

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS AÇÕES DA MELATONINA
SOBRE A SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA P2Y₁ ENDOTELIAL
ENVOLVIDA NA ADESÃO LEUCOCITÁRIA

TASSYA CATALDI CARDOSO

RIO DE JANEIRO
2015

Avaliação Farmacológica das Ações da Melatonina sobre a Sinalização Purinérgica P2Y₁ Endotelial Envolvida na Adesão Leucocitária

Tassya Cataldi Cardoso

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências biológicas (Farmacologia e Química Medicina), do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Lucia Martins da Silva

RIO DE JANEIRO
2015

C268a Cardoso, Tassya Cataldi
Avaliação Farmacológica das Ações da Melatonina
sobre a Sinalização Purinérgica P2Y1 Endotelial
Envolvida na Adesão Leucocitária / Tassya Cataldi
Cardoso. -- Rio de Janeiro, 2015.
80 f.

Orientadora: Claudia Lucia Martins da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências
Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

1. ENDOTÉLIO. 2. PURINÉRGICO. 3. MONÓCITO. 4.
ATEROSCLEROSE. 5. MELATONINA. I. Silva, Claudia
Lucia Martins da , orient. II. Título.

Tassya Cataldi Cardoso

**Avaliação Farmacológica das Ações da Melatonina sobre a Sinalização
Purinérgica P2Y₁ Endotelial Envolvida na Adesão Leucocitária**

Aprovada por:

Profa. Dra. Cláudia Lucia Martins da Silva, ICB - UFRJ

Profa. Dra. Lucienne da Silva Lara Morcillo, ICB - UFRJ

Profa. Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda, ICB - UFRJ

Profa. Dra. Josiane Sabbadini Neves, ICB - UFRJ

Profa. Dra. Mariana Sá Pereira, IBqM – UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me conduzido ao longo de mais uma jornada.

A minha mãe Martha pela dedicação e paciência durante toda minha vida, por acreditar nas minhas escolhas e respeitá-las. Meu pai Claudio por me fazer acreditar que a vida pode ser mais descontraída e ainda assim dar certo e por ter financiado a minha educação. Aos meus irmãos Pedro, Pilar e Maria Eduarda agradeço pelo amor e alegria que transborda de seus gestos e olhares.

Ao meu companheiro Thiago que esteve ao meu lado me incentivando a todo o momento e acreditou mais em mim do que eu mesma.

A todos os meus amigos e familiares que compartilham comigo as angustias desse período.

Agradeço a todos LFBM pela acolhida e pela companhia.

A professora Claudia Lucia Martins da Silva agradeço pela confiança depositada desde o primeiro momento. Agradeço pelo comprometimento com o projeto e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais.

A minha amiga Aline Reis de Carvalho que viveu comigo o mestrado desde quando ainda era apenas um sonho.

A Thaís Emanuelle Tavares Pompeu que me fez ter certeza que a primeira impressão não é a que fica. Seu ar sério é apenas concentração. Uma pessoa maravilhosa, atenciosa, amiga sincera e disposta a ajudar sempre.

A Jainne Martins Ferrreira por dispor seu tempo para transmitir seu conhecimento.

A Suellen D'arc dos Santos Oliveira a quem eu devo a base das principais técnicas desenvolvidas no laboratório. Um exemplo a ser seguido, dedicada, organizada prestativa e amorosa.

Natasha, Fernanda, Luciana pela amizade, carinho e por todas as risadas.

Aos membros da banca pelo aceite.

As professoras Ana Luisa Palhares de Miranda e Josiane Sabbadini Neves pela gentileza ao disponibilizarem seus laboratórios e alunos em prol do desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Dr. Cleverton Kleiton Freitas de Lima, a Renata Batista Reis e a Dra. Grasiella Ventura Matioszek pela disponibilidade de dedicarem parte do seu tempo para o desenvolvimento do meu projeto.

As agencias de fomento FAPERJ, CAPES e CNPq.

RESUMO

CARDODO, TASSYA CATALDI. Avaliação farmacológica das ações da melatonina sobre a sinalização purinérgica P2Y₁ endotelial envolvida na adesão leucocitária. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

A ativação de células endoteliais em um processo inflamatório muda o seu fenótipo aumentando exposição membranar de moléculas de adesão que favorece a adesão e migração das células imunes. A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal responsável pelo controle do ritmo circadiano, dentre outras funções. Anteriormente foi descrito que a melatonina inibe a adesão de neutrófilos ao endotélio *in vivo* e *in vitro*. A sinalização purinérgica é um importante regulador do processo inflamatório. Animais deficientes em receptores purinérgicos P2Y₁ (P2Y₁R) e com processo aterosclerótico (apo E^{-/-}), apresentam menor rolamento de leucócitos e expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais frente ao estímulo com TNF- α . O objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* o efeito da melatonina sobre a sinalização endotelial purinérgica P2Y₁R envolvida na adesão leucocitária. A ativação dos P2Y₁R com o agonista 2MeSATP 60 μ M (4h) aumentou a adesão de células mononucleares à monocamada de células endoteliais mesentéricas de rato. O efeito foi inibido pelo MRS2179, um antagonista seletivo dos P2Y₁R. A pré-incubação com melatonina (30 nM) inibiu a adesão leucocitária, com envolvimento de receptores de melatonina MT₁ e/ou MT₂. Descartamos a participação das citocinas TNF- α e IL-1 β no efeito endotelial do 2MeSATP, e também uma possível redução da expressão de P2Y₁R mediada por melatonina. Contudo, observamos que a inibição da mobilização de cálcio intracelular inibiu a adesão leucocitária à monocamada endotelial por estímulo do P2Y₁R. Ademais, a ativação dos P2Y₁R alterou a distribuição membranar da molécula de adesão ICAM-1 e o pré-tratamento com melatonina preveniu este efeito. Concluímos que P2Y₁R tem efeito pró-inflamatório *per se*, e que a melatonina inibe a adesão leucocitária à célula endotelial da microcirculação mesentérica mediada por estes receptores, sendo esse efeito associado à modulação do cálcio intracelular e da exposição de ICAM-1. Portanto, a ação da melatonina pode representar uma nova via de sinalização endotelial com efeito antiinflamatório sobre o sistema vascular.

Palavras-chaves: endotélio, purinérgico, monócitos, aterosclerose, melatonina

ABSTRACT

CARDODO, TASSYA CATALDI. Avaliação farmacológica das ações da melatonina sobre a sinalização purinérgica P2Y₁ endotelial envolvida na adesão leucocitária. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

The endothelial cell activation in an inflammatory process changes their phenotype increasing the membrane adhesion molecules expression that promotes the adhesion and migration of immune cells. Melatonin is a hormone produced by the pineal gland, and it is responsible for the control of the circadian rhythm, among other functions. Previously it was reported that melatonin inhibits the adhesion of neutrophils to the endothelium *in vivo* and *in vitro*. The purinergic signaling is an important regulator of the inflammatory process. Mice deficient in purinergic receptors P2Y₁ (P2Y₁R), and with atherosclerosis (apo E^{-/-}), present lower rolling of leukocytes and expression of adhesion molecules on endothelial cells against the stimulation with TNF- α . The aim of this study was to investigate *in vitro* the effect of melatonin on endothelial signaling purinergic P2Y₁R involved in leukocyte adhesion. Activation of P2Y₁R with agonist 2MeSATP (60 μ M) increased the adhesion of mononuclear cells to the monolayer of rat mesenteric endothelial cells. The effect was inhibited by MRS2179, a selective P2Y₁R antagonist. Melatonin (30 nM) inhibited leukocyte adhesion most probably through melatonin receptors MT₁ and/or MT₂. We rule out the involvement of the cytokines TNF- α and IL-1 β in the endothelial effect of 2MeSATP. We also ruled out a possible reduction of P2Y₁R expression mediated by melatonin. However, we observed that the inhibition of intracellular calcium mobilization blunted the leukocyte adhesion to endothelial monolayer induced by P2Y₁R stimulation. Furthermore, activation of P2Y₁R modified membrane distribution of ICAM-1 adhesion molecule and pretreatment with melatonin prevented this effect. We conclude that P2Y₁R has a pro-inflammatory effect *per se*, and that melatonin inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells of the mesenteric microcirculation mediated by P2Y₁R. This effect was associated with the modulation of intracellular calcium and ICAM-1 exposure. Therefore, this effect of melatonin may represent a new endothelial cell signaling with vascular anti-inflammatory property.

Keywords: endothelium, purinergic, monocytes, atherosclerosis, melatonin

ABREVIATURAS

2MeSATP	2-metil-S-ATP
AAD	Descarboxilase de aminoácidos aromáticos
AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
BAPTA-AM	Ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (acetoximetil)
COX	Ciclooxygenase
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
ESAM	Moléculas de adesão específicas do endotélio
fMLP	Formil-metil-leucil-fenilalanila
FN	Fibronectina
GPCR	Receptore acoplado à proteína G
HIOMT	Hidroxi-indol-O-metiltransferase
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
JAM	Moléculas de adesão juncional
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	Antígeno associado à função de linfócito-1
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
NAS	N-acetilserotonina
NO	Óxido nítrico
NOS _e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS _i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS _n	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
P2Y ₁ R	Receptor P2Y ₁
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos

PECAM-1	Molécula de adesão endotelial e plaquetária tipo 1
PGI ₂	Prostaciclina
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PSGL-1	Glicoproteína ligante de P-selectina
QR2	Quinona redutase 2
ROR	Receptores órfãos para retinóide
RZR	Receptor Z para retinóide
SCN	Núcleos supraquiasmáticos
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
TPH	Triptofano hidroxilase
UDP	Difosfato de uridina
UTP	Trifosfato de uridina
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VE-caderina	Caderina do endotélio vascular
Vin	Vinculina
VLA-4	Antígeno tardio-4
VN	Vitronectina
WPB	Corpos de Weibel-Palade
ZO	Proteína da zona ocludente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das camadas que compõem a parede vascular.....	14
Figura 2: Organização das junções intercelulares e matriz extracelular.....	16
Figura 3: Etapas da interação leucócito célula endotelial que culminam na transmigração.....	18
Figura 4: Ativação de célula endotelial do tipo I iniciada por estímulo a receptor acoplado a proteína G (GPCR).....	22
Figura 5: Ativação de célula endotelial do tipo II em resposta ao estímulo por citocinas, dependente de expressão gênica.....	23
Figura 6: Etapas sequenciais da síntese da melatonina a partir do aminoácido triptofano.....	25
Figura 7: Representação ilustrativa dos receptores de melatonina.....	27
Figura 8: Sinalização purinérgica.....	30
Figura 9: Esquema ilustrando a obtenção de células endoteliais mesentéricas para o preparo de cultura primária.....	37
Figura 10: Caracterização morfológica das células endoteliais.....	37
Figura 11: Tratamentos farmacológicos realizados durante o ensaio de adesão.....	39
Figura 12: Adesão de leucócitos à monocamada endotelial mediada por receptores P2Y ₁	44
Figura 13: Adesão de leucócitos as células endoteliais mesentéricas tratadas com melatonina.....	45
Figura 14: Participação de receptores de melatonina MT na inibição da adesão de leucócitos as células endoteliais mesentéricas mediada por 2MeSATP.....	46
Figura 15: Luzindole (30 µM) bloqueia efeito da melatonina sobre a adesão leucocitária às células endoteliais mesentéricas mediada por 2MeSATP.....	47
Figura 16: Expressão dos receptores P2Y ₁ em células endoteliais mesentéricas....	48
Figura 17: Níveis de citocinas em sobrenadante de células endoteliais mesentéricas após estímulo com 2MeSATP.....	49
Figura 18: A inibição do aumento do cálcio intracelular impede a adesão leucocitária mediada por 2MeSATP.....	50
Figura 19: Expressão total da molécula de adesão ICAM-1 em células endoteliais mesentéricas.....	51

Figura 20: Quantificação da fluorescência relativa à imunomarcação de ICAM-1 em células endoteliais mesentéricas de rato.....	52
Figura 21: Alteração da disposição membranar de ICAM-1 nas células endoteliais mesentéricas.....	53
Figura 22: Análise da marcação de F-actina por faloidina em células endoteliais mesentéricas de rato.....	55
Figura 23: Efeito inibitório da melatonina na adesão leucocitária endotelial mediada por receptor P2Y ₁	64

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1. Célula endotelial.....	14
1.1.1. Funções do endotélio.....	17
1.2. Adesão leucocitária ao endotélio.....	18
1.2.1. Moléculas envolvidas na adesão leucocitária.....	19
1.2.2. Ativação endotelial.....	21
1.3. Melatonina.....	24
1.3.1. Receptores de melatonina.....	26
1.3.2. Melatonina e a inflamação.....	29
1.4. Sinalização purinérgica.....	29
1.4.1. Receptor purinérgico P2Y ₁	31
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. Material e métodos	35
3.1. Animais.....	36
3.2. Cultura primária de células endoteliais mesentéricas.....	36
3.3. Ensaio de adesão de leucócitos à monocamada endotelial.....	37
3.4. <i>Western blotting</i>	39
3.5. Dosagem de IL-1 β e TNF- α	40
3.6. Imunofluorescência.....	40
3.7. Análise de citoesqueleto com faloidina.....	41
3.8. Análise dos dados.....	41
3.9. Reagentes.....	42
4. Resultados	43
4.1. Envolvimento do receptor P2Y ₁ na adesão leucocitária à monocamada de células endoteliais mesentéricas murinas.....	44
4.2. Melatonina inibe a adesão leucocitária mediada por 2MeSATP à monocamada endotelial.....	45
4.3. Avaliação dos níveis de TNF- α e IL1- β no sobrenadante de células endoteliais mesentéricas após estímulo com 2MeSATP.....	48

4.4. Papel da mobilização de cálcio intracelular sobre a interação células mononucleares-célula endotelial mesentérica	50
4.5. Avaliação da expressão de ICAM-1 em células endoteliais mesentéricas: estudos de Western blot e microscopia confocal.....	51
5. Discussão.....	56
6. Conclusão.....	65
7. Referências Bibliográficas.....	67

Introdução

1.1. Célula endotelial

Os vasos sanguíneos são responsáveis pelo transporte de sangue por todo organismo. Resumidamente, a parede vascular é constituída por três camadas: (1) túnica íntima é a camada mais interna e inclui o revestimento endotelial; (2) túnica média é a camada intermediária sendo constituída por células musculares lisas; (3) túnica adventícia é a camada mais externa e por onde a inervação penetra na parede vascular (Figura 1).

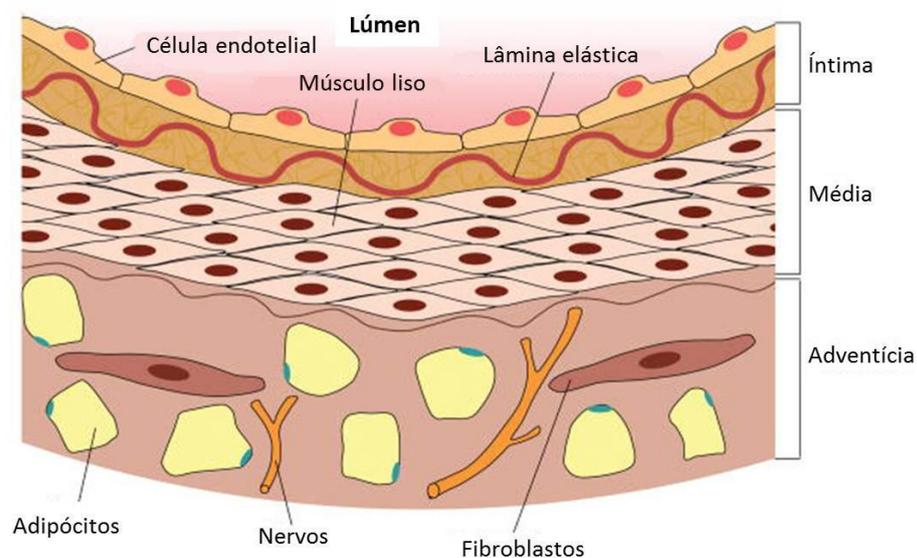


Figura 1: Representação das camadas que compõem a parede vascular. Camadas íntima, média e adventícia (SALISBURY *et al.*, 2012).

Em função da sua localização, o endotélio está na interface entre o sangue e os tecidos (ROSS *et al.*, 1995). O endotélio vascular está presente em todos os tecidos e órgãos, contudo, cada leito vascular apresenta estruturas e propriedades funcionais únicas, havendo variações fenotípicas ao longo das porções vasculares e entre veias e artérias (SUMPIO *et al.*, 2002; AIRD, 2007a).

A integridade da estrutura endotelial confere a essas células uma função de barreira. Citoesqueleto, junções celulares, matriz extracelular, glicocálix e membrana celular são os constituintes celulares que conferem uma permeabilidade baixa e seletiva de fluidos e solutos em condições fisiológicas. Condições patológicas promovem uma disfunção da barreira endotelial alterando a permeabilidade (YUAN e RIGOR, 2010).

O glicocálix reveste a superfície endotelial, sendo constituído de proteoglicanos e glicosaminoglicanos que conferem carga negativa a essa estrutura. Representa a primeira barreira à passagem de macromoléculas pelo endotélio e atua também como um mecanorreceptor, percebendo alterações do fluxo sanguíneo (MICHEL e CURRY, 1999; FLORIAN *et al.*, 2003; REITSMA *et al.*, 2007).

A interação da célula endotelial com a matriz extracelular também auxilia a estabilização da barreira endotelial (DEL ZOPPO e MILNER, 2006). Esta interação ocorre por meio de integrinas que se mantêm estabilizadas por conexões intracelulares com o citoesqueleto através de proteínas como a talina, viculina e α -actina. As integrinas ligam-se à matriz através das proteínas fibronectina, vitronectina, colágeno, fibrinogênio e laminina (PETIT e THIERY, 2000) (Figura 2).

A integridade da barreira endotelial é possibilitada ainda por junções que podem ser aderentes, ocludentes ou *gap*, e que por meio de interações homofílicas de proteínas transmembranares mantêm a adesão entre as células endoteliais (BAZZONI e DEJANA, 2004). A associação das junções com o citoesqueleto é fundamental para estabilizá-las, e também para manter a forma e a polaridade da célula (HARTSOCK e NELSON, 2008) (Figura 2).

As junções ocludentes apresentam como principal constituinte as proteínas da família claudina e ocludina. Proteínas da família de moléculas de adesão juncional (JAM) e moléculas de adesão específicas do endotélio (ESAM) também estão presentes nas junções ocludentes (MEHTA e MALIK, 2006). Por meio de proteínas da zona ocludente (ZO) e α -catenina ligam-se ao citoesqueleto (GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2000). A presença de dessas junções difere em função do vaso, em vasos de maior calibre o sistema de junções ocludentes é mais desenvolvido (WALLEZ e HUBER, 2008) (Figura 2).

Nas células endoteliais as junções aderentes apresentam como principal constituinte a caderina do endotélio vascular (VE-caderina) que interage de maneira homofílica e dependente de cálcio com a célula adjacente. A porção intracelular da VE-caderina liga-se à β -catenina, γ -catenina, e p120-catenina. Por sua vez, α -catenina interage com β e γ -catenina e com a actina possibilitando a sinalização celular e a estabilidade da junção (LAMPUGNANI *et al.*, 1992; 1995) (Figura 2).

Junções do tipo *gap* são constituídas por hexâmero de conexinas, denominado connexon, formando poros intercelulares que podem estar em uma configuração aberta ou fechada (VAN RIJEN *et al.*, 1997). Permitem a transferência

de informações entre as células por meio de segundos mensageiros e propagam potencial de ação (CARTER *et al.*, 1996). A abertura e organização dos conexons são reguladas pela fosforilação das conexinas (TENBROEK *et al.*, 2001; COOPER e LAMPE, 2002) (Figura 2).

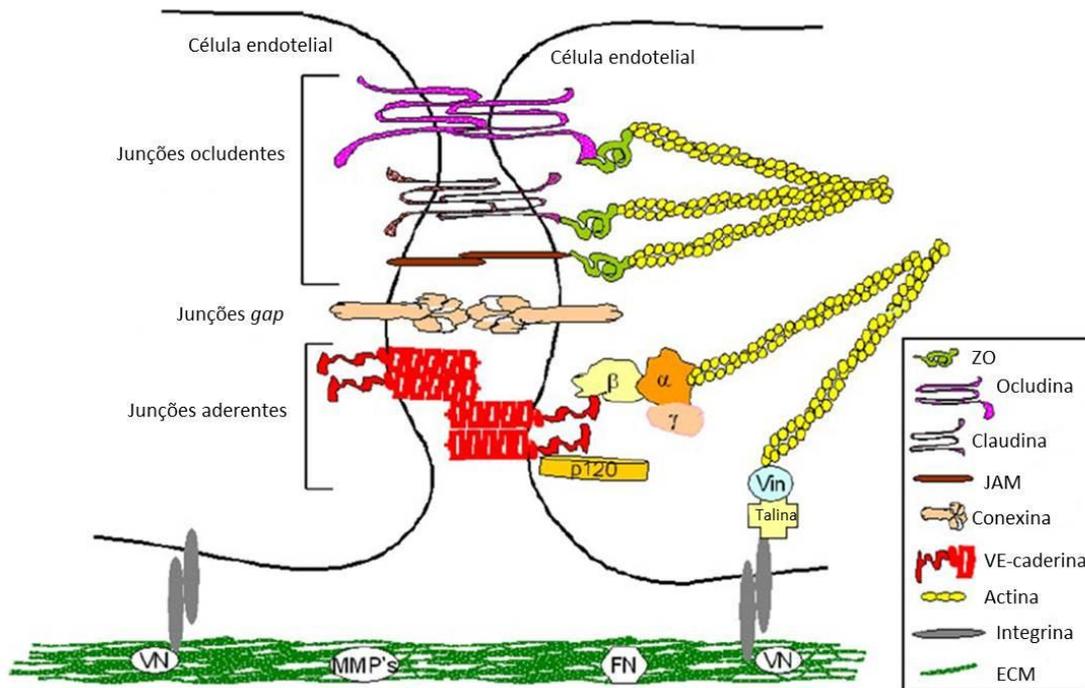


Figura 2: Organização das junções intercelulares e matriz extracelular. Junções aderentes, ocludentes e *gap* representando as junções entre células endoteliais adjacentes. Claudina, ocludina e JAM componentes das ocludentes interagindo com a actina do citoesqueleto por meio de proteína da zona ocludente (ZO). VE-caderina formando as junções aderentes conectada aos filamentos de actina através das moléculas β-catenina, γ-catenina, α-catenina e p120-catenina. Junções *gap* formadas por conexinas. Interação com a matriz extracelular. Proteínas fibronectina (FN) e vitronectina (VN) presentes na matriz conectadas as integrinas que interagem com o citoesqueleto através das proteínas Talina e vinculina (Vin) (MEHTA e MALIK, 2006).

