticosterone levels, dissolved in 0.9% saline) (Hwang and Henning, 2000) and norepinephrine (0.03 mg/kg of body weight, dissolved in 0.9% saline) (Iversen and Whitby, 1962). Controls received a single injection of saline (0.9% NaCl). After 30 minutes, blood samples were taken and used for the enzymatic assays.

2.4. *In vitro* treatments: Melatonin, dexamethasone and norepinephrine were added directly to reaction medium before the preincubation with rat blood serum and maintained throughout the

enzyme assays. The compounds were tested at final physiological concentration of 1 nM (Blask et al., 1997), 1 μ M (Runge et al., 1991) and 1 nM (Seya et al., 2006; Trabold et al., 2007), respectively. The control samples were performed without compounds addition.

2.5 Enzymatic assay: ATP and ADP hydrolysis were performed using a modification of the method described by Oses and colleagues (2004). The reaction mixture, containing 0.5 to 1.0 mg serum protein in 112.5 mM Tris–HCl, pH 8.0, was preincubated for 10 min to equilibrate the mixture. The reaction was started by the addition of ATP or ADP (final concentration of 3.0 mM) and the incubation was performed at 37 °C in a final volume of 200 μ l, for 40 min. The reaction was stopped by the addition of 200 μ l 10% trichloroacetic acid (TCA). All samples were centrifuged at 5000 x g for 5 min to eliminate precipitated protein and the supernatant was used for the colorimetric assay. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the Malachite green method (Chan et al., 1986).

For all enzyme assays, incubation times, substrate and protein concentrations were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. All samples were run in triplicate. In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. The protein concentration was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Enzyme activities were expressed as nanomoles of inorganic phosphate (Pi) released per minute per milligram of protein (nmol Pi/min/mg protein). All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.6 Statistical analysis: Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The comparison among groups was analyzed by One-Way ANOVA followed by the Tukey's test. Differences between groups were considered significant for $P < 0.05$. SPSS 17.0 for Windows was used for statistical analysis.

3. RESULTS

We evaluated the effects *in vivo* (acute treatment) and *in vitro* of melatonin, dexamethasone and norepinephrine on ATP and ADP hydrolysis in rat blood serum.

The *in vivo* treatment with physiological dose of melatonin and dexamethasone did not alter neither ATPase (Fig. 1A) nor ADPase (Fig. 1B) activities. On the other hand, physiological dose of norepinephrine increased significantly (44.1%) ATP ($F_{3,19}=8.780$, $P < 0.001$) and (37.28%) ADP ($F_{3,19}=9.561$, $P < 0.001$) hydrolysis (Fig. 1A and 1B, respectively).

The *in vitro* experiments were carried out in order to verify if melatonin, dexamethasone and norepinephrine treatments could modify the soluble nucleotidases activities by direct mechanisms. The samples that received norepinephrine demonstrated a significant increase in (36.63%) ATP ($F_{3,14}=4.009$, $P < 0.05$) and in (22.43%) ADP ($F_{3,14}=7.371$, $P < 0.05$) hydrolysis in blood serum (Fig. 2A and 2B, respectively). ATP and ADP hydrolysis were not affected by melatonin and dexamethasone at physiological concentration (Fig. 2).

4. DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that ATPase and ADPase activities are sensitive to both *in vitro* and *in vivo* norepinephrine treatments in rat blood serum. In both treatments, a physiological concentration of norepinephrine caused an increase in the hydrolysis of adenine nucleotides (ATP and ADP). In contrast, melatonin and dexamethasone treatments did not promote alteration in these nucleotides hydrolysis. We investigate the possible influence of norepinephrine, since its released with ATP and soluble nucleotidases, on the path of nucleotidases through *in vivo* experiment. Single dose of NE mimicked circulating norepinephrine physiological levels. Circulating levels of norpepinephrine modulate positively adenine nucleotides hydrolysis in *in vivo* experiment. These findings lead us to investigation of possible direct effects of NE upon soluble nucleotidases in serum. Thus we tested the *in vitro* effect of a physiological concentration of NE in ATP and ADP degradation pathway. In experiments *in vitro*, the stimulation observed on ATP and ADP hydrolysis may be due to direct effect of NE on structure of soluble NTPDases in rat blood serum.