Anteriormente, apenas as junções ocludentes e aderentes eram consideradas como participantes na regulação da permeabilidade vascular e migração leucocitária. No entanto, as junções *gap* também vêm sendo associadas a tais funções. Além disso, a interação entre as junções mostra-se fundamental para a integridade das mesmas e o remodelamento do citoesqueleto (Revisto em MEHTA e MALIK, 2006; WALLEZ e HUBER, 2008; DEJANA *et al.*, 2009).

1.1.1. Funções do endotélio

As células endoteliais são dinâmicas e desempenham diversas funções autócrinas e parácrinas na regulação da homeostasia, como regulação da agregação plaquetária, modulação do tônus vascular e da resposta inflamatória (SUMPIO *et al.*, 2002; AIRD, 2007).

As células endoteliais sofrem alterações fenotípicas e desta forma produzem moléculas anticoagulantes ou pró-coagulantes que conferem a esse grupo celular um papel determinante na hemostasia. A liberação do fator de Von Willebrand, do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) representa a regulação pró-coagulante do endotélio. Em contrapartida, a liberação do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂) refletem a ação anticoagulante da célula (AIRD, 2005).

O envolvimento da célula endotelial no controle do tônus vascular foi evidenciado por Furchgott e Zawadzki (1980) ao demonstrar que o relaxamento da musculatura lisa vascular da aorta de coelho mediado por acetilcolina era dependente de um fator inicialmente denominado “fator de relaxamento derivado do endotélio”, e cuja liberação dependia da integridade endotelial. Posteriormente este fator foi identificado como o radical livre NO (PALMER *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987). São conhecidas três subtipos da enzima NO sintase (NOS) sendo duas constitutivas, a endotelial (NOSe) e neuronal (NOSn), e outra induzida (NOSi) (revisto em FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

Uma série de moduladores e o próprio fluxo sanguíneo são capazes de induzir a liberação de substâncias vasoativas pelo endotélio. Por exemplo, NO e prostaciclina possuem ação vasodilatadora. Por outro lado, endotelina-1 tem ação vasoconstritora. Quando liberadas pelo endotélio estas substâncias modulam a musculatura lisa vascular de maneira parácrina (FELETOU e VANHOUTTE, 2006).

Condições associadas à disfunção endotelial têm como características a redução do relaxamento mediado por NO, redução da enzima NOS endotelial e aumento da adesão leucocitária. Esta disfunção endotelial favorece um quadro de inflamação vascular tal como é observado no diabetes e aterosclerose (MORDI e TZEMOS, 2014).

Na inflamação, as células endoteliais exercem um papel central no processo de recrutamento de leucócitos. Em repouso P-selectinas e quimiocinas estão

armazenadas nos corpos de weibel-palade (WPB), e VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina tem sua expressão suprimida o que desfavorece a interação com leucócitos. Durante o processo inflamatório essas células são ativadas passando por alterações fenotípicas que favorecem o recrutamento dos leucócitos circulantes (ALCAIDE *et al.*, 2009).

1.2. Adesão leucocitária ao endotélio

A resposta inflamatória é iniciada pela exposição de células da imunidade inata como macrófagos e leucócitos a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) como ATP e proteínas do choque térmico (WILLIAMS *et al.*, 2011). Essa exposição promove a adesão de leucócitos circulantes ao endotélio com posterior migração para o interstício (HE, 2010).

A migração de leucócitos, denominada transmigração ou diapedese, é a etapa final de uma cascata de interações leucócito-endotélio precedida pela captura, rolamento e adesão (Figura 3). Sendo esse recrutamento de leucócitos para o foco da inflamação essencial para a efetividade da resposta imune inata (SCHMIDT *et al.*, 2011; REGLERO-REAL *et al.*, 2012).

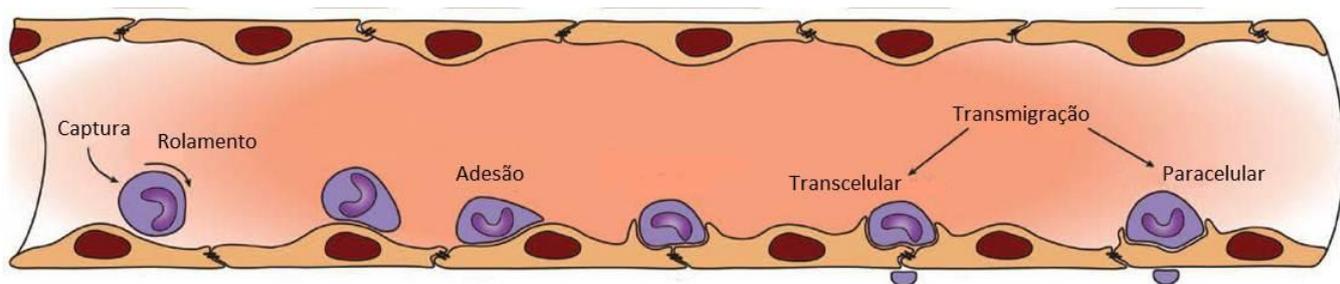


Figura 3: Etapas da interação leucócito célula endotelial que culminam na transmigração. A captura representa a etapa inicial do processo, seguido pelo rolamento, adesão firme e transmigração paracelular ou transcelular (HEEMSKERK *et al.*, 2014).

Fatores quimiotáticos agem sobre os leucócitos e também sobre as células endoteliais, essas quando ativadas desempenham um papel principal na adesão leucocitária ao endotélio sofrendo alterações conformacionais que facilitam a

sequência de etapas que culminam na transmigração leucocitária (WILLIAMS, 2011; YUAN *et al.*, 2012).

A captura e o rolamento dos leucócitos são mediados por E- e P-selectinas e por carboidratos expostos na superfície da célula endotelial ativada que interagem por meio de ligações fracas com L-selectinas e glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1) presentes nos leucócitos (LANGER e CHAVAKIS, 2009). Na etapa de adesão os leucócitos ativados por quimiocinas interagem mais firmemente através de integrinas com a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) presentes nas células endoteliais. Tais moléculas desempenham um papel central nessa etapa participando também da locomoção dos leucócitos aderidos, o que favorece a passagem dessas células através da barreira endotelial que pode ocorrer entre as células endoteliais ou através de uma única célula endotelial, transmigração paracelular ou transcelular, respectivamente (BARREIRO, 2007; WITTCHEN, 2009).

De tal maneira o processo de adesão leucócito-endotélio é regulado por uma ativação sequencial de diferentes famílias de moléculas de adesão expressas na superfície de leucócitos e células endoteliais (GRANGER e SENCHENKOVA, 2010). A adesão ocorre mais amplamente em vênulas pós-capilares do que em arteríolas; tal fato deve-se, possivelmente, as variações fenotípicas das células endoteliais em diferentes leitos vasculares (STEINHOFF *et al.*, 1993; IIGO *et al.*, 1997).

1.2.1. Moléculas envolvidas na adesão leucocitária

As selectinas são glicoproteínas que medeiam a interação inicial e de baixa afinidade dos leucócitos as células endoteliais durante a etapa de rolamento. Essa ligação transiente resulta em ativação de leucócitos e a subsequente adesão firme dessas células (ZARBOCK *et al.*, 2011). São descritas três selectinas: L-selectina, P-selectina e E-selectina (GOLIAS *et al.*, 2007).

L-selectinas são expressas constitutivamente em leucócitos e podem atuar como ligante para outras selectinas. Por outro lado, P-selectinas são estocadas em grânulos das plaquetas, e nas células endoteliais estão presentes nos corpos de Weibel-Palade (WPB) (SUNDD *et al.*, 2011). Não são expressas na superfície celular em condições basais, mas mobilizadas rapidamente para superfície em resposta a estímulos inflamatórios. Já as E-selectinas são expressas por células endoteliais

sendo o nível transcricional regulado por mediadores inflamatórios como TNF- α (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2007).

O PSGL-1 é o principal ligante de selectinas expresso em leucócitos, e interage principalmente com P-selectinas endoteliais, mas também com E-selectinas e L-selectinas. Os carboidratos presentes no ligante permitem o reconhecimento pela selectina de maneira dependente de Ca²⁺. (NORMAN *et al.*, 1995; VESTWEBER e BLANKS, 1999; SPERANDIO *et al.*, 2003).

A família de moléculas semelhantes à imunoglobulinas ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e a molécula de adesão endotelial e plaquetária tipo 1 (PECAM-1) também são expressas na superfície da célula endotelial. Interagem com integrinas do tipo β 1 e β 2 presentes nos leucócitos mediando a interação dessas células ao endotélio na maioria dos leitos vasculares (GRANGER e SENCHENKOVA, 2010). Ao contrário de PECAM-1, que é constitutiva, ICAM-1 e VCAM-1 têm a expressão modulada durante o processo inflamatório. A interação de ICAM-1 e VCAM-1 com leucócitos promove sinalização intracelular (SIMMONS *et al.*, 1990; WANG e SPRINGER, 1998).

PECAM-1 é expressa na maioria das células da linhagem hematopoiética incluindo plaquetas, neutrófilos e linfócitos. Também é expressa em células endoteliais inclusive nas junções intercelulares (NEWMAN, 1997). Na cascata de adesão leucocitária, a PECAM-1 atua em estágios iniciais e tardios. A presença de PECAM-1 nos leucócitos facilita o recrutamento direcional dessas células para iniciar a adesão (WU *et al.*, 2005) e tardiamente a transmigração é favorecida pela presença de PECAM-1 tanto em leucócitos quanto nas células endoteliais (PRIVRATSKY *et al.*, 2010).

Interações homofílicas PECAM-1-PECAM-1 entre leucócitos e regiões juncionais das células endoteliais são fundamentais para transmigração (MULLER *et al.*, 1993; NAKADA *et al.*, 2000). Enquanto a interação de PECAM-1 endotelial aumenta a expressão de integrinas na superfície dos leucócitos favorecendo a adesão (TANAKA *et al.*, 1992).

A expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina varia em diferentes vasos sanguíneos, sendo observada com maior densidade em vênulas do que em arteríolas e capilares (GRANGER e SENCHENKOVA, 2010).

As integrinas são heterodímeros presentes em leucócitos formados pela associação não covalente de subunidades α e β . Dezoito subunidades α e oito subunidades β formam vinte e quatro diferentes integrinas (SPRINGER e DUSTIN, 2012). Normalmente encontram-se em estado conformacional de baixa afinidade. A ação de quimiocinas e moléculas de adesão sobre receptores leucocitários aumenta a adesividade das integrinas permitindo a interação com seus ligantes (SHAMRI *et al.*, 2005; LAUDANNA e ALON, 2006).

As integrinas participam de interações celulares como no processo de adesão leucócito-endotélio mediando a adesão firme dessas células. Com a ativação leucocitária alguns heterodímeros são mobilizados para superfície celular enquanto os constitutivamente expressos passam por modificações estruturais aumentando a afinidade por seus ligantes (GRANGER e SENCHENKOVA, 2010).

As integrinas principalmente envolvidas no processo de adesão leucocitária são LFA-1 expressa exclusivamente em leucócitos e VLA-4 encontrada apenas em neutrófilos, interagem com ICAM-1 e VCAM-1 presentes na célula endotelial, respectivamente (YUSUF-MAKAGIANSAR *et al.*, 2002; GRANGER e SENCHENKOVA, 2010).

1.2.2. Ativação endotelial

A ativação endotelial do tipo I ocorre mais rapidamente por não depender de expressão gênica. Nesse caso, temos a ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que sinalizam predominantemente pela via da proteína G_q . Como exemplo cita-se os receptores de histamina H_1 e alguns subtipos de receptores purinérgicos. Essa ativação promove o aumento do Ca^{2+} intracelular e a ativação de Rho GTPases (CERNUDA-MOROLLÓN e RIDLEY, 2006; POBER e SESSA, 2007) que desencadeiam, entre outras respostas, a fosforilação de resíduos de aminoácidos da cadeia leve de miosina, isto favorece a abertura de junções celulares e a exposição de P-selectina na superfície celular que facilita a captura de leucócitos (POBER e SESSA, 2007) (Figura 4).

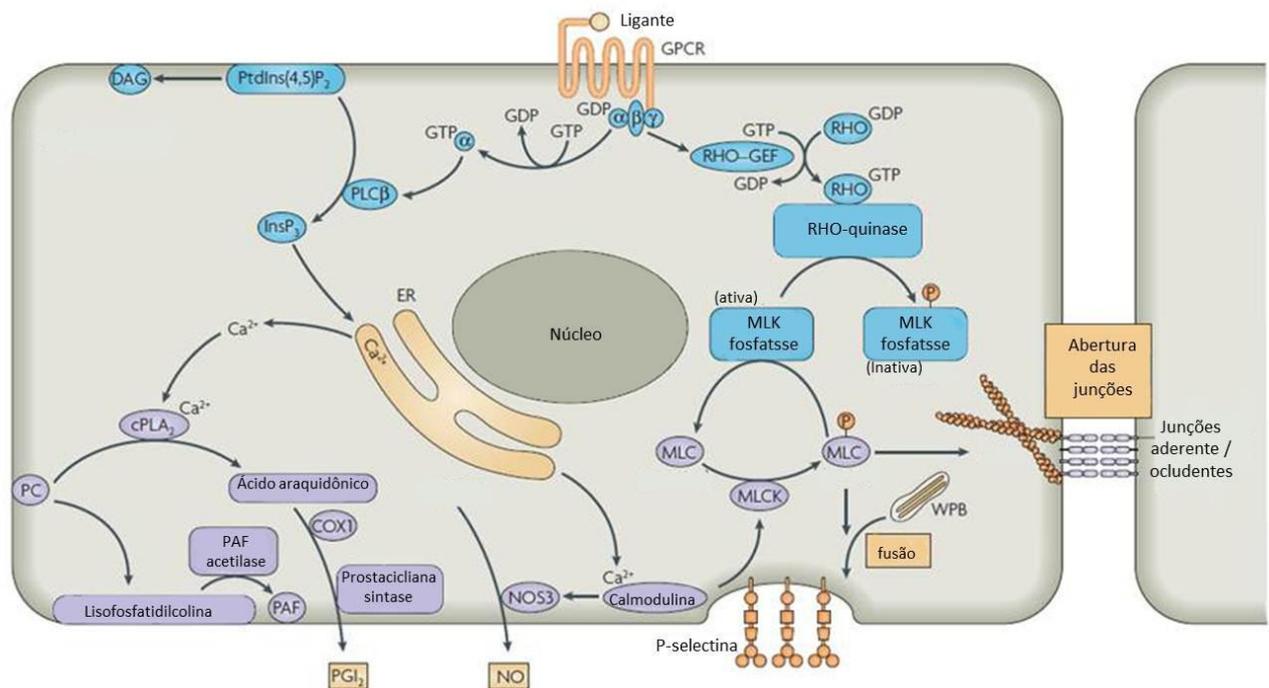


Figura 4: Ativação de célula endotelial do tipo I iniciada por estímulo a receptor acoplado a proteína G (GPCR). Processo independente de expressão gênica. PLCβ: PLC – Fosfolipase C subtipo β, cPLA2: Fosfolipase A2 celular, COX: Ciclooxigenase, NOS: Óxido Nítrico Sintase, MLCK: quinase de Cadeia Leve de Miosina, PGI2: Prostaglandina I2, NO: Óxido Nítrico (POBER e SESSA, 2007).

Agrupamentos de E-selectinas e P-selectinas na superfície endotelial interagem com leucócitos favorecendo a sinalização da célula endotelial reforçando o aumento de Ca^{2+} intracelular e o remodelamento das fibras de actina (LORENZON *et al.*, 1998).

A continuação desse processo requer uma ativação endotelial mais persistente possibilitada pela ativação endotelial do tipo II. Neste processo, citocinas liberadas por leucócitos ativados estimulam seus receptores presentes em células endoteliais desencadeando uma cascata intracelular de quinases que levam a ativação de fatores de transcrição. Dessa forma, serão sintetizadas quimiocinas e novas moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas (POBER, 2002; POBER e SESSA, 2007) (Figura 5).

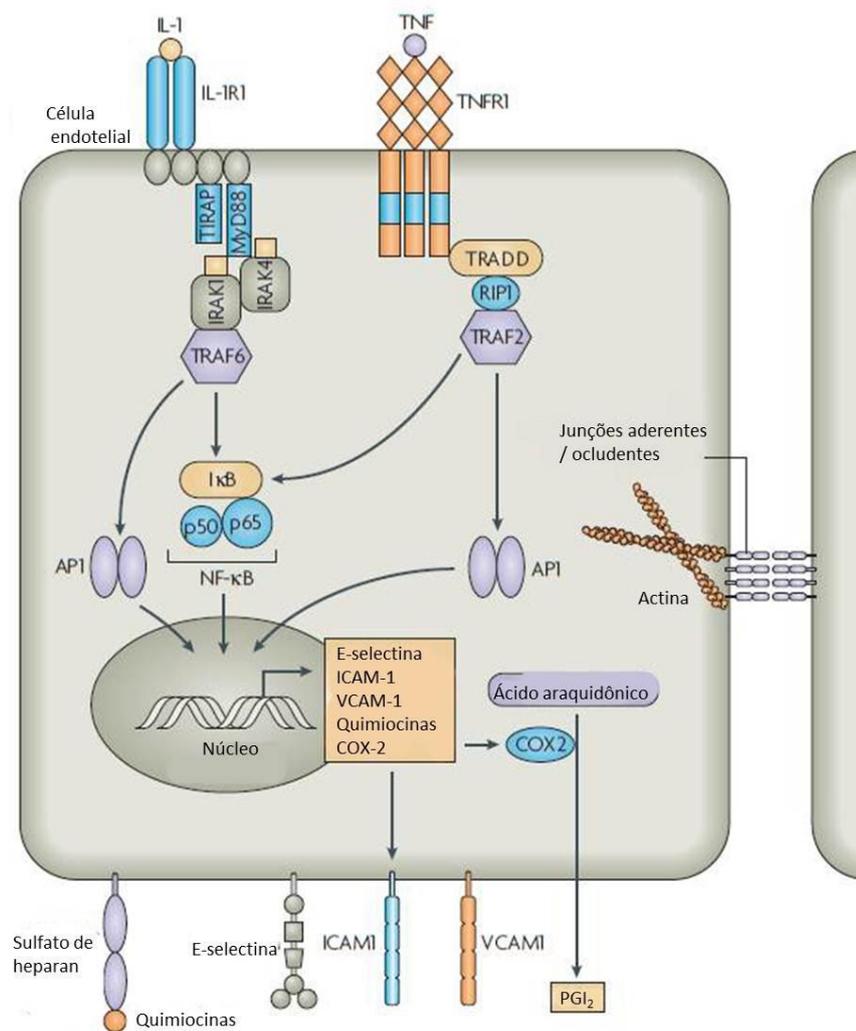


Figura 5: Ativação de célula endotelial do tipo II em resposta ao estímulo por citocinas, depende de expressão gênica. ICAM: molécula de adesão intercelular; VCAM: molécula de adesão celular vascular, COX: Ciclooxygenase, IKB: Inibidor kappa B, TNFR1: Receptor do Fator de Necrose Tumoral 1, IL-1: Interleucina-1, AP1: Proteína Ativadora, TNF: Fator de Necrose Tumoral (POBER e SESSA, 2007).

Assim como as selectinas, ICAM-1 e VCAM-1 também induzem sinalização endotelial após interagirem com leucócitos. Tais moléculas presentes na superfície endotelial como nanodomínios formam aglomerados levando a ativação de vias de sinalização intracelular (BARREIRO *et al.*, 2008). A ativação de Rac-1, por exemplo, está envolvida com a dissociação dos complexos de VE-caderina e o aumento do Ca^{2+} intracelular, que via proteína quinase C (PKC), promove o rearranjo do

citoesqueleto, ambos favorecem a transmigração (ETIENNE-MANNEVILLE *et al.*, 2000; VOCKEL e VESTWEBER, 2013).

1.3. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal que atua como transdutor do ritmo circadiano. Sua síntese pela glândula pineal é regulada pelo ciclo claro/escuro ambiental via núcleos supraquiasmáticos (SCN) (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006).

A síntese tem início a partir do aminoácido triptofano que é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH). Em seguida, este é convertido em serotonina pela descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AAD). A acetilação pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) gera N-acetilserotonina (NAS), a qual é metilada pela hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) formando a melatonina (AXELROD e WEISSBACH, 1960; WEISSBACH *et al.*, 1960; LOVENBERG *et al.*, 1967) (Figura 6).

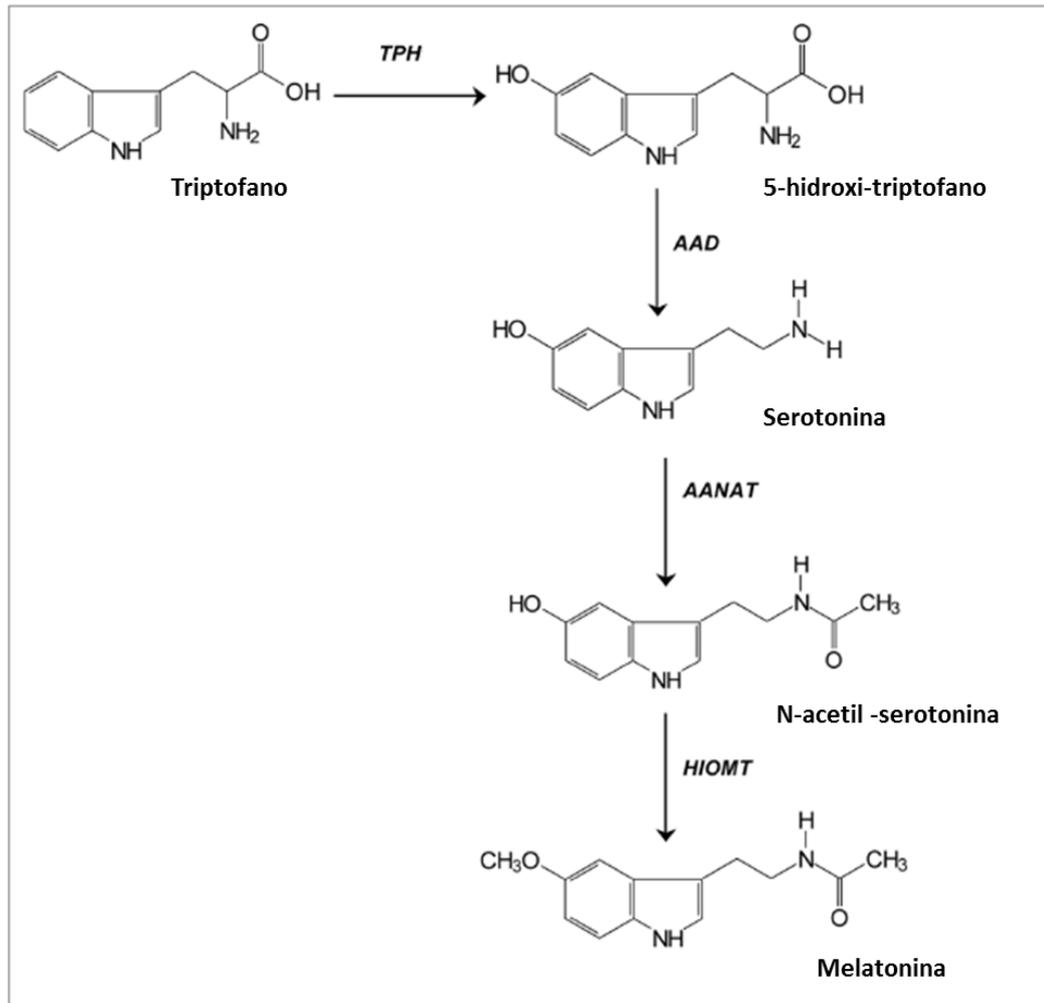


Figura 6: Etapas sequenciais da síntese da melatonina a partir do aminoácido triptofano. AAD: descarboxilase de aminoácidos aromáticos, AA-NAT: arilalquilamina N-acetiltransferase. HIOMT: hidroxi-indol-O-metiltransferase (KLESZCZYNSKI e FISCHER, 2012).

O controle da produção da melatonina pelo ciclo claro/escuro é associado às enzimas AA-NAT e HIOMT, que têm a expressão e atividade aumentadas no período da noite. Estas etapas enzimáticas são consideradas limitantes na produção do hormônio (BORJIGIN *et al.*, 1995; ROSEBOOM *et al.*, 1996; RIBELAYGA *et al.*, 1999).

Na presença de luz há inibição da produção do hormônio pela glândula pineal, gerando níveis séricos baixos (10–20 pg/mL). A síntese é aumentada no início da noite, quando o pico máximo de concentração do hormônio é atingido (80–150 pg/mL) (DZIEGIEL *et al.*, 2008; PÉREZ- RICO *et al.*, 2009).

Com a participação das mesmas enzimas a melatonina também pode ser produzida por fonte extra-pineal como retina, timo, medula óssea, epitélio respiratório, pele, cristalino, intestino (CARPENTIERI *et al.*, 2012) e linfócitos (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004). Nestes casos, as concentrações locais são mais elevadas do que a produção pineal (MARKUS *et al.*, 2007). A fonte extra-pineal de melatonina exerce ações parácrinas e/ou autócrinas, enquanto a produção pineal exerce seus efeitos endocrinamente (FINOCCHIARO *et al.*, 1991).

As ações descritas para a melatonina são diversas, tais como modulação de respostas imunológica, ação antioxidante e também sobre o sistema cardiovascular, no câncer, e na regulação do ritmo do sono. Alguns desses múltiplos efeitos associam-se a uma alta concentração da molécula, que não é atingida pela produção pineal (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2006; MARKUS *et al.*, 2007; CARPENTIERI *et al.*, 2012).

A melatonina é uma indolamina sendo ambos os grupos, indol e amina, decisivos para a ligação aos receptores de melatonina e também para a anfifilicidade da molécula, o que a permite manter-se no fluido corporal e entrar em compartimentos intracelulares (HARDELAND *et al.*, 2006).

1.3.1. Receptores de melatonina

As ações fisiológicas da melatonina decorrem da ativação dos receptores MT_1 , MT_2 e MT_3 . MT_1 e MT_2 são GPCRs, enquanto MT_3 é conhecido como a enzima quinona redutase 2 (DUBOCOVICH e MARKOWSKA, 2005). Outras vias de sinalização da melatonina incluem a inibição da interação do complexo Cálcio-calmodulina com proteínas alvo e a interação com receptores nucleares (BENLTEZ-KING *et al.*, 1993) (Figura 7).

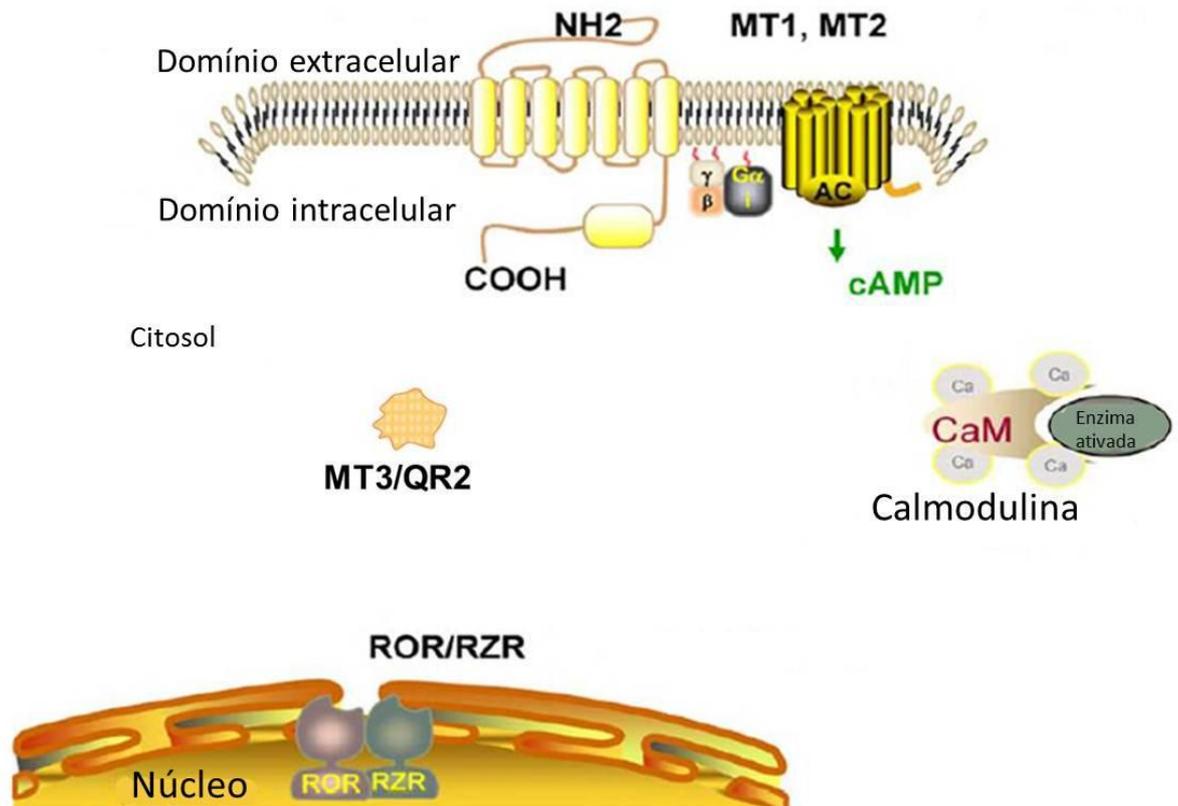


Figura 7: Representação ilustrativa dos receptores de melatonina. Receptores de membrana MT_1 e MT_2 acoplados a proteína G, receptor MT_3 , enzima quinona redutase 2 (QR2), Calmodulina representando a modulação direta da melatonina sobre esse alvo intracelular e receptores nucleares ROR/RZR (receptores órfãos para retinóide / receptor Z para retinóide) (Adaptado RADOGNA, 2010).

Os receptores de melatonina MT_1 e MT_2 estão distribuídos em diversos tecidos no organismo. Compartilham uma sequência específica de aminoácidos e apresentam cerca de 60 % de homologia (JOCKERS *et al.*, 2008). O receptor MT_1 é acoplado à proteína G_{i2} , G_{i3} ou $G_{q/11}$ (BRYDON, *et al.*, 1999), e o receptor MT_2 é acoplado majoritariamente à proteína G_i (DUBOCOVICH *et al.*, 2003).

Os receptores MT_1 são expressos no cérebro, predominantemente no hipotálamo, cerebelo, hipocampo, substância negra e área tegumentar ventral. Encontrados também no sistema imunológico e no sistema cardiovascular, incluindo os vasos sanguíneos periféricos, aorta e do coração. MT_2 está presente no cérebro principalmente no hipotálamo, hipófise e núcleo supraquiasmático. Também é encontrado nos vasos sanguíneos e no sistema imunológico (SLOMINSKI *et al.*, 2012).

Os receptores de melatonina MT_1 e MT_2 podem formar heterodímeros, no entanto a consequência funcional desse fenômeno é atualmente desconhecida. Além disso, foram identificadas outras proteínas associadas aos receptores MT_1 , MT_2 além da proteína G, contudo, o papel de tal associação ainda precisa ser demonstrado (Revisto em JOCKERS *et al.*, 2008).

O receptor órfão CPR50 apresenta homologia aos receptores de melatonina MT e desta forma vem sendo classificado na subfamília dos receptores de melatonina. Tal receptor forma dímero apenas com o receptor MT_1 reduzindo a afinidade do receptor por seu agonista (LEVOYE *et al.*, 2006).

A identificação dos receptores MT e dos mecanismos de sinalização de melatonina propicia o desenvolvimento da aplicação terapêutica do hormônio (VON GALL *et al.*, 2002). Recentemente tornaram-se disponíveis para uso clínico agonistas dos receptores de melatonina como ramelteon e tasimelteon, ambos agonistas dos receptores MT_1 e MT_2 e usados para insônia. Por outro lado, a agomelatina, um agonista dos receptores MT_1 e MT_2 e antagonista de receptor serotoninérgico $5HT_{2C}$, é indicado para depressão (Revisto em LAUDON e FRYDMAN-MAROM, 2014).

O receptor MT_3 é uma enzima quinona redutase 2 (QR2) (NOSJEAN *et al.*, 2000), que apresenta baixa afinidade pela melatonina (faixa micromolar) quando comparado aos receptores MT_1 e MT_2 (MOLINARI *et al.*, 1996). Os efeitos antioxidante da melatonina observados em altas concentrações são associados à modulação do receptor MT_3 (JOCKERS *et al.*, 2008).

A melatonina também pode mediar suas ações através de receptores nucleares como ROR/RZR (receptores órfãos para retinóide / receptor Z para retinóide) (SMIRNOV, 2001), incluindo as subfamílias: $RZR\alpha$, $ROR\alpha$, $ROR\alpha 2$, e $RZR\beta$ (BECKER-ANDRE *et al.*, 1994; CARRILLO-VICO *et al.*, 2005a). Contudo, a atuação de melatonina como agonista em receptores nucleares ainda é controversa. Alguns investigadores propõem que a melatonina regula indiretamente receptores nucleares via receptores MT_1 (DAI *et al.*, 2001, RAM *et al.*, 2002).

Além disso, a modulação direta da calmodulina quinase pela melatonina foi sugerida como uma via de regulação de funções celulares pelo hormônio, que exerce um efeito inibitório sobre a proteína (BENÍTEZ-KING *et al.*, 1993; ANTÓN-TAY *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 1998).

1.3.2. Melatonina e a inflamação

Nas últimas décadas diversos efeitos anti-inflamatórios vêm sendo atribuídos à melatonina. Tais efeitos estão relacionados a regulação de uma variedade de vias intracelulares (MAURIZ *et al.*, 2013). A melatonina produzida por diferentes tecidos regula o sistema imune. A produção extra-pineal por células mononucleares sugere modulação parácrina e autócrina da melatonina nesse sistema (CARPENTIERI *et al.*, 2012).

Dentre as atividades anti-inflamatórias descritas para melatonina encontra-se a redução da expressão de iNOS em diversos modelos de inflamação (Revisto em RADOGNA *et al.*, 2010). A prevenção da ativação de enzimas fosfolipase A₂, cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase reduz a liberação dos mediadores prostaglandinas e leucotrienos que são fundamentais para o processo inflamatório (MAURIZ *et al.*, 2013). Além disso, a melatonina modula a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Por exemplo, ela reduz nas células da microglia a produção de TNF- α , IL-6 (TOCHARUS *et al.*, 2010), exemplos de citocinas pró-inflamatórias, e aumenta sistemicamente a síntese de IL-10, de ação anti-inflamatória (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005b).

Com relação à adesão leucocitária *in vivo*, a melatonina inibe o rolamento e a adesão ao endotélio vascular em faixa de concentração semelhante à fisiológica, sendo esse efeito associado à ação da melatonina sobre as células endoteliais por meio da modulação dos receptores MT₁ e MT₂ (LOTUFO *et al.*, 2001; LOTUFO *et al.*, 2006). Ainda nesse contexto a melatonina reduz a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 em modelos de inflamação vascular (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2008; VENEROSO *et al.*, 2009; HUNG *et al.*, 2013).

1.4. Sinalização purinérgica

A sinalização purinérgica envolve nucleotídeos, receptores e enzimas (Figura 8). Resumidamente, o ATP é liberado por diversos tipos celulares em condições fisiológicas e patológicas através de processos de exocitose vesicular, conexinas, panexinas ou por apoptose. No meio extracelular o ATP exerce seu efeito através da

sinalização autócrina e parácrina via receptores purinérgicos P2Y e P2X presentes na superfície celular (RALEVIC e BURNSTOCK, 2008).

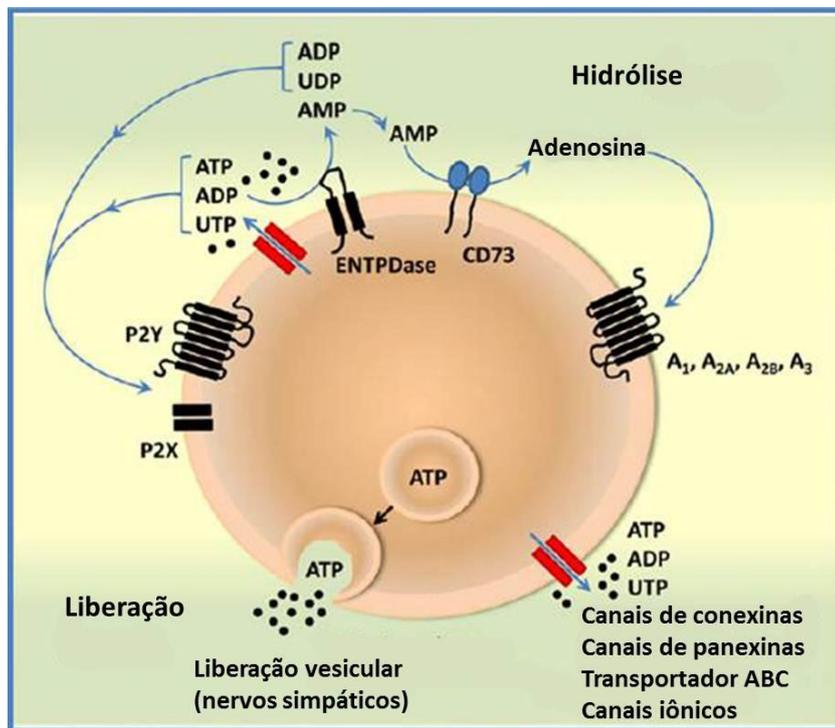


Figura 8: Sinalização purinérgica. O ATP é liberado para o meio extracelular. Os receptores purinérgicos são divididos nas famílias P2Y (metabotrópico) e P2X (ionotrópico). Nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por ectonucleotidases (NTPDase) gerando ADP e AMP. Pela ação da ecto 5´nucleotidase (ou CD73) o AMP pode ser convertido à adenosina a qual atua através de receptores próprios (A₁-A₃) (BURNSTOCK e RALEVIC, 2014).

A subdivisão em duas famílias é baseada em diferenças estruturais e na transdução do sinal os receptores. Receptores P2Y são acoplados a proteína G, ou seja, são GPCRs. Por outro lado, os receptores P2X são receptores ionotrópicos (BENHAM e TSIEN 1987; DUBYAK, 1991). Sendo assim, os efeitos mediados por receptores P2X serão observados mais rapidamente em comparação com os P2Y que serão observados mais tardiamente (RALEVIC e BURNSTOCK, 2008).

The International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (IUPHAR) reconhece oito subtipos de receptor P2Y em mamíferos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (ABBACCHIO *et al.*, 2006). Com relação aos receptores P2X são reconhecidos

sete subtipos: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇ (ALEXANDER *et al.*, 2013).

Enzimas de membrana com sítio catalítico voltado para o lado extracelular e que hidrolisam nucleotídeos são denominadas ectonucleotidases (NTPDases), e promovem a rápida degradação do ATP em ADP, AMP e adenosina (ZIMMERMANN, 1996) (Figura 8). Desta forma, NTPDases controlam a disponibilidade de ligantes evitando a dessensibilização do receptor, mas que também pode promover a ativação de outro receptor pelo produto da hidrólise (ZIMMERMANN *et al.*, 2012).

Os receptores P2Y apresentam baixa homologia em suas sequências peptídicas, o que confere diferenças significativas na farmacologia (BURNSTOCK e KNIGHT, 2004). Podem ser subdivididos segundo a afinidade por seus ligantes. P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃ preferem os nucleotídeos de adenina, ADP e ATP. Enquanto P2Y₄ e P2Y₆ apresentam maior afinidade por trifosfato de uridina (UTP) ou difosfato de uridina (UDP) (VOLONTÉ *et al.*, 2006).

O envolvimento dos receptores P2Y em distúrbios vasculares como hipertensão e aterosclerose tem aumentado o interesse por esse grupo, que participa de processos como controle do tônus vascular, agregação plaquetária, proliferação de células da musculatura lisa vascular e de células endoteliais, e na inflamação com a adesão de leucócitos (SCHUCHARDT *et al.*, 2012). O antagonista dos receptores P2Y₁₂ ticagrelor exerce um importante efeito antiplaquetário, e em 2010 seu uso clínico correspondeu a cerca de 60% do mercado global de fármacos antiplaquetários prescritos (HUBER *et al.*, 2011).

Os agonistas purinérgicos endógenos ADP e ATP são substratos de NTPDases o que limita seu uso em ensaios farmacológicos. Desta forma, estão disponíveis para uso comercial agonistas sintéticos mais resistentes à hidrólise. Porém, há limitação quanto à seletividade frente aos subtipos de receptores P2Y e eventualmente P2X (VOLONTÉ *et al.*, 2006).

1.4.1. Receptor purinérgico P2Y₁

ZERR e colaboradores (2011) mostraram que camundongos deficientes em receptores P2Y₁, e com processo aterosclerótico (modelo Apo E^{-/-}), apresentavam menor grau de rolamento e adesão de leucócitos às células endoteliais. O

tratamento farmacológico de animais Apo E^{-/-} com o antagonista seletivo MRS2500 mimetizou o perfil dos animais duplo *knockout* sugerindo a relevância destes receptores na adesão de células mononucleares. Eles também observaram que a deleção do receptor P2Y₁ reduziu a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina em resposta ao TNF α (ZERR *et al.*, 2011). No mesmo modelo P2Y₁^{-/-}/ApoE^{-/-} foram observados em trabalho anterior do grupo redução da expressão endotelial de VCAM-1, do infiltrado de macrófagos e do tamanho da placa aterosclerótica (HECHLER *et al.*, 2008).