ATP is released as a cotransmitter, together with NE from perivascular sympathetic nerves (Burnstock, 1990). ATP released as a sympathetic cotransmitter causes rapid vasoconstriction via ionotropic P2X₁ receptors, and norepinephrine are slower due to G protein-coupled receptors. The result is a synergistic action of both neurotransmitters (Ralevic and Burnstock, 1990). In blood vessels, in which ATP is released from sympathetic perivascular nerves, there is a mechanism in which the ATP release can be regulated through its own release, since adenosine can be formed through ATP breakdown by enzymes ectonucleotidases. Adenosine via presynaptic A₁ receptor inhibits ATP and NE release (Brown and Collis, 1983; Illes et al., 1988). In addition of ATP and NE cotransmission, soluble nucleotidases seems to be coreleased with them from several postganglionic sympathetic nerves using guinea pig and rabbit vas deferens as model (Todorov et al., 1997; Mihaylova-Todorova et al., 2002; Westfall et al., 2000). These soluble nucleotidases released upon sympathetic stimulation breakdown ATP as well as ADP to AMP exhibit pharmacological similarities with the NTPDases-like activity (Mihaylova-Todorova et al., 2002). In this line, it was demonstrated that NE release promoted by ATP was potentiated by the nucleotidase inhibitor and inhibited by soluble form of human NTPDase1 observed in cardiac sympathetic nerve terminals, proposing

that nucleotidases control the NE release by decreasing the concentration of extracellular ATP (Sesti et al., 2002). Interestingly enough, the modulatory action of ATP upon NE release in sympathetic nerve involves P2X (positively) and P2Y (negatively) receptors (Sesti et al., 2002), lower concentrations of ATP activate P2Y receptor, whereas higher concentrations of ATP activate P2X receptor (Barnard, 2000). In this context, a number of studies indicate the existence of an interaction between the purinergic signaling system and the sympathetic autonomic system.

It is interesting to note that a recent study from our group examining a possible temporal variation in the nucleotidases activities found an increase in nucleotide hydrolysis during the dark phase in rat blood serum (Detanico et al., unpublished results). During the dark cycle (time of greatest activity in rodents) there is an increase in sympathetic activity compared with the light cycle, and consequently, increased circulating norepinephrine. This enhance in sympathetic activity was confirmed by plasma levels of melatonin (Detanico et al., unpublished results), which is considered a marker of sympathetic activity (Miller et al., 2001; Markus et al., 2009). This increased ATP and ADP hydrolysis during the dark period of rats, may be due to direct modulation of NE on nucleotidases (probably NTPDases-like) activities.

Enhanced adrenergic activity and NE release are recognized as causes of clinical cardiac dysfunction such as arrhythmias, myocardial ischemia, sudden cardiac death and hypertension (Westfall and Meldrum, 1985; Braunwald and Sobel, 1988; Kubler and Strasser, 1994; Benedict et al., 1996). The NTPDase could exert a cardioprotective action by reducing NE release via ATP breakdown (Sesti et al., 2002). Taken together, increased activities of soluble nucleotidases by NE observed in this study raises the notion that in states of sympathetic hyperactivation this enzymatic modulation can be of great interest to therapeutic approach of cardiovascular disease.

In conclusion, this study observed that treatment with exogenous NE (physiological concentration), in order to mimic sympathetic activation, exerts a positive modulatory action on the hydrolysis of adenine nucleotides. This effect suggests a modulatory role of norepinephrine on nucleotidases pathway, possibly inducing a decrease of extracellular ATP and ADP concentrations and, consequently, contributing to the inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. These findings raise the notion that NE might modulates its own release by