O receptor P2Y₁ tem o ADP como agonista pleno e o ATP como agonista parcial. O 2-metil-S-ATP (2MeSATP) é um agonista parcial deste receptor com afinidade na faixa micromolar (MOCCIA *et al.*, 2001), e mais estável (www.iuphar.org, acesso janeiro 2015). Uma vez ativado aumenta os níveis de Ca²⁺ intracelular (RALEVIC e BURNSTOCK, 2008). O acoplamento do receptor P2Y₁ à proteína G_q promove a ativação da enzima fosfolipase C, resultando na formação de inositol trifosfato culminando na liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares (WALDO *et al.*, 1991). Uma via de sinalização alternativa, e minoritária, que é expressa independentemente da anterior, envolve o acoplamento à proteína G_i promovendo a inibição da adenilato ciclase (WEBB *et al.*, 1996).

O receptor P2Y₁ está presente em células imunes como neutrófilos, linfócitos, macrófagos mastócitos e eosinófilos (JACOB *et al.*, 2013), células epiteliais, plaquetas e em células endoteliais. Nesse tipo celular também são encontrados os subtipos P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁, P2X₄ e P2X₇ (SCHUCHARDT *et al.*, 2012). Animais deficientes em receptores P2Y₁ apresentam menor adesão leucocitária e maior tempo de sangramento (revisto em SCHUCHARDT *et al.*, 2012).

O envolvimento da sinalização purinérgica em vários processos fisiológicos vem despertando um crescente interesse no conhecimento de novas vias ou fármacos que modulem a sinalização purinérgica, incluindo receptores P2Y₁ (SCHUCHARDT *et al.*, 2012). Neste trabalho avaliamos o papel dos receptores P2Y₁ na adesão leucocitária à monocamada de células endoteliais mesentéricas de rato na ausência de estímulo pró-inflamatório prévio, e o impacto da melatonina sobre o processo inflamatório mediado por estes receptores.

Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o envolvimento da sinalização purinérgica via receptores P2Y₁ na adesão leucocitária à célula endotelial mesentérica e o possível efeito modulador da melatonina.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar *in vitro* o efeito da ativação dos receptores P2Y₁ nas células endoteliais de rato em cultura.
- Avaliar *in vitro* o efeito da melatonina na adesão de células mononucleares à monocamada endotelial estimulada por agonista de receptores P2Y₁.
- Investigar o efeito da melatonina na expressão dos receptores P2Y₁.
- Caracterizar o efeito da melatonina na via de sinalização endotelial dos receptores P2Y₁.
- Avaliar o efeito do tratamento com agonista de receptores P2Y₁ e melatonina na expressão endotelial de moléculas de adesão e distribuição das fibras de F-actina.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos (2 - 3 meses de idade) foram utilizados nos procedimentos experimentais em conformidade com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais local e aprovados pela mesma sob o protocolo DFBCICB011. Os animais foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12/12h, temperatura controlada, com acesso à água e ração *ad libitum*.

3.2. Cultura primária de células endoteliais mesentéricas

Os animais foram anestesiados com éter etílico, eutanasiados por decaptação e banhados em etanol 70 %. Em cabine de fluxo laminar, garantindo ambiente estéril, foi realizada a abertura do abdômen e a remoção cirúrgica dos vasos da microcirculação mesentérica. Os vasos foram dissecados e cortados em pequenos pedaços, distribuídos em placas de cultura estéril de 24 poços e cobertos com meio DMEM suplementado (20 % soro fetal bovino, 44 mM NaHCO₃, 11 mM glicose e 35 µg/mL gentamicina, pH 7.4). As culturas foram mantidas em estufa (37°C, CO₂ 5 %). Os tecidos foram removidos 48 h após o preparo da cultura e o meio substituído a cada 48 h até as células atingirem a confluência. Nesse ponto as células foram dissociadas utilizando a enzima pancreatina. As células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS: NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄ 2 mM e KCl 5 mM, pH 7.4) e mantidas na incubadora durante 5 minutos com a mesma solução. O PBS foi removido e adicionado 200 µL da enzima pancreatina (0,25 % em PBS), as células foram mantidas por 5 minutos na estufa. Após esse período a atividade da enzima foi interrompida pela adição de 1 mL de meio DMEM. As células dissociadas foram recolhidas, contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de tripan e plaqueadas em seguida (OLIVEIRA *et al.*, 2011) (Figura 9).

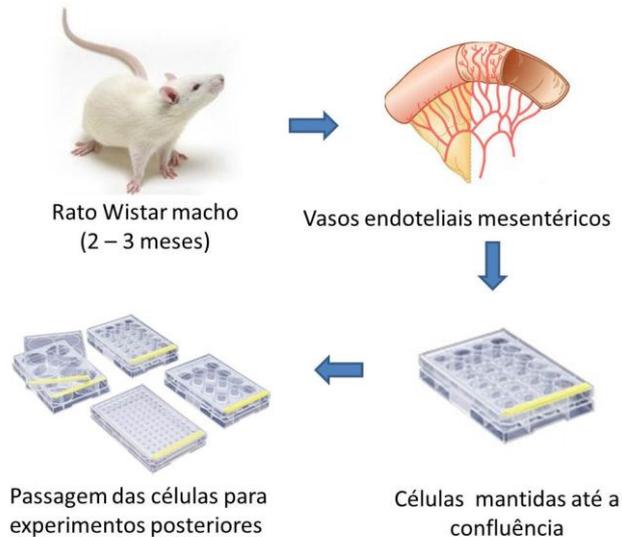


Figura 9: Esquema ilustrando a obtenção de células endoteliais mesentéricas para o preparo de cultura primária.

As células endoteliais mesentéricas foram caracterizadas morfologicamente (Figura 10) e pela marcação da molécula PECAM-1 (CD31) por citometria de fluxo (dados não mostrados).

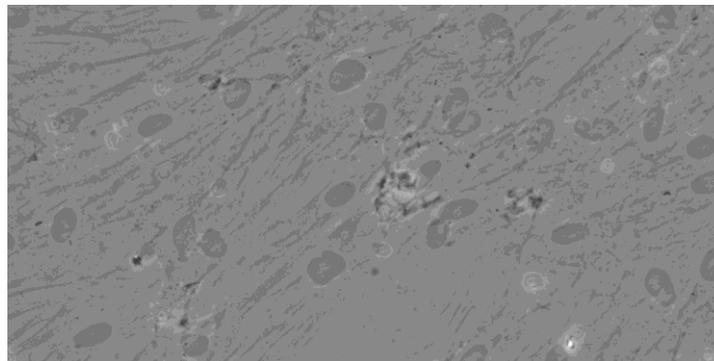


Figura 10: Caracterização morfológica das células endoteliais. Micrografia de contraste de fase das células endoteliais mesentéricas de rato confluentes. (microscópio Olympus IX71, aumento 20 X).

3.3. Ensaio de adesão de leucócitos à monocamada endotelial

O sangue foi obtido por punção cardíaca. Ao volume de sangue obtido foi adicionado PBS até completar um volume de 4 mL. O sangue foi adicionado lentamente em 3 mL do reagente Ficol-Paque PLUS (GE healthcare). A

centrifugação a 400 g e 4 °C por 30 minutos permitiu a formação de um gradiente possibilitando o isolamento das células mononucleares. Dez mL de PBS foram adicionados aos mononucleares e centrifugação foi realizada a 4 °C, 350 g por 5 min, o processo foi repetido por duas vezes para a lavagem das células.

Células endoteliais mesentéricas (1ª passagem) foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços (10⁴ células/poço) 48 h antes do tratamento. Em seguida, foram submetidas a tratamentos farmacológicos (figura 11). Todas as concentrações das substâncias ou fármacos utilizados, e tempo de incubação, foram definidos previamente.

Em todos os protocolos, a condição basal foi representada pela manutenção das células apenas em meio DMEM.

O tratamento das células endoteliais foi realizado utilizando o agonista de receptores purinérgicos P2Y₁ 2MeSATP 60 µM (durante 4 h) em presença ou ausência do antagonista seletivo MRS 2179 0.3 µM (adicionado 30 min antes do agonista). Em outro protocolo as células foram tratadas com 2MeSATP 60 µM (durante 4 h) em presença ou ausência de melatonina 30 nM (adicionada 30 min antes do agonista). No terceiro protocolo as células foram tratadas com 2MeSATP 60 µM (durante 4 h) em presença ou ausência de melatonina 30 nM (adicionada 30 minutos antes do agonista), essa células haviam sido tratadas 30 minutos antes da melatonina com o antagonista dos receptores MT, luzindole 10 µM ou 30 µM.

Nos ensaios que avaliaram a relevância do Ca²⁺ intracelular para adesão, as células endoteliais foram tratadas com o quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA-AM 3 µM em presença ou ausência de 2MeSATP. As células foram mantidas em incubadora (37°C, 5 % CO₂) por 4 h.

Ao final das 4 h foram adicionadas 10⁴ células mononucleares por poço e a placa de cultura mantida na estufa por 30 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2011) (Figura 11). As células mononucleares não aderentes foram removidas por meio de lavagem com PBS. Para a análise, foram escolhidos aleatoriamente 4 campos por poço para serem imageados. O número de células mononucleares aderidas por poço foi determinado utilizando o microscópio Olympus IX71 (aumento 400X) expresso como média por poço.

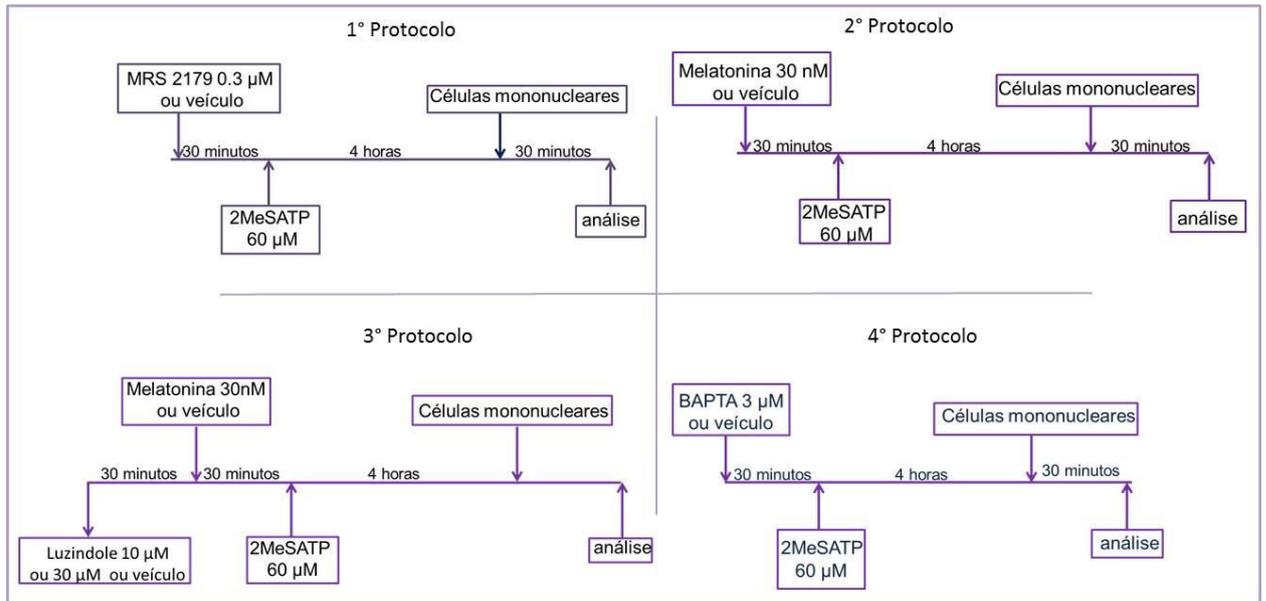


Figura 11: Tratamentos farmacológicos realizados durante o ensaio de adesão.

2MeSATP: agonista purinérgico; MRS2179: antagonista seletivo do receptor P2Y₁; luzindole: antagonista dos receptores MT₁ e MT₂; BAPTA-AM: quelante de Ca²⁺ intracelular.

3.4. Western blotting

Células endoteliais (1ª passagem) mantidas em placa de 6 poços foram mantidas em meio DMEM ou tratadas com 2MeSATP 60 µM, melatonina 30 nM ou melatonina 30 nM e 2MeSATP 60 µM totalizando um período de tratamento de 4,5 h. Ao final do período de tratamento as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão RIPA (1 % Nonidet P40, 0,25 % de deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM fluoreto fenilmetilsulfonil, 1 mM ortovanadato sódio, 1 mM NaF, 10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL Leupeptina e 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). As células foram raspadas e centrifugadas (8100 x g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi armazenado em nitrogênio líquido. O conteúdo de proteína foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) adaptado para microplaca. O ensaio de *Western blotting* foi realizado carregando 20 µg de proteínas em gel SDS-PAGE (10 %). Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose para análise do receptor P2Y₁ ou membrana de PVDF para análise da molécula ICAM-1. A membrana foi mantida por 1h em leite desnatado 5 % para bloqueio da ligação inespecífica, e incubada com anticorpo primário overnight em 5 % de leite desnatado

(anti-P2Y₁R 1:1000 Abcam; anti-ICAM-1 1:200 Santa Cruz). Após 2 lavagens durante 5 minutos e 1 lavagem de 15 minutos com tampão tris salino (TBS: Tris 10 mM, NaCl 68 mM) com 0.1 % de tween 20 a membrana foi incubada por 1 h com anticorpo secundário (anti-rabbit 1:200 KPL). Para o controle de carregamento foi utilizado anti- β -actina (1:5000 Sigma) *overnight* e após 2 lavagens durante 5 minutos e 1 lavagem por 15 minutos com TBS-Tween 0.1 % a membrana foi incubada com anticorpo secundário por 1 h (anti-mouse 1:2000 KPL). As membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando ECL (Thermo Scientific) e analisadas utilizando o *software* ImageJ.

3.5. Dosagem de IL-1 β e TNF- α

Células endoteliais mesentéricas foram subcultivadas em placas de 6 poços (1ª passagem) e receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: melatonina 30 nM; 2MeSATP 60 μ M; melatonina 30 nM e 2MeSATP 60 μ M; MRS 2179 0.3 μ M e 2MeSATP 60 μ M. Ao final de 4,5 h de tratamento os sobrenadantes foram removidos, e após adição de inibidor de protease (Gibco) em diluição 1:1000 foram armazenados em freezer -80°C até a realização da dosagem. A dosagem das citocinas IL-1 β e TNF- α foi realizada utilizando a técnica de Elisa de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante do kit (Prepotec e BD Bioscience, respectivamente).

3.6. Imunofluorescência

As células endoteliais de 1ª passagem em confluência foram tratadas com 2MeSATP 60 μ M, melatonina 30 nM e 2MeSATP 60 μ M ou apenas com meio DMEM durante 4,5 h. Ao final desse período as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 4 % e sacarose 4 % por 10 minutos. A ligação inespecífica foi bloqueada através da incubação com albumina sérica bovina (BSA) 10 % durante 1 h. Em seguida, as células foram incubadas com anti-ICAM-1 (1:50 em BSA 3 %, Santa Cruz) *overnight* a 4°C. Após lavagem com PBS as células foram mantidas em 2 mL de álcool metílico PA por 2 minutos e lavadas com PBS. O anticorpo secundário foi incubado no escuro durante 1 h (Alexa Fluor 594 anti-rabbit,

Invitrogen). Os núcleos foram corados com DAPI (VectaShield, vector). As imagens foram obtidas utilizando microscopia confocal (Confocal Leica TCS-SPE, Leica Microsystems, aumento 63X) e analisadas com o software LAS AF 2.4 (Leica Microsystems).

3.7. Análise de citoesqueleto com faloidina

Para a análise da disposição da F-actina no citoesqueleto das células endoteliais mesentéricas utilizamos a marcação com faloidina. As células endoteliais confluentes foram tratadas com 2MeSATP 60 μ M; melatonina 30 nM; melatonina 30 nM e 2MeSATP 60 μ M ou apenas com meio DMEM totalizando 4,5 h de tratamento. Ao final desse período foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 4 % e sacarose 4 % por 10 minutos. Após lavagens sucessivas com PBS foi adicionado 2 mL de triton X-100 0,1 % por 5 minutos para permeabilização. As células foram incubadas com faloidina (5 μ L/300 μ L, Alexa Fluor 594-phalloidin, invitrogen) durante 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando VectaShield (Vector), marcando os núcleos com DAPI. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência Olympus IX71 (aumento 20X), e a análise foi realizada pelo programa Image J (NIH) (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

3.8. Análise dos dados

Os dados foram expressos como média e EPM. As diferenças entre os grupos foram analisadas por teste *t* de Student (dois grupos) ou análise de variância de fator único (ANOVA) seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls Student (mais de dois grupos), considerando $P < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o programa Prisma 5.0, GraphPad, E.U.A..

3.9. Reagentes

2-MeSATP, luzindole, MRS2179, melatonina e pancreatina foram obtidos da SIGMA (St. Louis, EUA). DMEM e soro fetal bovino foram obtidos da GIBCO (Grand Island, NY, EUA). Gentamicina foi obtida da Cultilab (Campinas, SP, BR). BAPTA-AM foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). LPS foi gentilmente cedido pelo LEFEX, UFRJ.

RESULTADOS

4.1. Envolvimento do receptor P2Y₁ na adesão leucocitária à monocamada de células endoteliais mesentéricas murinas

Em resultados anteriores do nosso grupo utilizando células endoteliais mesentéricas murinas, verificamos um efeito concentração-dependente do agonista dos receptores P2Y₁ (30-60 μ M), sendo que o maior efeito foi observado com a concentração 60 μ M (OLIVEIRA, 2014).

Nossos resultados demonstram que o tratamento das células endoteliais mesentéricas de rato por 4 h com 2MeSATP 60 μ M induziu a adesão de células mononucleares à monocamada endotelial (Figura 12). Uma vez que o 2MeSATP pode ativar outros receptores purinérgicos, realizamos os experimentos após pré-incubação com o MRS 2179 0.3 μ M, antagonista seletivo do receptor P2Y₁. O antagonista sozinho não alterou a adesão basal, porém bloqueou a adesão induzida pelo 2MeSATP sugerindo o envolvimento do receptor P2Y₁ endotelial na adesão leucocitária (Figura 12).

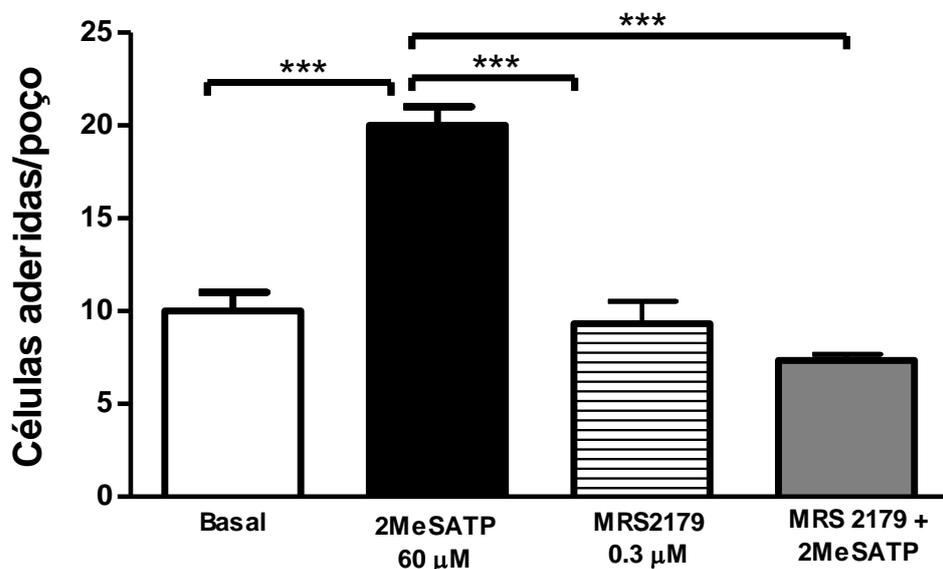


Figura 12: Adesão de leucócitos à monocamada endotelial mediada por receptores P2Y₁. Número de células mononucleares aderidas as células endoteliais mesentéricas de rato em resposta ao estímulo 2MeSATP 60 μ M na ausência (barra preta) ou presença de MRS2179 0.3 μ M (barras hachurada e cinza). *** P < 0.001. One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls. (experimento em triplicata).

4.2. Melatonina inibe a adesão leucocitária mediada por 2MeSATP à monocamada endotelial

Avaliamos o efeito da melatonina na adesão leucocitária mediada por estímulo dos receptores P2Y₁. Nossos dados mostraram que o tratamento das células endoteliais com melatonina 30 nM não alterou os níveis basais de adesão de leucócitos às células endoteliais. No entanto, o tratamento prévio com melatonina 30 nM inibiu a adesão leucocitária induzida por 2MeSATP (Figura 13).