increasing nucleotidases soluble activities and diminishing the circulating ATP concentration. Our study suggests a novel pathway that regulates NE release.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Brazilian Funding Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Dr. I.L.S., Torres); Graduate Research Group (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Dr I.L.S, Torres– Grant # 08-150); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (J.R., Rozisky; B.C., Detanico).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Barnard EA. (2000) Imagination and reality in the search for the P2Y receptors. *J Auton Nerv Syst.* 81:10–15.
- Benedict CR, Shelton B, Johnstone DE, Francis G, Greenberg B, Konstam M, Probstfield JL, Yusuf S. (1996). Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators. *Circulation* 15;94(4):690-7.
- Blask DE, Wilson ST, Zalatan F. (1997). Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer Res.* 15;57(10):1909-14.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Braunwald E, Sobel BE. (1988). Coronary blood flow and myocardial ischemia, in *Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine* (Braunwald E ed) pp 1191-1221, W. B. Saunders, Philadelphia.
- Brown CM, Collis MG. (1983). Adenosine A1 receptor mediated inhibition of nerve stimulation-induced contractions of the rabbit portal vein. *Eur. J. Pharmacol.* 30;93(3-4):277-82.
- Burnstock G. (1990). Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *J Hypertens Suppl.* 8:95-106.
- Burnstock G. (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:166-176.
- Burnstock G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:575-590.
- Chan KM, Delfert D, Junger KD. (1986). A direct colorimetric assay for Ca²⁺ -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157:375-380.
- Enyoloji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. (1999). Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* 5:1010-1017.
- Erlinge D, Burnstock G. (2008). P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal.* 4:1-20.
- Furukoji E, Tanaka N, Yamashita A, Matsumoto M, Fujimura Y, Yamamoto R, Tamura S, Asada

- Y. (2008). Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction. *Thromb. Res.* 121:583-585.
- Hwang ST, Henning SJ. (2000). Hormonal regulation of expression of ileal bile acid binding protein in suckling rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278(6):R1555-63.
- Illes P, Jackisch R, Regenold JT. (1988). Presynaptic P1-purinoceptors in jejunal branches of the rabbit mesenteric artery and their possible function. *J. Physiol.* 397:13-29.
- Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Kaczmarek E, Csizmadia E, Bach FH, Robson SC. (2000). Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 70:864-870.
- Iversen LL, Whitby LG. (1962). Retention of injected catechol amines by the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 19:355-64.
- Jacobson KA, Gao ZG. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 5:247-264.
- Kübler W, Strasser RH. (1994). Signal transduction in myocardial ischaemia. *Eur. Heart J.* 15(4):437-45.
- Kunapuli SP, Daniel JL. (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336:513-523.
- Markus RP, Franco DG, Carvalho LA, Gentil V, Gorenstein C. (2009). Acute increase in urinary 6-sulfatoximelatonin after clomipramine, as a predictive measure for emotional improvement. *J P.sychopharmacol.* 24:855-860.
- Mihaylova-Todorova ST, Todorov LD, Westfall DP. (2002). Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:992-1001.
- Miller HL, Ekstrom RD, Mason GA, Lydiard RB, Golden RN. (2001). Noradrenergic function and clinical outcome in antidepressant pharmacotherapy. *Neuropsychopharm.* 24:617-623.
- Motte S, Communi D, Piroton S, Boeynaems JM. (1995). Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27:1-7.
- Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rucker B, Furstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ. (2004). Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide

- hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci.* 74:3275-3284.
- Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES, Jr, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR. (2002). Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 109:1031-1040.
- Ralevic V. (2009). Purines as neurotransmitters and neuromodulators in blood vessels. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 7(1):3-14. Review.
- Ralevic V, Burnstock G. (1990). Postjunctional synergism of noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in the mesenteric arterial bed of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 175:291-299.
- Ralevic V, Burnstock G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- Robson SC, Wu Y, Sun XF, Knosalla C, Dwyer K, Enyoji K. (2005). Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 31:217-233.
- Runge D, Schmidt H, Christ B, Jungermann K. (1991). Mechanism of the permissive action of dexamethasone on the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 15;198(3):641-9.
- Rücker B, Oses JP, Kirst IB, Berti SL, Bonan CD, Battastini AM, Sarkis JJ. (2003). Effects of phenylalanine and phenylpyruvate on ATP-ADP hydrolysis by rat blood serum. *Amino Acids.* 24:383-238.
- Sesti C, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Marcus AJ, Levi R. (2002). EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:605-611.
- Seya Y, Fukuda T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K. (2006). Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 28;553(1-3):54-60.
- Somova EV, Kolodub FA, Bondarenko LA. (2001). Chronobiological aspects of melatonin-produced antioxidant effects in senescent rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 132(3):887-9.
- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP. (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature* 387:76-79.