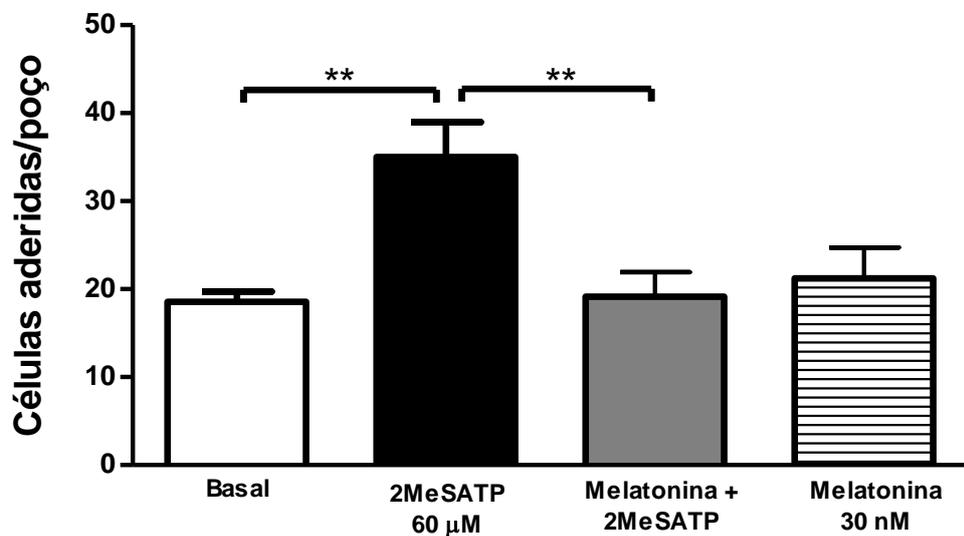


Figura 13: Adesão de leucócitos as células endoteliais mesentéricas tratadas com melatonina. Número de células mononucleares aderidas as células endoteliais em resposta ao estímulo 2MeSATP 60 µM na ausência (barra preta) ou presença de melatonina (barra cinza) e ao estímulo de melatonina 30 nM (barra hachurada). ** P < 0.01. One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls (n= 3 experimentos em triplicata com culturas diferentes).

Para avaliar se o efeito da melatonina é mediado por receptores metabotrópicos MT, nós realizamos o experimento na presença do antagonista luzindole, em concentração que bloqueia receptores MT₁ e MT₂ (DUBOCOVICH *et al.*, 1998).

Em nosso modelo o efeito da melatonina sobre a adesão leucocitária mediada por 2MeSATP foi parcialmente bloqueado pela pré-incubação com luzindole 10 μM (Figura 14).

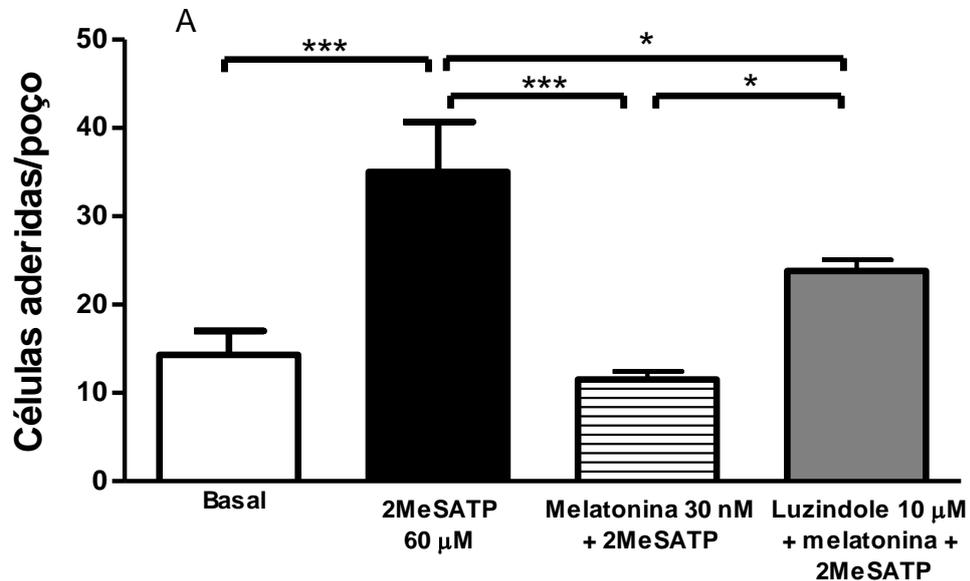


Figura 14: Participação de receptores de melatonina MT na inibição da adesão de leucócitos as células endoteliais mesentéricas mediada por 2MeSATP. Número de células mononucleares aderidas as células endoteliais após tratamento com 2MeSATP 60 μM e melatonina 30 nM na ausência (barra hachurada) ou presença de luzindole 10 μM (barra cinza). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls ($n = 3$ experimentos em triplicata com culturas diferentes).

Contudo, o aumento da concentração do antagonista luzindole para 30 μM promoveu um bloqueio completo do efeito da melatonina confirmando a participação dos receptores metabotrópicos MT na ação da melatonina (Figura 15).

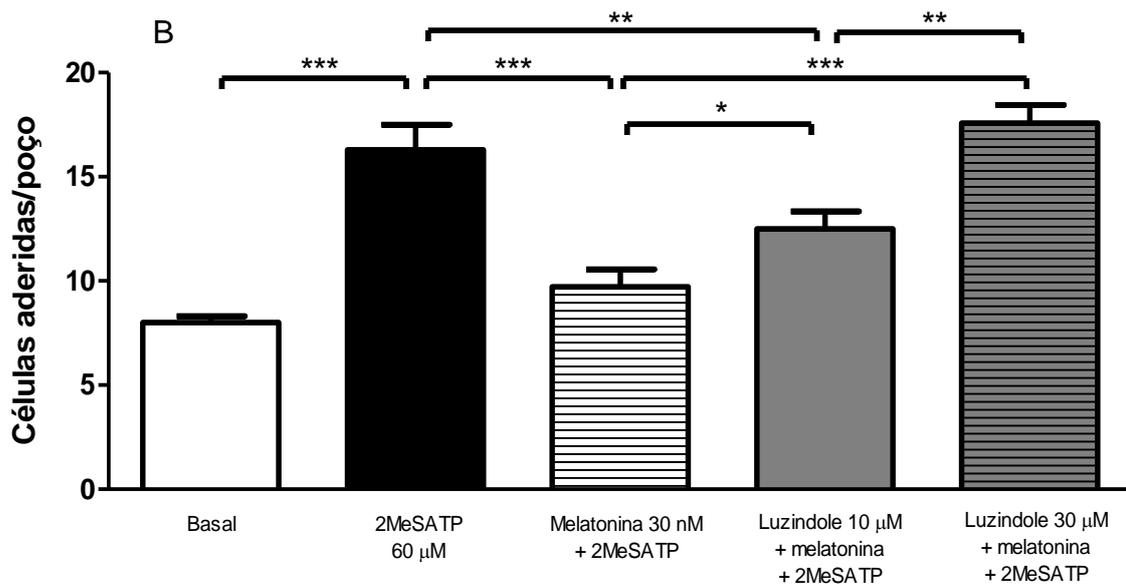


Figura 15: Luzindole (30 μM) bloqueia efeito da melatonina sobre a adesão leucocitária às células endoteliais mesentéricas mediada por 2MeSATP. Número de células mononucleares aderidas as células endoteliais após tratamento com 2MeSATP 60 μM e melatonina 30 nM na ausência (barra branca hachurada) ou presença de luzindole 10 μM (barra cinza) ou 30 μM (barra cinza hachurada). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls. (n= 2 experimentos em triplicata com culturas diferentes).

Um possível mecanismo envolvido no efeito inibitório da melatonina seria a redução na expressão de receptores $P2Y_1$. Desta forma, investigamos a modulação da expressão desses receptores em presença de melatonina.

Para este ensaio utilizamos o lisado celular total. Na condição basal observamos uma banda na faixa de massa molecular de 42 KDa correspondente ao receptor $P2Y_1$ (Figura 16A). O tratamento das células endoteliais mesentéricas com melatonina 30 nM por 4,5 h não alterou a expressão dos receptores $P2Y_1$ em comparação com a condição basal (Figura 16B).

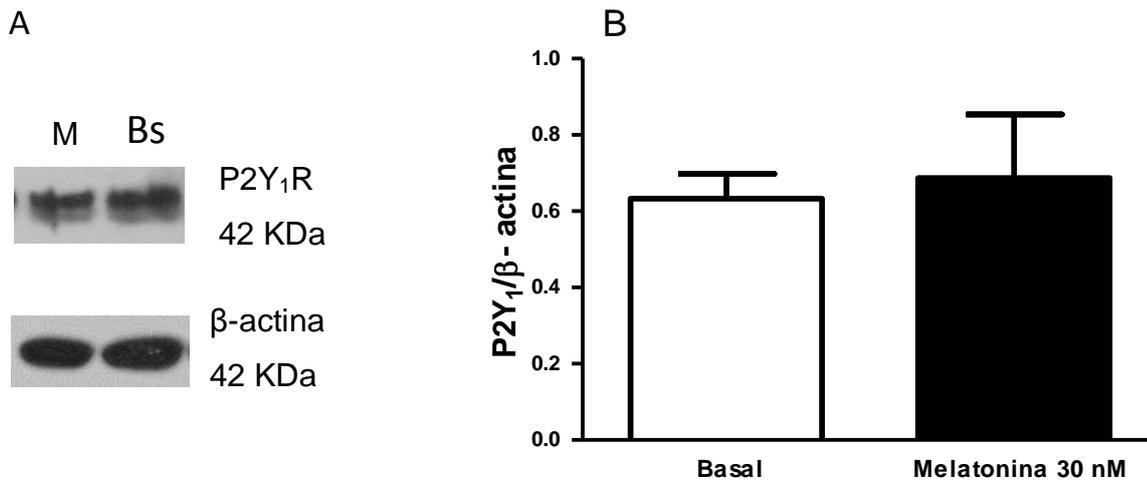


Figura 16: Expressão dos receptores P2Y₁ em células endoteliais mesentéricas. A) Imagens representativas do *Western blotting*. β-actina utilizada como controle de carregamento. *Western blotting* e imagem representativa (Bs = basal e M = melatonina). B) Análise densitométrica. Condição basal (barra branca) e tratada com (barra preta). Dados expressos em média ± E.P.M (n = 4 culturas diferentes. P = 0,78, teste *t* de Student).

Em camundongos, os receptores P2Y₁ estão envolvidos na expressão de moléculas de adesão na célula endotelial (ZERR *et al.*, 2011). Após a identificação do efeito pró-inflamatório da sinalização purinérgica mediada por P2Y₁R em células endoteliais mesentéricas de rato, e do envolvimento de receptor MT na ação inibitória da melatonina, avaliamos outros possíveis mecanismos celulares envolvidos no efeito pró-inflamatório do 2MeSATP, e a repercussão do tratamento com melatonina.

4.3. Avaliação dos níveis de TNF-α e IL1-β no sobrenadante de células endoteliais mesentéricas após estímulo com 2MeSATP

Citocinas, como TNF-α e IL1-β, promovem o extravasamento de leucócitos por meio do aumento das moléculas de adesão nas células (NEWTON e DIXIT, 2012). E essas citocinas podem ser liberadas por células endoteliais frente a estímulos como PAMPs e DAMPs (FREYER *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 2007).

Em nosso modelo o tratamento com 2MeSATP 60 μM (durante 4 h) não alterou significativamente o teor de TNF- α (Figura 17A) no sobrenadante das células endoteliais ($P = 0.2$). Resultados semelhantes foram observados para IL-1 β (Figura 17B). Desta forma, nas demais condições experimentais não houve alteração em relação ao basal.

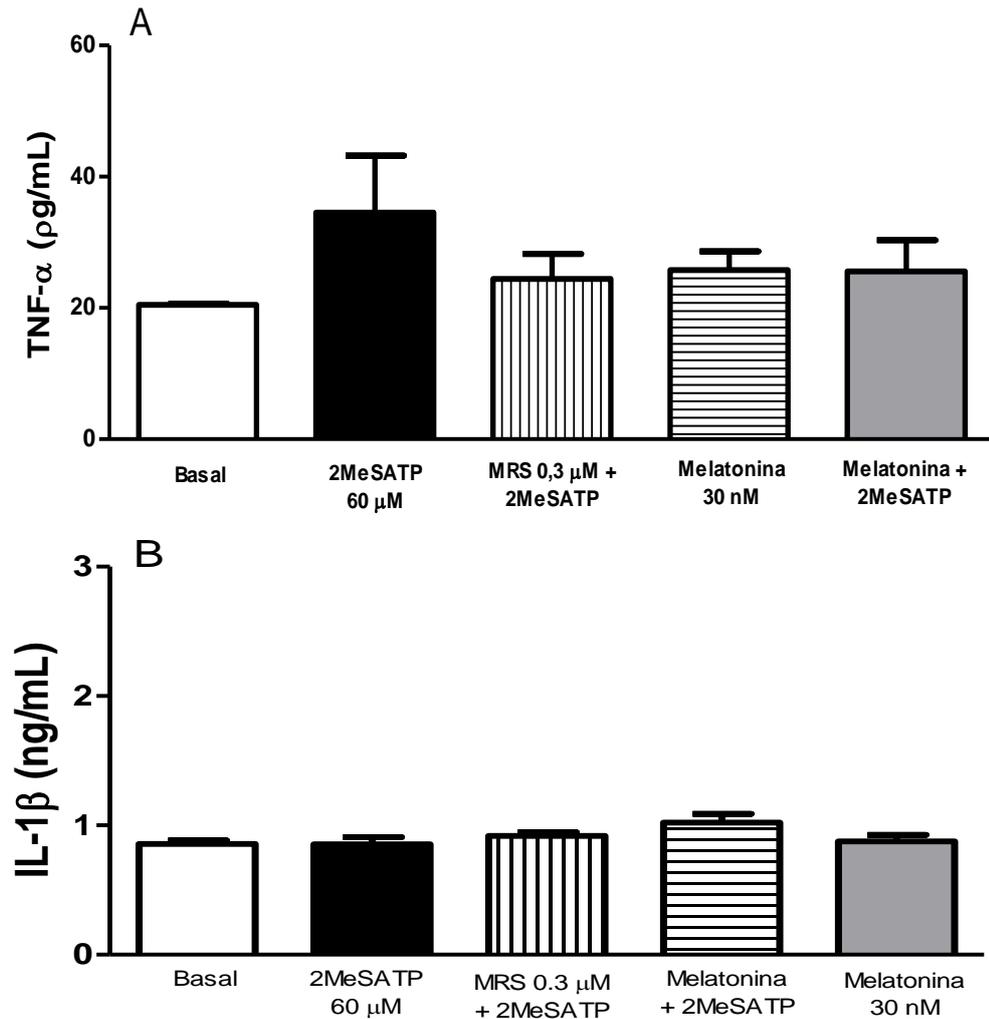


Figura 17: Níveis de citocinas em sobrenadante de células endoteliais mesentéricas após estímulo com 2MeSATP. A) TNF- α . B) IL-1 β . Dados expressos como média e E.P.M. $n = 3$ culturas de diferentes animais; One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls.

4.4. Papel da mobilização de Ca^{2+} intracelular sobre a interação células mononucleares-célula endotelial mesentérica

Anteriormente demonstramos que a melatonina inibe a mobilização de Ca^{2+} intracelular induzida por 2MeSATP em células endoteliais da microcirculação do cremaster de rato (SILVA *et al.*, 2007). De forma geral, o aumento do Ca^{2+} intracelular tem um papel importante para o recrutamento de leucócitos (revisado em POBER e SESSA, 2007). Desta forma, investigamos o envolvimento da mobilização de Ca^{2+} intracelular sobre a adesão de leucócitos à monocamada endotelial.

O tratamento das células endoteliais mesentéricas com o quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM (3 μM , durante 4,5 h) não alterou os níveis basais de adesão das células mononucleares. Porém, o tratamento prévio com BAPTA-AM bloqueou a adesão leucocitária induzida por 2MeSATP 60 μM (Figura 18).

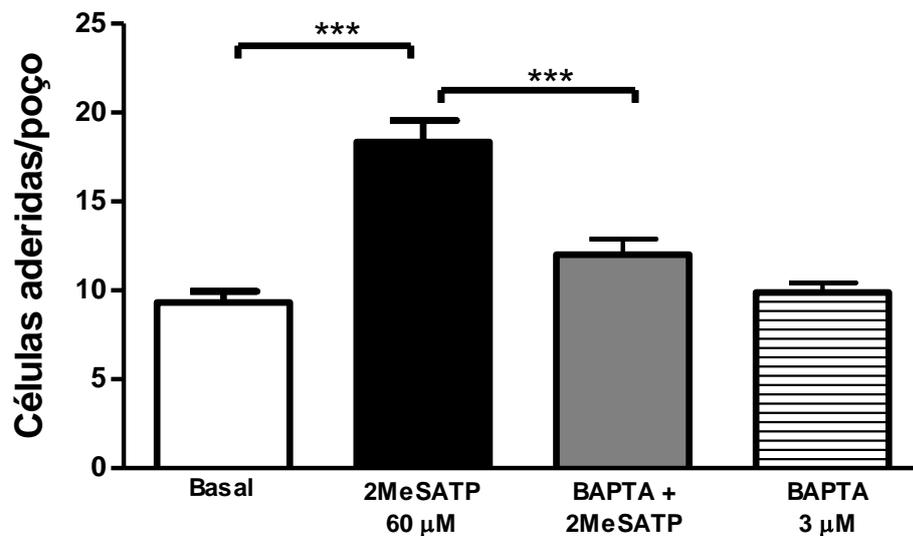


Figura 18: A inibição do aumento do Ca^{2+} intracelular impede a adesão leucocitária mediada por 2MeSATP. Número de células mononucleares aderidas as células endoteliais após tratamento com BAPTA 3 μM na ausência (barra branca hachurada) ou presença de 2MeSATP 60 μM (barra cinza). *** $P < 0.001$. One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls. (n= 3 experimentos em triplicata com 3 culturas diferentes).

4.5. Avaliação da expressão de ICAM-1 em células endoteliais mesentéricas: estudos de *Western blotting* e microscopia confocal

Estímulos pró-inflamatórios aumentam a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 nas células endoteliais. Tais moléculas estão envolvidas na captura e a transmigração de leucócitos nos arredores do foco inflamatório (Revisto em REGLERO-REAL *et al.*, 2012).

As células endoteliais mesentéricas de rato expressam níveis basais de ICAM-1 (Figura 19). Utilizando o lisado total para quantificação da proteína através de ensaios de *Western blotting*, o tratamento das células endoteliais com 2MeSATP 60 μ M por 4 h não alterou a expressão total de ICAM-1 em comparação com a condição basal (Figura 19).

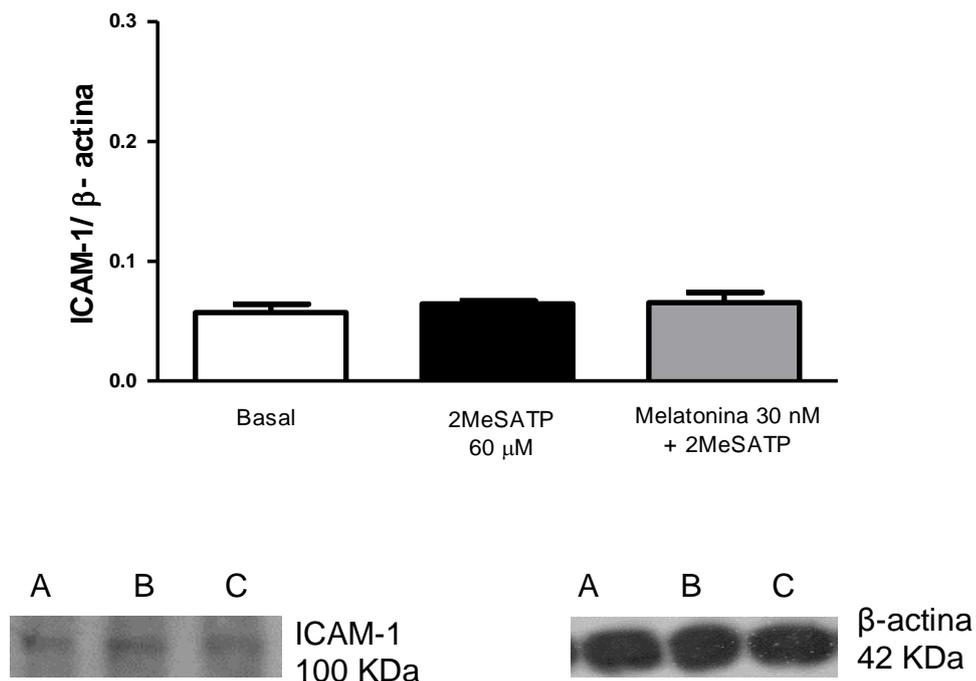


Figura 19: Expressão total da molécula de adesão ICAM-1 em células endoteliais mesentéricas. A) Análise densitométrica. Condição basal (barra branca), tratadas com 2 MeSATP 60 μ M (barra preta) e tratadas com 2 MeSATP 60 μ M e melatonina 30 nM com 2 MeSATP 60 μ M (barra cinza). B) Imagens representativas do *Western blotting* de ICAM-1 e β -actina. β -actina utilizada como controle de carregamento. (A = basal, B = 2MeSATP, C = 2MeSATP + melatonina). Dados expressos como média \pm E.P.M (n = 3 diferentes culturas).

Para avaliar a expressão da molécula de adesão ICAM-1 realizamos a análise da fluorescência total do campo quantificada por microscopia confocal que não revelou alteração significativa frente aos tratamentos experimentais (Figura 20). Contudo, a análise dos cortes ortogonais das células nas três condições experimentais evidenciou alteração na distribuição membranar da imunomarcação relativa à ICAM-1. Nas células tratadas com 2MeSATP verificamos uma alteração da localização celular em relação à condição basal (Figura 21B). Ademais, o tratamento com melatonina 30 nM pareceu inibir parcialmente esta alteração (Figura 21C).

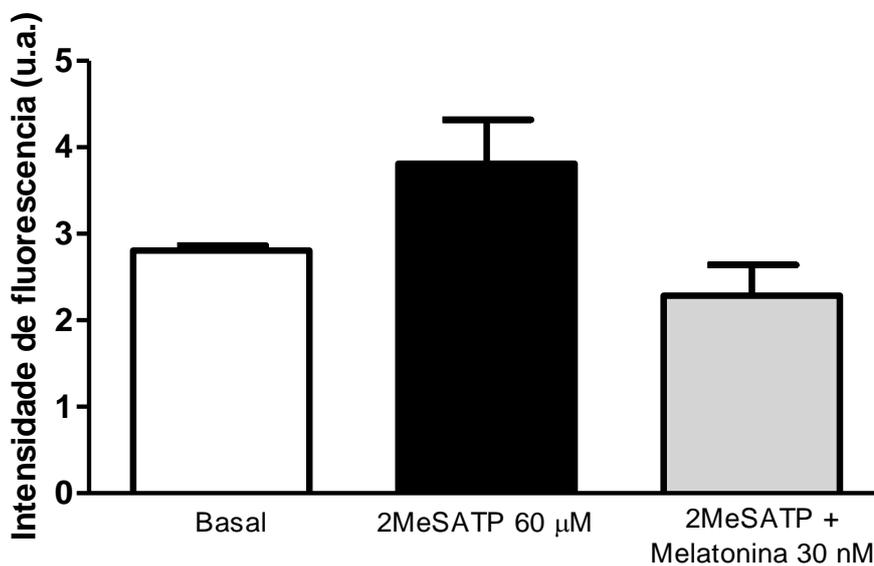


Figura 20: Quantificação da fluorescência relativa à imunomarcação de ICAM-1 em células endoteliais mesentéricas de rato. Em cada imagem foi selecionado todo o campo como região de interesse (ROI), e o mesmo nível do corte z ou sessão óptica ($z = 3$), para quantificação da fluorescência. Microscópio confocal Leica. Dados expressos como média e EPM. $n = 2 - 3$ placas da mesma cultura por condição experimental. $P = 0,056$ One way ANOVA seguido de teste post hoc Neuman-Keuls.

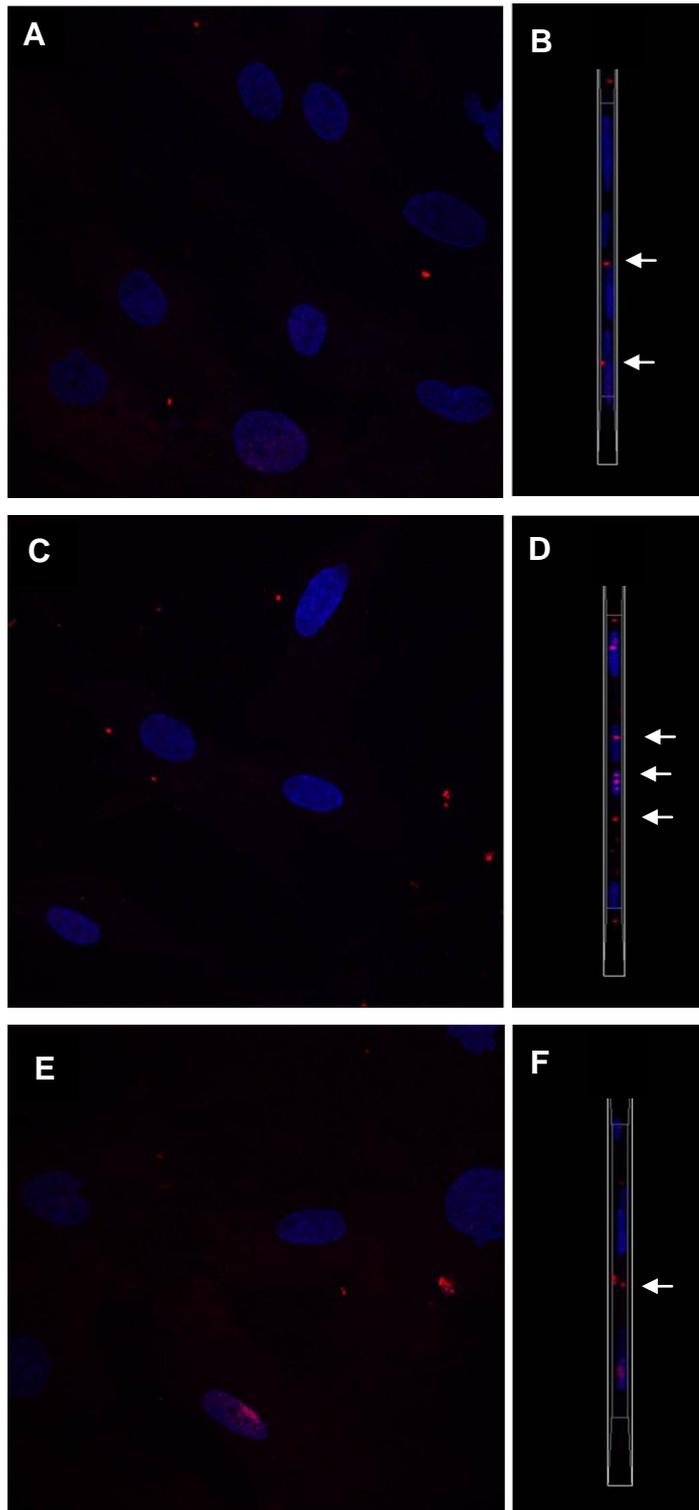


Figura 21: Alteração da disposição membranar de ICAM-1 nas células endoteliais mesentéricas. ICAM-1 (vermelho) e núcleos marcados com DAPI (azul). A e B: Basal (DMEM, durante 4,5h); C e D: 2MeSATP 60 μM, 4 h; E e F: melatonina 30 nM e 2MeSATP 60 μM, 4h. Imagens obtidas por microscopia confocal com a sobreposição das marcações (eixo xy): A, C e E. Cortes ortogonais evidenciando os eixos x, y e z: B, D e F. Microscópio confocal Leica (aumento 63X). Imagem representativa de um experimento, do total de dois experimentos com diferentes culturas. Setas: imunomarcação para ICAM-1.

A função de barreira exercida pela célula endotelial envolve a regulação dos feixes de actina (PRASAIN e STEVENS, 2009). A análise de alterações no conteúdo de F-actina em uma célula pode ser realizada pela marcação com faloidina (faloidina-rodamina) e observação por microscopia de fluorescência. Neste ensaio, imageamos o campo total das placas, e adquirimos imagens de contraste de fase, marcação do núcleo com DAPI (azul) e da F-actina (vermelho). Os resultados preliminares sugerem que o tratamento das células endoteliais com 2MeSATP 60 μ M (durante 4 h) promoveu um aumento em alguns pontos na marcação da faloidina (Figura 22B). O pré-tratamento com melatonina não preveniu esta alteração (Figura 22C).

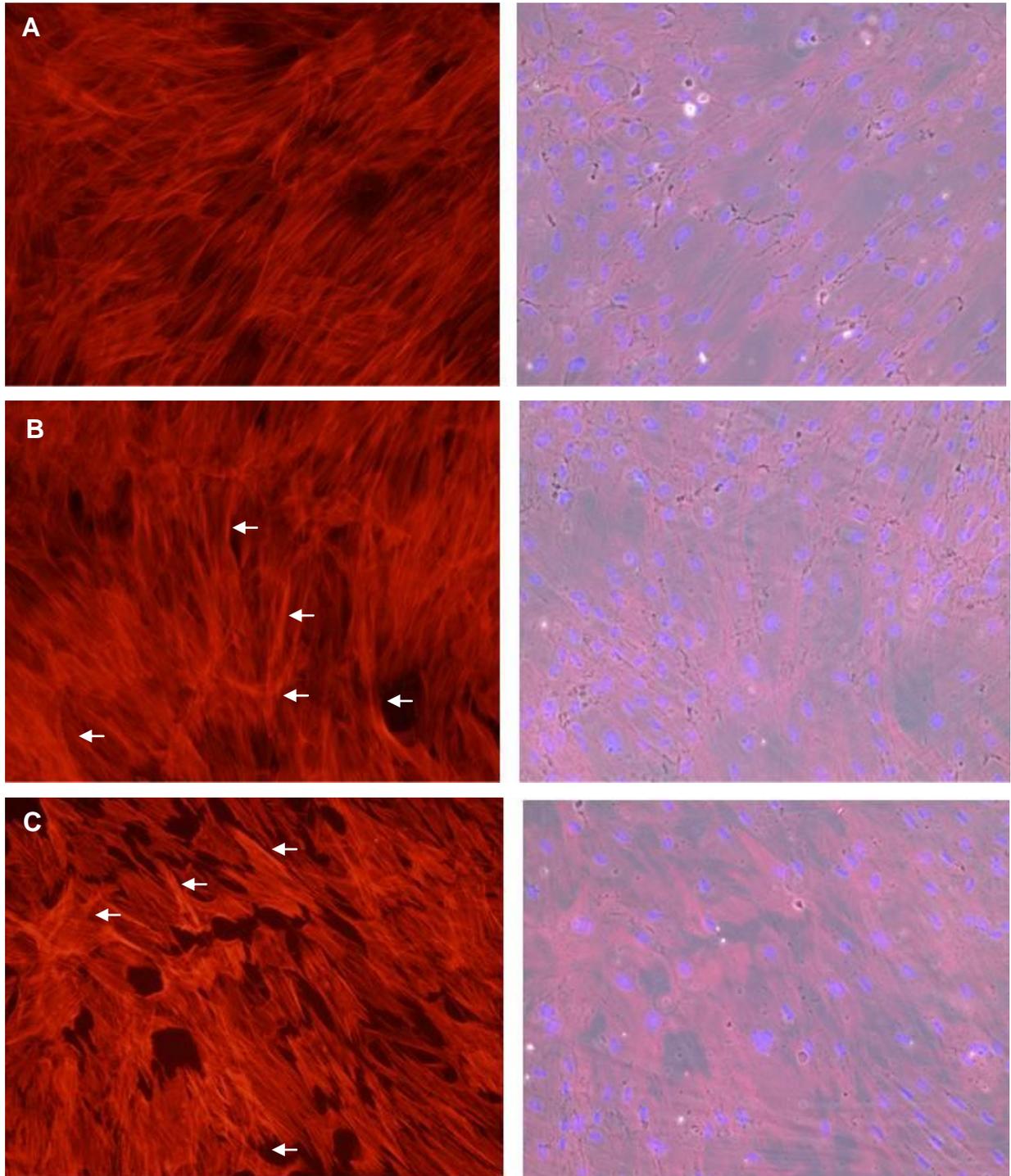


Figura 22: Análise da marcação de F-actina por faloidina em células endoteliais mesentéricas de rato. Painéis à esquerda: marcação de F-actina com faloidina-rodamina Painéis à direita: imagens sobrepostas de contraste de fase (cinza), marcação de DAPI (núcleo, azul) e faloidina (vermelho).. A = basal. B = tratamento com 2MeSATP 60 μ M (durante 4 h). C = tratamento com melatonina 30 nM e 2MeSATP 60 μ M (durante 4 h). Microscopia de fluorescência Olympus (20X). Resultado preliminar realizado com uma cultura. Setas: marcação mais intensa com faloidina

Discussão

Demonstramos o estímulo da adesão leucocitária à monocamada de células endoteliais mesentéricas de rato promovido pelo receptor P2Y₁, e a ação inibitória da melatonina nesse processo através dos receptores MT₁ e/ou MT₂.

A ativação de células endoteliais em um processo inflamatório altera o seu fenótipo para um estado ativado promovendo a síntese de citocinas, o aumento da permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão que favorecem a adesão e migração das células imunes (POBER e SESSA, 2007; XIAO *et al.*, 2014).

Sob condição de lesão tecidual, o ATP liberado é considerado um padrão molecular associado ao dano (do inglês *damage-associated molecular pattern*, DAMP). Sob ação subsequente de NTPDases pode haver formação de ADP, um agonista de receptores P2Y₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃, em geral com propriedade pró-inflamatória (ELTZSCHIG *et al.*, 2012). Contudo, na medida em que o próprio ADP também pode ser substrato de NTPDases, em geral nos ensaios farmacológicos utiliza-se agonistas sintéticos quimicamente mais estáveis

O ATP liberado durante o dano vascular estimula a interação neutrófilo-endotélio (PARKER *et al.*, 1996). Em ensaios de adesão com células humanas, o estímulo com ATP ou com o agonista purinérgico 2MeSATP promove o rápido aumento da adesão de neutrófilos de maneira dose-dependente sinalizando o envolvimento de receptores purinérgicos P2Y (DAWICKI *et al.*, 1995). Ademais, dados da literatura em modelo murino de aterosclerose (Apo E^{-/-}) reforçam o papel dos receptores P2Y₁ na ativação do rolamento e adesão de leucócitos à monocamada endotelial. Neste caso, há modulação da expressão de moléculas envolvidas no processo de adesão leucocitária (HECLER *et al.*, 2008; ZERR *et al.*, 2011).

Em nosso modelo de adesão leucocitária à monocamada de células endoteliais mesentéricas murinas, o tratamento com o agonista 2MeSATP (60 µM) por 4h aumentou a adesão leucocitária, mesmo na ausência de qualquer outro estímulo pró-inflamatório. Nesta faixa de concentração, este agonista pode ativar receptores P2Y₁, P2Y₁₁ e P2Y₁₃ (www.iuphar.org, acesso jan 2015). Desta forma, para confirmar o papel dos receptores P2Y₁, utilizamos o antagonista seletivo MRS 2179. Neste caso, o antagonista bloqueou completamente a resposta do 2MeSATP, indicando um efeito mediado por receptores P2Y₁.

Lotufo e colaboradores (2001) demonstraram *in vivo* uma ação inibitória da melatonina sobre o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio frente a um

estímulo mecânico. Ademais, a melatonina inibiu a permeabilidade vascular induzida por leucotrieno B₄, mas não a adesão de neutrófilos e aumento de permeabilidade induzidas por histamina e bradicinina (LOTUFO *et al.*, 2006). Tais dados além de evidenciar a ação anti-inflamatória da melatonina nos processos de adesão e rolamento sugerem que o efeito inibitório é específico para alguns mediadores pró-inflamatórios.

O estímulo endotelial em condições fisiopatológicas pode desencadear a liberação de ATP no meio extracelular, e as células endoteliais expressam receptores purinérgicos de ação pró-inflamatória (WANG *et al.*, 2002 ; LYUBCHENKO *et al.*, 2011; ELTZSCHIG *et al.*, 2012). Dados anteriores do nosso grupo mostraram que a melatonina inibe a sinalização purinérgica endotelial mediada por receptores metabotrópicos P2Y (SILVA *et al.*, 2007). Desta forma, avaliamos em nosso modelo a ação da melatonina sobre a adesão leucocitária à monocamada endotelial decorrente do estímulo ao receptor P2Y₁. Observamos que o pré-tratamento com melatonina (30 nM) foi capaz de inibir a adesão leucocitária induzida por 2MeSATP.

A melatonina exerce suas ações através de receptores específicos havendo diferentes subtipos tais como receptores metabotrópicos (MT₁ e MT₂), receptores intracelulares tais como MT₃ e receptores nucleares (MAURIZ *et al.*, 2013).

Parte dos efeitos da melatonina na regulação da resposta imune vem sendo atribuído aos receptores nucleares, ROR/RZR. A concentração de melatonina necessária para modulação desses receptores encontra-se na faixa nM (Revisto em SMIRNOV, 2001). Por outro lado, ações sobre remodelamento do citoesqueleto controlando atividades como tráfico de organelas e a motilidade celular são associadas à modulação direta da calmodulina em faixa de concentração micromolar em linhagem celular de neuroblastoma (HUERTO-DELGADILLO *et al.*, 1994).

Com relação aos receptores MT₃ seu papel nos efeitos da melatonina não é bem compreendido, mas associa-se a processos de detoxificação celular. Por serem receptores de baixa afinidade a concentração de melatonina necessária para atuar sobre os mesmos encontra-se na faixa micromolar (BOUTIN *et al.*, 2005; LUCHETTI *et al.*, 2010).

Os receptores MT₁ e MT₂ são receptores de alta afinidade pela melatonina, sendo ativados em concentrações na faixa nanomolar (DUBOCOVICH *et al.*, 2003). Em no nosso modelo, observamos que o efeito inibitório da melatonina na adesão

de células mononucleares à monocamada endotelial mediada por receptores P2Y₁ foi bloqueada de forma dependente da concentração pelo antagonista luzindole (faixa µM). Nesta faixa de concentração, o efeito do luzindole sugere o envolvimento dos receptores MT₁ e/ou MT₂. Nossos dados corroboram o efeito anti-inflamatório da melatonina em outro modelo experimental (LOTUFO *et al.*, 2001).

Durante a co-cultura de células endoteliais e leucócitos é possível que a melatonina module a sinalização dos dois tipos celulares. Contudo, de acordo com Lotufo e colaboradores (2006), o efeito da melatonina na adesão leucocitária se dá pela ação sobre a célula endotelial. A expressão de integrina β₂ na superfície do leucócito estimulada por leucotrieno B₄ e fMLP não foi bloqueada pelo tratamento prévio com melatonina, mas o estímulo a adesão de leucócito promovido pelo tratamento da célula endotelial com leucotrieno B₄ removido antes da adição do leucócito foi revertido pelo pré-tratamento com melatonina. De tal forma, a investigação da ação inibitória da melatonina na adesão leucócito-endotélio é direcionada principalmente para os mecanismos que envolvem a célula endotelial.

Uma vez confirmado o efeito da melatonina na inibição da adesão leucócito-endotélio por estímulo do receptor P2Y₁ a via envolvida com o efeito foi investigada. A redução da expressão dos receptores P2Y₁ poderia justificar a ação inibitória da melatonina na sinalização do receptor purinérgico.

Utilizando o lisado total das células endoteliais, os dados de *Western blotting* identificaram uma imunomarcagem na faixa de peso molecular compatível com a presença do receptor P2Y₁. Contudo, o tratamento com melatonina não alterou sua expressão.

Frente a uma lesão tecidual, a sinalização purinérgica pode induzir a liberação de citocinas, como IL-1β e TNF-α, de vários tipos celulares (GOMBAULT *et al.*, 2013; CAUWELS *et al.*, 2014). Essas citocinas promovem o extravasamento de leucócitos por aumentar a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais como P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (NEWTON e DIXIT, 2012). No contexto da ação da melatonina, no modelo de colite em ratos foi descrita uma ação inibitória com altas doses do hormônio (10 mg/kg) sobre os níveis de TNF-α. Este efeito anti-inflamatório deveu-se à inibição do fator de transcrição NF-κB no tecido inflamado (LI *et al.*, 2005).

Em sua atividade basal as células endoteliais não liberam citocinas em grandes quantidades, no entanto, com estímulo pró-inflamatório a liberação ocorre de

maneira gradual, porém em magnitude inferior a observada em macrófagos. Já foi descrita liberação de citocinas pela célula endotelial frente ao estímulo com LPS, IL-1 β e constituintes da parede celular de *Streptococcus pneumoniae*. Contudo, o tempo necessário para promover o aumento dos níveis de citocinas foi variável (FREYER *et al.*, 1999; IMAIZUMI *et al.*, 2000; WILSON *et al.*, 2007).

De tal maneira, os resultados obtidos neste trabalho através dos ensaios de adesão poderiam estar envolvidos com a liberação das citocinas IL-1 β e TNF- α . O teste realizado foi capaz de detectar níveis basais baixos das citocinas (pg/ml). No entanto, a quantificação de citocinas não demonstrou alteração significativa na liberação basal dessas moléculas em função dos tratamentos farmacológicos realizados, descartando esse mecanismo de ação da melatonina (faixa nM).

Por outro lado, a sinalização celular do receptor P2Y₁ envolve o aumento de Ca²⁺ intracelular uma vez que é um GPCR acoplado à proteína Gq (RALEVIC e BURNSTOCK, 2008). Silva e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento prévio de células endoteliais com melatonina (nM) inibiu a mobilização de Ca²⁺ intracelular promovida por 2MeSATP (30 μ M).

A ativação de células endoteliais é fundamental para a adesão e migração celular, e um dos primeiros sinais de ativação dessas células é um aumento do Ca²⁺ intracelular, o qual ativa a expressão das moléculas de adesão (CHEN *et al.*, 2002). Por exemplo, o aumento do Ca²⁺ em células endoteliais por estímulo da citocina TNF- α promove a expressão de E-selectinas (CHEN *et al.*, 2002). Também foi observado o aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 promovido pela substância P em decorrência do aumento de Ca²⁺ (QUINLAN *et al.*, 1999). A lipoproteína de baixa densidade (LDL) também induziu o aumento de Ca²⁺ promovendo aumento transitório de E-selectina e VCAM-1 com consequente aumento de monócitos aderidos as células endoteliais (ALLEN *et al.*, 1998). Neste modelo, o tratamento das células endoteliais com toxina pertussis, um clássico inibidor de proteína Gi, também inibiu a adesão de monócitos.