- Trabold B, Gruber M, Fröhlich D. (2007). Functional and phenotypic changes in polymorphonuclear neutrophils induced by catecholamines. *Scand. Cardiovasc. J.* 41(1):59-64.
- Westfall TC, Meldrum MJ. (1985). Alterations in the release of norepinephrine at the vascular neuroeffector junction in hypertension. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25:621-41. Review.
- Westfall TD, Menzies JR, Liberman R, Waterston S, Ramphir N, Westfall DP, Sneddon P, Kennedy C. (2000). Release of a soluble ATPase from the rabbit isolated vas deferens during nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 131(5):909-14.
- Westfall DP, Todorov LD, Mihaylova-Todorova ST. (2002). ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303(2):439-44. Review.
- White N, Burnstock G. (2006). P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:211-217.
- Yegutkin GG. (1997). Kinetic analysis of enzymatic hydrolysis of ATP in human and rat blood serum. *Biochemistry (Mosc)* 62:619-622.
- Yegutkin GG, Samburski SS, Jalkanen S. (2003). Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J.* 17:1328-1330.
- Yegutkin GG. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta.* 1783:673-694.
- Zimmermann H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 362:299-309.
- Zimmermann H, Braun N. (1999). Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog. Brain. Res.* 120:371-385.

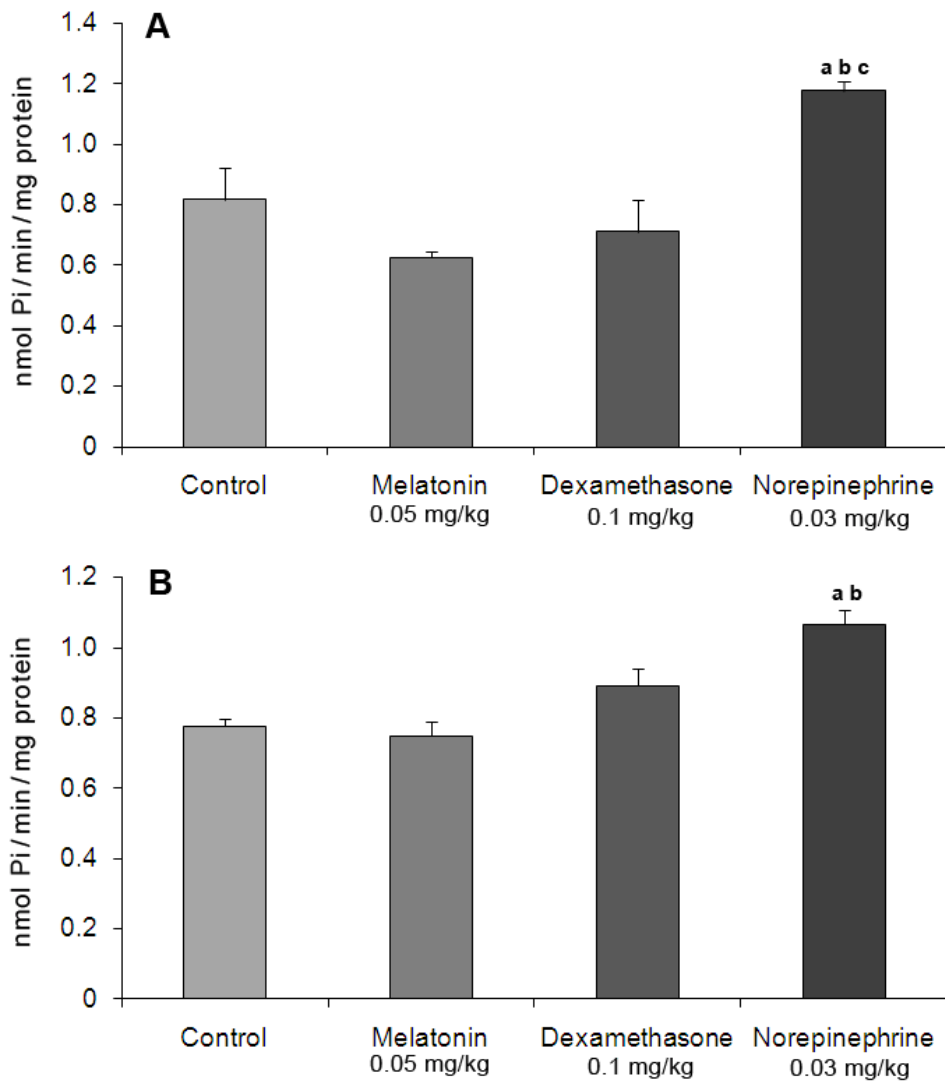
LEGENDS

Figure 1. *In vivo* effects of physiological dose of melatonin, dexamethasone and NE on ATPase (A) and ADPase (B) activities in blood serum. Values are expressed as mean \pm S.E.M. specific activity (nmoles of Pi produced/min/mg protein). Number of animals per group = 4-6. ^a indicates significant different from control, ^b indicates significant different from melatonin and ^c indicates significant different from dexamethasone (One-Way ANOVA/Tukey, P < 0.001).

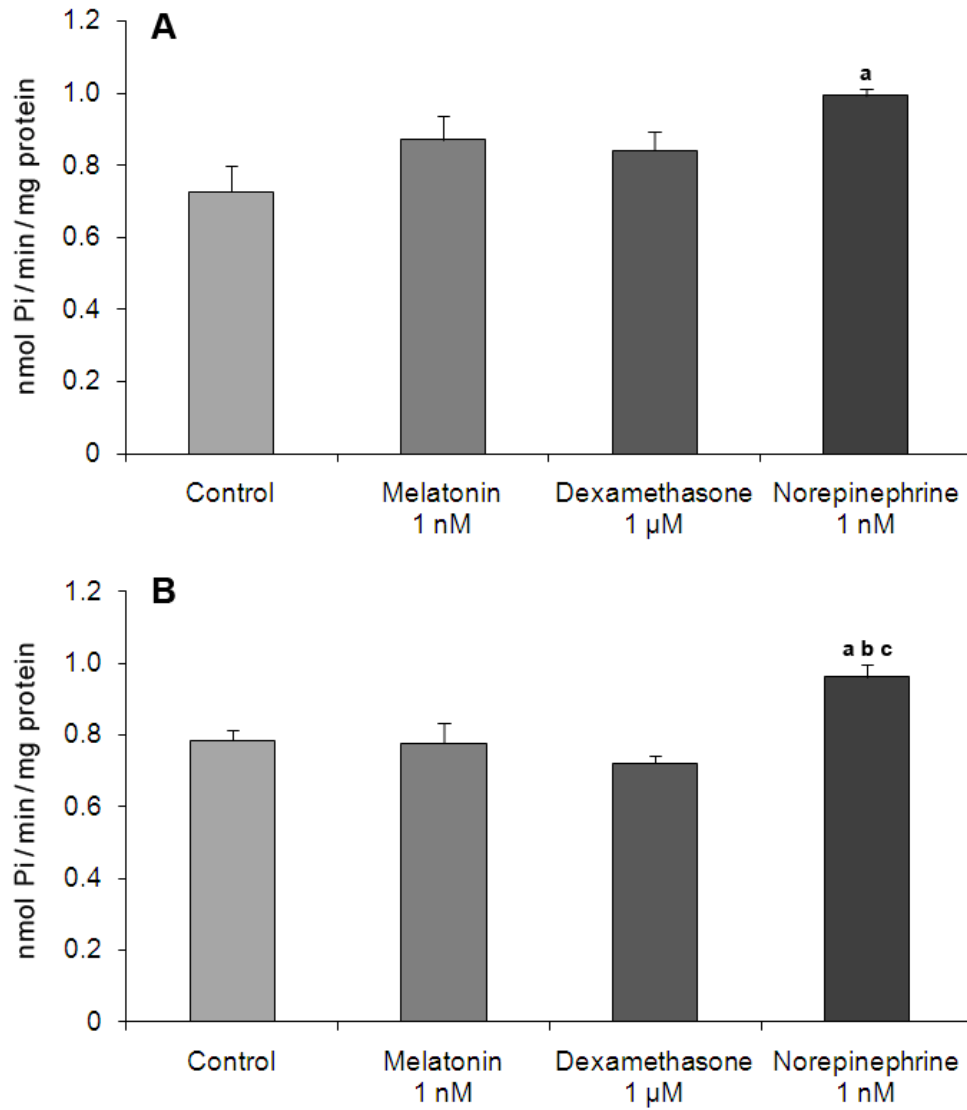
Figure 2. Effects of *In vitro* treatments with physiological concentration of melatonin, dexamethasone and NE upon ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in serum. Values are expressed as mean \pm S.E.M. specific activity (nmoles of Pi produced/min/mg protein). Number of animals per group = 3-4. ^a indicates significant different from control, ^b indicates significant different from melatonin and ^c indicates significant different from dexamethasone (One-Way ANOVA/Tukey, P < 0.05).