Nossos dados mostram que o pré-tratamento das células endoteliais com o quelante intracelular de Ca²⁺ BAPTA-AM bloqueou a adesão de células mononucleares à monocamada endotelial induzida por 2MeSATP. Este dados corroboram os resultados de Allen e colaboradores (1998) que também observaram um efeito inibitório sobre a adesão de monócitos após tratamento com BAPTA. Desta forma, o aumento de Ca²⁺ mediado por um receptor GPCR parece ser um

sinal inicial relevante na adesão de células mononucleares. Por exemplo, Seye e colaboradores (2003) demonstraram que a depleção de Ca^{2+} do retículo endoplasmático endotelial inibe a expressão de VCAM-1 em resposta ao estímulo de receptores P2Y_2 com ATP ou UTP. Mais recentemente, Stevenson e colaboradores (2014) também verificaram a importância do Ca^{2+} intracelular na exposição dos corpos de Weibel-Palade e adesão de monócitos THP-1 após estímulo com histamina. No nosso modelo, sugerimos que a inibição do aumento do Ca^{2+} intracelular na célula endotelial mediado por melatonina (SILVA *et al.*, 2007) pode estar relacionada ao mecanismo pelo qual a melatonina inibe a adesão leucocitária mediada pelo receptor P2Y_1 através dos receptores MT_1 e/ou MT_2 .

Embora os receptores MT_1 tenham sido descritos há mais de 20 anos, sua exata relação entre a via de sinalização e os efeitos fisiológicos da melatonina não são totalmente conhecidos. Chen e colaboradores (2014) demonstraram em células HEK-293 que o receptor MT_1 pode acoplar à proteína Gi , sendo sensível à toxina pertussis, mas também à proteína Gs , a qual aumenta os níveis intracelulares de AMPc.

A participação de moléculas de adesão é essencial para o processo de adesão de leucócitos ao endotélio (LAWSON e WOLF, 2009). Em modelos de inflamação vascular associado à aterosclerose o aumento da expressão das moléculas VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina nas células endoteliais estimuladas com $\text{TNF-}\alpha$ é inibida em animais *knockout* para o receptor P2Y_1 ou com a inibição farmacológica do receptor (ZERR *et al.*, 2011). Animais ateroscleróticos (Apo $\text{E}^{-/}$) com 30 semanas apresentaram maior expressão da molécula VCAM-1 quando comparados com os animais ateroscleróticos (Apo $\text{E}^{-/}$) selvagens para o receptor P2Y_1 (HECLER *et al.*, 2008).

Em contrapartida, vários dados da literatura sugerem que a melatonina inibe a expressão de moléculas de adesão. Em modelo de ratos hipertensos submetidos à hipóxia intermitente, o tratamento com melatonina por 14 dias preveniu o aumento da expressão de moléculas de adesão e E-selectina em células endoteliais (HUNG *et al.*, 2013). O aumento da expressão de ICAM-1 em células endoteliais estimuladas por LPS também foi revertido pelo tratamento com melatonina (TAMURA *et al.*, 2010). Além disso, animais pinealectomizados, condição que diminui os níveis endógenos de melatonina, apresentam níveis aumentados de VCAM-1 em células endoteliais de aorta (WANG *et al.*, 2013). *In vitro*, no mesmo tipo

celular a melatonina inibe de maneira concentração-dependente o aumento da expressão de VCAM-1 estimulado por LDL oxidada (WANG *et al.*, 2013).

De tal maneira, investigamos a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais mesentéricas em função dos tratamentos farmacológicos. Utilizando o lisado total das células endoteliais do grupo controle (basal), identificamos uma imunomarcagem na faixa de peso molecular compatível com a presença da molécula de adesão ICAM-1. Contudo, a avaliação da molécula VCAM-1 não foi possível por questões associadas ao anticorpo.

O tratamento com 2MeSATP (durante 4 h) não aumentou a expressão endotelial total de ICAM-1. A utilização das proteínas sem a separação da fração correspondente apenas a fração membranar pode ter inviabilizado a observação do aumento da exposição da molécula de adesão na membrana celular por meio da técnica utilizada.

A redistribuição, colocalização e formação de agrupamentos das moléculas de adesão ICAM-1 (e VCAM-1) são fundamentais para a progressão do processo de adesão leucocitária ao endotélio que culmina na transmigração (YANG *et al.*, 2006). A interação das integrinas leucocitárias com as moléculas de adesão favorece o remodelamento do citoesqueleto agrupando as moléculas de adesão na superfície celular de maneira que rodeiam o leucócito (VAN BULL *et al.*, 2010).

Os dados de *Western blotting* da molécula de adesão ICAM-1 não demonstraram alteração nos níveis proteicos da molécula que justificasse os resultados obtidos para os ensaios de adesão de leucócitos à monocamada endotelial nos diferentes tratamentos farmacológicos. No entanto, em ensaios de imunofluorescência em microscopia confocal, observamos nos cortes ortogonais o deslocamento das moléculas de adesão em direção à superfície endotelial por estímulo do agonista 2MeSATP, e o pré-tratamento com melatonina inibiu este efeito de forma que a distribuição da fluorescência foi semelhante ao do grupo controle (basal).

Outros estímulos são capazes de aumentar adesão de células mononucleares ao endotélio de forma independente de expressão gênica. Por exemplo, a ativação do receptor ephrin (Eph), o qual é acoplado a enzima tirosina quinase e expresso em células endoteliais (subtipo EphA₄), estimula a adesão leucocitária através da polimerização das fibras de actina e maior exposição de ICAM-1, sem contudo alterar sua expressão (JELLINGHAUS *et al.*, 2013).

Desta forma, no nosso modelo, uma possível razão para os dados observados seria que o estímulo por curto prazo do receptor P2Y₁ promoveria o aumento de Ca²⁺ intracelular, e também o reposicionamento de ICAM-1. O tratamento com melatonina inibiria a adesão das células mononucleares.

Na célula endotelial em cultura, a distribuição endotelial de F-actina identificada pela marcação com faloidina ocorre na região mais superficial de célula (região cortical), e se distribui de forma aleatória (PRASAIN e STEVENS, 2009). A formação de fibras de estresse aumenta a marcação com faloidina e pode ser observada frente ao estresse mecânico ou a estímulos inflamatórios tais como histamina, trombina ou mesmo à adesão de células mononucleares, com consequente rearranjo do citoesqueleto e exposição de ICAM-1, por exemplo (JELLINGHAUS *et al.*, 2013). Nossos dados preliminares sugerem que a ativação do receptor P2Y₁ aumenta a marcação de faloidina, contudo novos experimentos precisam ser realizados para elucidar o possível mecanismo da sinalização purinérgica endotelial sobre o citoesqueleto.

Recentemente foi demonstrado que a melatonina reduz a formação de placas de ateroma em modelo experimental de aterosclerose. Este efeito se relacionou com a redução da expressão enzima quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), a qual após fosforilar a miosina propicia o rearranjo do citoesqueleto de actina, formação de *gaps* e infiltração lipídica subendotelial (CHENG *et al.*, 2015). Ademais, o *downregulation* da sinalização do receptor MT₁ na célula endotelial de animais ateroscleróticos (Apo E^{-/-}) aumenta a permeabilidade vascular (ZHU *et al.*, 2014).

Nosso conjunto de dados originais mostra que a ativação do receptor P2Y₁ por curto período de tempo (durante 4 h) é capaz de estimular a adesão de células mononucleares à monocamada endotelial (Figura 23, item 1), a despeito da ausência de outros mediadores inflamatórios. Tal efeito independe de expressão gênica, e associa-se a maior exposição de moléculas de adesão como ICAM-1 na superfície celular (Figura 23, item 2). A melatonina inibe este processo via receptores MT₁ e/ou MT₂ (Figura 23, item 3), provavelmente por interferir no aumento do Ca²⁺ intracelular na célula endotelial.

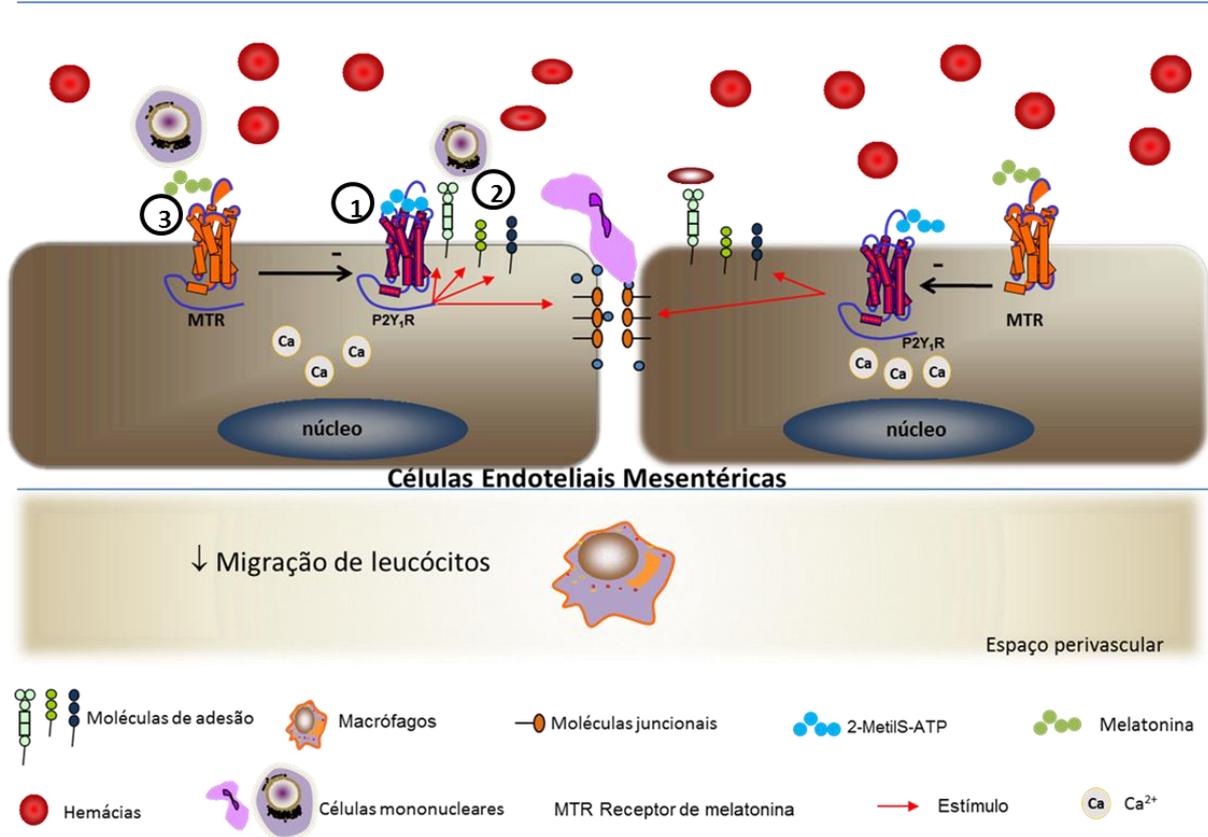


Figura 23: Efeito inibitório da melatonina na adesão leucocitária endotelial mediada por receptor P2Y₁. (1) Adesão leucocitária estimulada por P2Y₁R. (2) Mobilização de Ca²⁺ intracelular decorrente da sinalização P2Y₁ é capaz de ativar a célula endotelial aumentando a exposição de moléculas fundamentais para a adesão leucocitária à monocamada endotelial. (3) Inibição do processo pela melatonina via receptores MT₁ e/ou MT₂ (3).

Durante a lesão endotelial, ou ativação plaquetária, pode haver aumento da concentração do agonista ADP, o qual ativaria o processo de adesão leucocitária. Considerando que o infiltrado de células mononucleares contribui para processos vasculares inflamatórios tais como a aterosclerose, a caracterização da ação da melatonina sobre a interação leucócito-célula endotelial pode ajudar na identificação de vias de sinalização com possível efeito anti-inflamatório.

CONCLUSÃO

- A ativação do receptor purinérgico P2Y₁ endotelial estimula a adesão de células mononucleares.
- A melatonina inibe adesão leucocitária à monocamada endotelial mesentérica promovida por estímulo ao receptor P2Y₁. Esse efeito envolve os receptores de melatonina MT₁ e/ou MT₂.
- A adesão leucocitária via receptor purinérgico P2Y₁ independe da liberação das citocinas IL-1β e TNF-α.
- O efeito inibitório da melatonina não está associado à redução da expressão do receptor P2Y₁.
- A inibição da mobilização de Ca²⁺ intracelular impede a adesão de células mononucleares via sinalização P2Y₁.
- A via sinalização P2Y₁ modifica a disposição celular da molécula ICAM-1 sugerindo que o controle da exposição da molécula é um fator determinante para as modificações na adesão dos leucócitos à célula endotelial nos diferentes tratamentos. A melatonina impede esta exposição.
- Os resultados obtidos caracterizaram a ação anti-inflamatória da melatonina sobre a sinalização purinérgica endotelial.

Referências Bibliográficas

ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.M.; BARNARD, E.A.; BOYER, J.L.; KENNEDY, C.; KNIGHT, G.E.; FUMAGALLI, M.; GACHET, C.; JACOBSON, K.A.; WEISMAN, G.A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein -coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. **Pharmacol. Rev.** 58 (3): 281-341, 2006.

AIRD, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circ Res.** 100(2):158–173, 2007b.

AIRD, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative Vascular Beds. **Circ Res.** 100(2):158–173, 2007a.

ALCAIDE P.; AUERBACH, S.; LUSCINSKAS, F.W. Neutrophil Recruitment under Shear Flow: It's All about Endothelial Cell Rings and Gaps. **Microcirculation**, 16(1): 43-57, 2009.

ALEXANDER, S.P.H.; BENSON, H.E.; FACCENDA, E.; PAWSON, A.J.; SHARMAN, J.L.; SPEDDING, M.; PETERS, J.A.; HARMAR, A.J. (2013) The Concise Guide to pharmacology: Ligand-Gated Ion Channels. **Br J Pharmacol.** 170: 1582–1606, 2013.

ALLEN, S.; KHAN, S.; AL-MOHANNA, F.; BATTEN, P.; YACOUB, M. Native Low Density Lipoprotein–induced Calcium Transients Trigger VCAM-1 and E-selectin Expression in Cultured Human Vascular Endothelial Cells. **J. Clin. Invest.** 101(5):1064–1075, 1998.

ANTÓN-TAY, F., MARTÍNEZ, I., TOVAR, R., AND BENÍTEZ-KING, G. Modulation of the subcellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells. **J. Pineal Res.** 24(1):35–42, 1998.

AXELROD, J.; WEISSBACH, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. **Science.** 131:1312, 1960.

BARREIRO, O.; DE LA FUENTE, H.; MITTELBRUNN, M.; SANCHEZ-MADRID, F. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. **Immunol Rev.** 218: 147–164, 2007.

BARREIRO, O.; ZAMAI, M.; YÁÑEZ-MÓ, M.; TEJERA, E.; LÓPEZ-ROMERO, P.; MONK, P.N.; GRATTON, E.; CAIOLFA, V.R.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplatforms. **J Cell Biol.** 183:527-42, 2008.

BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiol Rev.** 84(3): 869–901, 2004.

BECKER-ANDRE, M.; WIESENBERG, I.; SCHAEREN-WIEMERS, N.; ANDRE, E.; MISSBACH, M.; SAURAT, J.H.; CARLBERG, C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. **J. Biol. Chem.** 269(46):28531–28534, 1994.

- BENHAM, C.D.; TSIEN, R.W. A novel receptor-operated Ca²⁺-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. **Nature**. 238(6137):275–278, 1987.
- BENÍTEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. **Life Sci**. 53(3):201–207, 1993.
- BORJIGIN, J.; WANG, M.M.; SNYDER, S.H. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. **Nature**. 378(6559):783–785, 1995.
- BOUTIN, JA.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends Pharmacol Sci**. 26(8):412-9, 2005.
- BRYDON, L.; ROKA, F.; PETIT, L.; COPPET, P.; TISSOT, M.; BARRETT, P.; MORGAN, J.P.; NANOFF, C.; STROSBURG, A.D.; JOCKERS, R. Dual Signaling of Human Mel1a Melatonin Receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 Proteins. **Mol Endocrinol**. 13(12):2025-2038, 1999.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. **Int Rev Cytol**. 240:31-302, 2004.
- BURNSTOCK, G.; RALEVIC, V. Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. **Pharmacol. Rev**. 66(1): 102-192, 2014.
- CARPENTIERI, A.; DÍAZ DE BARBOZA, G.; ARECO, V.; PERALTA LÓPEZ, M.; TOLOSA DE TALAMONI, N. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacol Res**. 65(4): 437-44, 2012.
- CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J.R.; ABREU, P.; LARDONE, P.J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J**. 18(3):537-9, 2004.
- CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J.M.; LARDONE, P.J.; REITER, R.J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**. 27(2):189–200, 2005a.
- CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P.J.; NAJI, L.; FERNÁNDEZ-SANTOS, J.M. MARTÍN-LACAVE, I.; GUERRERO, J.M.; CALVO, J.R. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. **J Pineal Res**. 39(4):400–408, 2005b.
- CARTER, T.D.; CHEN, X.Y.; CARLILE, G.; KALAPOTHAKIS, E.; OGDEN, D.; EVANS, W.H. Porcine aortic endothelial gap junctions: identification and permeation by caged InsP3. **J Cell Sci**. 109 (Pt 7):1765-73, 1996.
- CAUWELS, A.; ROGGE, E.; VANDENDRIESSCHE, B.; SHIVA, S.; BROUCKAERT, P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. **Cell Death Dis**. 5:e1102, 2014.
- CERNUDA-MOROLLÓN, E.; RIDLEY, A.J. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. **Circ Res**. 98(6):757-67, 2006.

- CHANDRASEKHARAN, U.M.; SIEMIONOW, M.; UNSAL, M.; YANG, L.; POPTIC, E.; BOHN, J.; OZER, K.; ZHOU, Z.; HOWE, P.H.; PENN, M.; DICORLETO, P.E. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. **Blood**. 109(5):1938–44, 2007.
- CHEN, K.H.; CHANG, B.H.; YOUNAN, P.; SHLYKOV, S.G.; SANBORN, B.M.; CHAN, L. Increased intracellular calcium transients by calmodulin antagonists differentially modulate tumor necrosis factor-alpha-induced E-selectin and ICAM-1 expression. **Atherosclerosis**. 165(1):5-13, 2002.
- CHEN, L.; HE, X.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; LAI, X.; SHAO, J.; SHI, Y.; ZHOU, N. Melatonin receptor type 1 signals to extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via Gi and Gs dually coupled pathways in HEK-293 cells. **Biochemistry**. 53(17):2827-39, 2014.
- CHENG, X.; WAN, Y.; XU, Y.; ZHOU, Q.; WANG, Y.; ZHU, H. Melatonin alleviates myosin light chain kinase expression and activity via the mitogen-activated protein kinase pathway during atherosclerosis in rabbits. **Mol Med Rep**. 11(1):99-104, 2015.
- COOPER, C.D.; LAMPE, P.D. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. **J Biol Chem**. 277(47): 44962–44968, 2002.
- DAI, J.; RAM, P.T.; YUAN, L.; SPRIGGS, L.L.; HILL, S.M. Transcriptional repression of RORalpha activity in human breast cancer cells by melatonin. **Mol. Cell. Endocrinol**. 176(1-2): 111–120, 2001.
- DAWICKI, D.D.; MCGOWAN-JORDAN, J.; BULLARD, S.; POND, S.; ROUNDS, S. Extracellular nucleotides stimulate leukocyte adherence to cultured pulmonary artery endothelial cells. **Am J Physiol**. 268(4 Pt 1):L666-73, 1995.
- DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B.M. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. **Dev Cell**. 16(2):209-21, 2009.
- DEL ZOPPO, G.J.; MILNER, R. Integrin–Matrix Interactions in the cerebral microvasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 26:1966-1975, 2006.
- DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A.; ABREU-GONZALEZ, P.; GARCIA-GONZALEZ, M.J.; SAMIMI-FARD, S.; KASKI, J.C.; REITER, R.J. Light/dark patterns of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in relation to melatonin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. **J Pineal Res**. 44(1):65-9, 2008.
- DUBOCOVICH, M.L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**. 27(2):101–110, 2005.
- DUBOCOVICH, M.L.; RIVERA-BERMUDEZ, M.A.; GERDIN, M.J.; MASANA, M.I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Front Biosci**. 8:d1093-1108, 2003.
- DUBOCOVICH, M.L.; YUN, K.; AL-GHOUL, W.M.; BENLOUCIF, S.; MASANA, M.I. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **FASEB J**, 12(12):1211-1220, 1998.