FIGURES

1. *In vivo* effects of physiological dose of melatonin, dexamethasone and norepinephrine on ATPase (A) and ADPase (B) activities in blood serum.



2. Effects of *In vitro* treatments with physiological concentration of melatonin, dexamethasone and norepinephrine upon ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in serum.



CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo, observamos que enzimas solúveis responsáveis pela hidrólise do ATP e ADP apresentam uma variação temporal em soro de ratos. A hidrólise destes nucleotídeos foi maior durante a fase escura em comparação com a fase clara. Este aumento nas atividades enzimáticas é acompanhado de um aumento na secreção de corticosterona e melatonina (marcadores de ritmos circadianos) e na atividade simpática. A influência dos níveis de melatonina e de dexametasona (mimetizar a corticosterona endógena) sobre a hidrólise dos nucleotídeos de adenina não foi significativa nos experimentos *in vivo* e *in vitro* em comparação com os controles. Por outro lado, o tratamento com norepinefrina (mimetizar ativação simpática) aumentou a hidrólise do ATP e do ADP em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Portanto, sugerimos que a norepinefrina (concentração fisiológica) pode modular diretamente as atividades enzimáticas das nucleotidases presentes no soro e pode ser a responsável pelo aumento das atividades ATPásica e ADPásica durante a fase escura.

ANEXOS

1. Outros trabalhos realizados durante o mestrado:

1.1. Andressa de Souza, Bernardo Carraro Detanico, Liciane Fernandes Medeiros, Joanna Ripoll Rozisky, Wolnei Caumo, Maria Paz Loayza Hidalgo, Ana Maria Oliveira Battastini, Iraci Lucena da Silva Torres. *Effects of restraint stress upon temporal patterns of adenine nucleotides hydrolysis in rat blood serum.* Artigo submetido à revista Stress, Abril 2010.

1.2. Andressa De Souza, Bernardo Carraro Detanico, Liciane Fernandes Medeiros, Joanna Ripoll Rozisky, Vanessa Scarabelot, Wolnei Caumo, Maria Paz Loayza Hidalgo, Iraci Lucena Da Silva Torres. *Effect of the stress in the levels of systemic biomarkers of temporal pattern.* Artigo submetido à revista Neuroendocrinology, Junho 2010.

1.3. Andressa de Souza, Liciane Fernandes Medeiros, Joanna Ripoll Rozisky, Bernardo C. Detanico, Ionara Rodrigues Siqueira, Wolnei Caumo, Maria Paz Loayza Hidalgo, Iraci Lucena da Silva Torres. *Evaluation of effect of temporal patterns in behavioral response by restraint stress in rats.* Manuscrito em preparação.

1.4. Liliane P Vidor, DDS, Iraci S Torres, Izabel Cristina C de Souza, Andressa Souza, Pharm, Bernardo C Detanico, Wolnei Caumo. *Efficacy of melatonin in treating chronic myofascial face pain: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study.* Artigo submetido ao periódico Pain, Maio 2010.