- DUBYAK, G.R. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 265(3 pt 1):577-606, 1991.
- DZIEGIEL, P.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; ZABEL, M. Melatonin: Adjuvant therapy of malignant tumors. **Med Sci Monit.** 14(5): 64-70, 2008.
- ELTZSCHIG, H.K.; SITKOVSKY, M.V.; ROBSON, S.C. Purinergic signaling during inflammation. **N Engl J Med.** 367(24):2322-33, 2012.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S.; MANNEVILLE, J.B.; ADAMSON. P.; WILBOURN, B.; GREENWOOD, J.; COURAUD, P.O. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. **J Immunol.**165(6):3375-83, 2000.
- FELETOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 291(3):H985-1002, 2006.
- FINOCCHIARO, L.M.E.; FINOCCHIARO, L.M.; NAHMOD, V.E.; LAUNAY, J.M. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. **Biochem J.** 280(Pt 3): 727-731, 1991.
- FLORIAN, J.A.; KOSKY, J.R.; AINSLIE, K.; PANG, Z.; DULL, R.O.; TARBELL, J.M. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. **Circ Res.**93(10):e136-42, 2003.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.** 33(7):829-37, 2012.
- FREYER, D.; MANZ, R.; ZIEGENHORN, A.; WEIH, M.; ANGSTWURM, K.; DÖCKE, W.D.; MEISEL, A.; SCHUMANN, R.R.; SCHÖNFELDER, G.; DIRNAGL, U.; WEBER, J.R. Cerebral endothelial cells release TNF- α after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. **J Immunol.** 163(8):4308-14, 1999.
- GOLIAS,C.H.; TSOUTSI, E.; MATZIRIDIS, A.; MAKRIDIS,P.; BATISTATOU, A., CHARALABOPOULOS, K. Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing on Inflammatory Heart Disease. **in vivo.** 21(5):757-770, 2007.
- GOMBAULT, A.; BARON, L.; COUILLIN, I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. **Front Immunol.** 3:414, 2013.
- GONZALEZ-MARISCAL, L.; BETANZOS, A.; AVILA-FLORES, A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. **Semin Cell Dev Biol** 11: 315–324, 2000.
- GRANGER DN, SENCHENKOVA E. Inflammation and the Microcirculation. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S.R.; CARDINALI, D.P. Melatonin. **Int J Biochem Cell Biol.** 38(3):313–316, 2006.

HARTSOCK, A.; NELSON, W.J. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochim. Biophys. Acta** 1778, 660–669, 2008.

HE, P. Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled? **Cardiovasc Res.** 87(2):281-90, 2010.

HECHLER, B.; FREUND, M.; RAVANAT, C.; MAGNENAT, S.; CAZENAVE, J.P.; GACHET, C. Reduced atherosclerotic lesions in P2Y1/apolipoprotein E double-knockout mice: the contribution of non-hematopoietic-derived P2Y1 receptors. **Circulation.** 118(7): 754-63, 2008

HEEMSKERK, N.; VAN RIJSSEL, J.; VAN BUUL, J.D. Rho-GTPase signaling in leukocyte extravasation: an endothelial point of view. **Cell Adh Migr.** 8(2):67-75, 2014.

HUBER, K.; HAMAD, B.; KIRKPATRICK, P. Ticagrelor. **Nature Rev Drug Discover.** 10: 255-256, 2011.

HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F.; BENÍTEZ-KING, G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. **J Pineal Res.** 17(2):55-62, 1994.

HUNG, M.W.; KRAVTSOV, G.M.; LAU, L.C.; POON, A.M.S.; TIPOE, G.L.; FUNG, M.L. Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. **J. Pineal Res.** 55:247–256, 2013.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 84(24):9265-9, 1987.

IIGO, Y.; SUEMATSU, M.; HIGASHIDA, T.; OHEDA, J.; MATSUMOTO, K.; WAKABAYASHI, Y.; ISHIMURA, Y.; MIYASAKA, M.; TAKASHI, T. Constitutive expression of ICAM-1 in rat microvascular systems analyzed by laser confocal microscopy. **Am J Physiol.** 273(1 Pt 2):138-147, 1997.

IMAIZUMI, T.; ITAYA, H.; FUJITA, K.; KUDOH, D.; KUDOH, S.; MORI, K.; FUJIMOTO, K.; MATSUMIYA, T.; YOSHIDA, H.; SATOH, K. Expression of tumor necrosis factor- α in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1 α . **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 20(2):410-5, 2000.

JACOB, F.; PÉREZ NOVO, C.; BACHERT, C.; VAN CROMBRUGGEN, K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. **Purinergic Signal.** 9(3):285-306, 2013.

JELLINGHAUS, S.; POITZ, D.M.; ENDE, G.; AUGSTEIN, A.; WEINERT, S.; STÜTZ, B.; BRAUN-DULLAEUS, R.C.; PASQUALE, E.B.; STRASSER, R.H. Ephrin-A1/EphA4-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells. **Biochim Biophys Acta.** 1833(10):2201-11, 2013.

JOCKERS, R.; MAURICE, P.; BOUTIN, J.A.; Delagrangé, P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? **Br J Pharmacol.** 154(6): 1182–1195, 2008

KLESZCZYNSKI, K.; FISCHER, T.W. Melatonin and human skin aging. **Dermatoendocrinol.** 4(3):245-52, 2012.

LAMPUGNANI, M.G.; RESNATI, M.; RAITERI, M.; PIGOTT, R.; PISACANE, A.; HOUEU, G.; RUCO, L.P.; DEJANA, E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. **J Cell Biol.** 118(6):1511-22, 1992.

LANGER, H.F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-Endothelial Interactions in Inflammation. **J Cell Mol Med.** 13(7):1211–1220, 2009.

LAUDANNA, C.; ALON, R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. **Thromb Haemost.** 95(1):5-11, 2006.

LAUDON, M.; FRYDMAN-MAROM, A. Therapeutic Effects of Melatonin Receptor Agonists on Sleep and Comorbid Disorders. **Int. J. Mol. Sci.** 15(9): 15924-50, 2014.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **PHARMACOL REP.** 61(1):22-32, 2009.

LEVOYE, A.; DAM, J.; AYOUB, M.A.; GUILLAUME, J.L.; COUTURIER, C.; DELAGRANGE, P.; JOCKERS, R. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. **The EMBO Journal.** 25(13): 3012–3023, 2006.

LI, J.H.; YU, J.P.; YU, H.G.; XU, X.M.; YU, L.L.; LIU, J.; LUO, H.S. Melatonin Reduces Inflammatory Injury Through Inhibiting NF- κ B Activation in Rats With Colitis. **Mediators Inflamm.** 4:185–193, 2005

LORENZON, P.; VECILE, E.; NARDON, E.; FERRERO, E.; HARLAN, J.M.; TEDESCO, F.; DOBRINA, A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. **J Cell Biol.** 142(5):1381-91, 1998.

LOTUFO, C.M.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M.L.; FARSKY, S.H.; MARKUS, R.P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur J Pharmacol.** 430(2-3):351-7, 2001.

LOTUFO, C.M.; YAMASHITA, C.E.; FARSKY, S.H.; MARKUS, R.P. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. **Eur J Pharmacol.** 534(1-3):258-63, 2006.

LOVENBERG, W.; JEQUIER, E.; SJOERDSMA, A. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. **Science.** 155(3759):217–219, 1967.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 193: 265-275, 1951.

LUCHETTI, F.; CANONICO, B.; BETTI, M.; ARCANGELETTI, M.; PILOLLI, F.; PIRODDI, M. CANESI, L.; PAPA, S.; GALLI, F. Melatonin signaling and cell protection function. **FASEB J.** 24(10):3603–3624, 2010.

LYUBCHENKO, T.; WOODWARD, H.; VEO, K.D.; BURNS, N.; NIJMEH, H.; LIUBCHENKO, G.A.; STENMARK, K.R.; GERASIMOVSKAYA, E.V. P2Y1 and P2Y13 purinergic receptors mediate Ca²⁺ signaling and proliferative responses in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 300(2):C266-75, 2011

MARKUS, R.P.; FERREIRA, Z.S.; FERNANDES, P.A.; CECON, E. The Immune-Pineal Axis: A Shuttle between Endocrine and Paracrine Melatonin Sources. **Neuroimmunomodulation.** 14(3-4):126-133, 2007.

MAURIZ, J.L.; COLLADO, P.S.; VENEROSO, C.; REITER, R.J.; GONZÁLEZ GALLEGO, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **J Pineal Res.** 54(1):1-14, 2013.

MEHTA, D.; MALIK, A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiol Rev.**86(1):279-367, 2006.

MICHEL, C.C.; CURRY, F.E. Microvascular Permeability. **Physiol Rev.** 79(3):703-761, 1999.

MOCCIA F.; BARUFFI, S.; SPAGGIARI, S.; COLTRINI, D.; BERRA-ROMANI, R.; SIGNORELLI, S.; CASTELLI, L.; TAGLIETTI, V.; TANZI, F. P2y1 and P2y2 receptor operated Ca²⁺ signals in primary cultures of cardiac microvascular endothelial cells. **Microvasc Res.** 61(3):240-52, 2001.

MOLINARI, E.J.; NORTH, P.C.; DUBOCOVICH, M.L. 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. **Eur J Pharmacol.** 301(1-3):159-68, 1996.

MORDI, I.; TZEMOS, N. Is reversal of endothelial dysfunction still an attractive target in modern cardiology? **World J Cardiol.** 6(8):824-35, 2014.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol.** 24(6): 327–234, 2003.

MULLER, W.A.; WEIGL, S.A.; DENG, X.; PHILLIPS, D.M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **J Exp Med.** 178(2):449–460, 1993.

NAKADA, M.T.; AMIN, K.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; O'BRIEN, C.D.; SUN, J.; GURUBHAGAVATULA, I.; HEAVNER, G.A.; TAYLOR, A.H.; PADDOCK, C.; SUN, Q.H.; ZEHNDER, J.L.; NEWMAN, P.J.; ALBELDA; S.M.; DELISSER, H.M. Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. **J Immunol.** 164(1): 452–462, 2000.

NEWMAN, P.J. The biology of PECAM-1. **J Clin Invest.** 99(1):3-8, 1997.

NEWTON, K.; DIXIT, V.M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 4(3):a006049, 2012.

NORMAN, K.E.; MOORE, K.L.; MCEVER, R.P.; LEY, K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. **Blood.** 86(12):4417-4421, 1995.

NOSJEAN, O.; FERRO, M.; COGE, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J.M.; LEFOULON, F.; FAUCHERE, J.L.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J.A. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J Biol Chem.** 275(40):31311-7, 2000.

OLIVEIRA, S.D.S. Caracterização das alterações na sinalização purinérgica em células endoteliais e em macrófagos murinos induzidas pela inflamação esquistossomótica [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2014. p.105.

OLIVEIRA, S.D.S.; QUINTAS, L.E.M.; AMARAL, L.S.; NOËL, F.; FARSKY, S.H.; SILVA, C.L.M. Increased Endothelial Cell-Leukocyte Interaction in Murine Schistosomiasis: Possible Priming of Endothelial Cells by the Disease. **PloSOne.** 6(8):e23547, 2011.

PALMER, R. M. J.; FERRIGO, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 327(6122):524-525, 1987.

PANDI-PERUMAL, S.R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G.J.; CARDINALI, D.P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **FEBS J.** 273(13):2813-38, 2006.

PARKER, A.L.; LIKAR, L.L.; DAWICKI, D.D.; ROUNDS, S. Mechanism of ATP-induced leukocyte adherence to cultured pulmonary artery endothelial cells. **Am J Physiol.** 270(5 Pt 1):L695-703, 1996.

PÉREZ-RICO, C.; DE LA VILLA, P.; BLANCO, R.; GERMAIN, F.; PAZ-MORENO, J.; ARRIBAS-GÓMEZ, I. Alterations in nocturnal melatonin levels in patients with optic neuropathies. **Arch Soc Esp Oftalmol.** 84(5):251-257, 2009.

PETIT V.; THIERY, J.P. Focal adhesions: structure and dynamics. **Biol Cell** 92:477-94, 2000.

POBER, J.S. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. **Arthritis Res.** 4 (Suppl 3):S109-16, 2002.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol.** 7(10): 803-815, 2007.

PRASAIN, N.; STEVENS, T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. **Microvasc Res.** 77(1):53-63, 2009.

PRIVRATSKY, J.R.; NEWMAN, D.K.; NEWMAN, P.J. PECAM-1: Conflicts of Interest in Inflammation. **Life Sci.** 17; 87(3-4): 69-82, 2000.

- QUINLAN, K.L.; NAIK, S.M.; CANNON, G.; ARMSTRONG, C.A.; BUNNETT, N.W.; ANSEL, J.C.; CAUGHMAN, S.W. Substance P Activates Coincident NF-AT- and NFkB-Dependent Adhesion Molecule Gene Expression in Microvascular Endothelial Cells Through Intracellular Calcium Mobilization. **J Immunol.** 163(10):5656-5665, 1999.
- RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L.. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochem Pharmacol.** 80(12): 1844-52, 2010.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacol Rev.** 50(3):413-492, 2008.
- RAM, P.T.; DAI, J.; YUAN, L.; DONG, C.; KIEFER, T.L.; LAI, L.; HILL, S.M. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. **Cancer Lett.** 179(2):141–150, 2002.
- REGLERO-REAL, N.; MARCOS-RAMIRO, B.; MILLÁN, J. Endothelial membrane reorganization during leukocyte extravasation. **Cell Mol Life Sci.** 69(18):3079-99, 2012.
- REITSMA, S.; SLAAF, D.W.; VINK, H.; VAN ZANDVOORT, M.A.M.J.; EGBRINK, M.G.A.O. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. **Eur J Physiol.** 454:345–359, 2007.
- RIBELAYGA, C.; GARIDOU, M.L.; MALAN, A.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX, V. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its consequence on melatonin synthesis. **J Biol Rhythms.** 14(2):105–115, 1999.
- ROMERO, M.P.; GARCÍA-PERGAÑEDA, A.; GUERRERO, J.M.; OSUNA, C. Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. **FASEB J.** 12(13):1401–1408, 1998.
- ROSEBOOM, P.H.; COON, S.L.; BALER, R.; MCCUNE, S.K.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat pineal gland. **Endocrinology.** 137(7):3033–3045, 1996.
- ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J.; KAYE, G.I. Cardiovascular System. In: *Histology: A text and Atlas.* 3 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1995.
- SALISBURY, E.; HIPPEL, J.; OLMSTED-DAVIS, E.A.; DAVIS, A.R.; HEGGENESS, M.H.; GANNON, F.H. Histologic identification of brown adipose and peripheral nerve involvement in human atherosclerotic vessels. **Hum Pathol.** 43(12):2213-22, 2012.
- SCHMIDT, E.P.; LEE, W.L.; ZEMANS, R.L.; YAMASHITA, C.; DOWNEY, G.P. On, Around, and Through: Neutrophil-Endothelial Interactions in Innate Immunity. **Physiology.** 26(5):334–347, 2011.
- SCHUCHARDT, M.; TÖLLE, M.; VAN DER GIET, M. P2Y Purinoceptors as Potential Emerging Therapeutical Target in Vascular Disease. **Curr Pharm Des.** 18(37):6169-6180, 2012.

- SEYE, C.I.; YU, N.; JAIN, R.; KONG, Q.; MINOR, T.; NEWTON, J.; ERB, L.; GONZÁLEZ, F.A.; WEISMAN, G.A. The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. **J Biol Chem**. 278(27):24960-5, 2003.
- SHAMRI, R.; GRABOVSKY, V.; GAUGUET, J.M.; FEIGELSON, S.; MANEVICH, E.; KOLANUS, W.; ROBINSON, M.K.; STAUNTON, D.E.; VON ANDRIAN, U.H.; ALON, R. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endotheliumbound chemokines. **Nat Immunol**. 6(5): 497–506, 2005.
- SILVA, C.L.M.; TAMURA, E.K.; MACEDO, S.M.D.; CECON, E.; BUENO-ALVES, L.; FARSKY, S.H.P.; FERREIRA, Z.S.; MARKUS, R.P. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. **Br J Pharmacol**. 151(2):195-205, 2007.
- SIMMONS, D.L.; WALKER, C.; POWER, C.; PIGOTT, R. Molecular cloning of CD3 1, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. **J Exp Med**. 171(6):2147- 2152, 1990.
- SLOMINSKI, R.M.; REITER, R.J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R.S.; SLOMINSKI, A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Mol Cell Endocrinol**. 351(2):152-66, 2012.
- SMIRNOV, A.N. Nuclear melatonin receptors. **Biochemistry**. 66(1):19– 26, 2001.
- SPERANDIO, M.; SMITH, M.L.; FORLOW, S.B.; OLSON, T.S.; XIA, L.; MCEVER, R.P.; LEY, K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin- dependent leukocyte rolling in venules. **J Exp Med**. 197(10):1355-1363, 2003.
- SPRINGER, T.A.; DUSTIN, M.L. Integrin Inside-Out Signalling and the Immunological Synapse. **Curr Opin Cell Biol**. 24(1): 107–115, 2012.
- STEINHOFF, G.; BEHREND, M.; SCHRADER, B.; DUIJVESTIJN, A. M.; WONIGEIT, K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. **Am J Pathol**. 142(2):481–488, 1993.
- STEVENSON, N.L.; MARTIN-MARTIN, B.; FREEMAN, J.; KRISTON-VIZI, J.; KETTELER, R.; CUTLER, D.F. G protein-coupled receptor kinase 2 moderates recruitment of THP-1 cells to the endothelium by limiting histamine-invoked Weibel-Palade body exocytosis. **J Thromb Haemost**. 12(2):261-72, 2014.
- SUMPIO, B.E.; RILEY, J.T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **Int J Biochem Cell Biol**. 34(12):1508–1512, 2002.
- SUNDD, P.; POSPIESZALSKA, M.K. CHEUNG, L.S.; KONSTANTOPOULOS, K.; LEY, K. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**. 48(1):1-35, 2011.

- TAMURA, E.K.; FERNANDES, P.A.; MARÇOLA, M.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MARKUS, R.P. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. **PLoS One**. 5(11):e13958, 2010.
- TANAKA, Y.; ALBELDA, S.M.; HORGAN, K.J.; VAN SEVENTER, G.A.; SHIMIZU, Y.; NEWMAN, W.; HALLAM, J.; NEWMAN, P.J.; BUCK, C.A.; SHAW, S. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin mediated adhesion. **J Exp Med**. 176(1):245-53, 1992.
- TENBROEK, E.M.; LAMPE, P.D.; SOLAN, J.L.; REYNHOUT, J.K.; JOHNSON, R.G. Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. **J Cell Biol**. 155(7): 1307-1318, 2001.
- TOCHARUS, J.; KHONTHUN, C.; CHONGTHAMMAKUN, S.; GOVITRAPONG, P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. **J Pineal Res**. 48(4):347-52, 2010.
- VAN BUUL, J.D.; VAN RIJSSEL, J.; VAN ALPHEN, F.P.; VAN STALBORCH, A.M.; MUL, E.P.; HORDIJK, P.L. ICAM-1 clustering on endothelial cells recruits VCAM-1. **J Biomed Biotechnol**. 120328, 2010.
- VAN RIJEN, H.; VAN KEMPEN, M.J.; ANALBERS, L.J.; ROOK, M.B.; VAN GINNEKEN, A.C.; GROS, D.; JONGSMA, H.J. Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. **Am J Physiol Cell Physiol** 272 (1 Pt 1): C117–C130, 1997.
- VENEROSO, C.; TUÑÓN, M.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; COLLADO, P.S. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. **J Pineal Res**. 47(2):184–191, 2009.
- VESTWEBER, D.; BLANKS, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol Rev**. 79(1):181-213, 1999.
- VOCKEL, M.; VESTWEBER, D. How T cells trigger the dissociation of the endothelial receptor phosphatase VE-PTP from VE-cadherin. **Blood**. 122(14):2512-22, 2013.
- VOLONTÉ, C.; AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; COLPI, M.; BURNSTOCK, G. P2 receptor web: complexity and fine-tuning. **Pharmacol Ther**. 112(1):264-80, 2006.
- VON GALL, C.; STEHLE, J.H.; WEAVER, D.R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. **Cell Tissue Res**. 309(1):151–162, 2002.
- WALDO, G.L.; MORRIS, A.J.; KLAPPER, D.G.; HARDEN, T.K. Receptor and G-protein regulated 150-kDa avian phospholipase C: Inhibition of enzyme activity by isoenzyme specific antisera and nonidentity with mammalian phospholipase C isoenzymes established by immunoreactivity and peptide sequence. **Mol Pharmacol**. 40(4):480–489, 1991.
- WALLEZ, Y.; HUBER, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. **Biochim Biophys Acta**. 1778(3):794-809, 2008.

- WANG, J.; SPRINGER, T.A. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. **Immunol Rev.** 163:197–215, 1998.
- WANG, L.; KARLSSON, L.; MOSES, S.; HULTGÅRDH-NILSSON, A.; ANDERSSON, M.; BORNA, C.; GUDBJARTSSON, T.; JERN, S.; ERLINGE, D. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol.** 40(6):841-53, 2002.
- WANG, Y.; LIU, X.; WANG, W.; SONG, W.; CHEN, L.; FANG, Q.; YAN, X. The expression of inflammatory cytokines on the aorta endothelia are up-regulated in pinealectomized rats. **Inflammation.** 36(6):1363-73, 2013.
- WEBB, T.E.; FEOLDE, E.; VIGNE, P.; NEARY, J.T.; RUNBERG, A.; FRELIN, C.; BARNARD, E.A. The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase. **Br J Pharmacol.** 119(7):1385–1392, 1996.
- WEISSBACH, H.; REDFIELD, .B.G.; AXELROD, J. Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetyl-serotonin. **Biochem Biophys Acta.** 43:352– 353, 1960.
- WILLIAMS, M.; AZCUTIA, V.; NEWTON, G.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F.W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunol.** 32(10):461–469, 2011.
- WILSON, H.L.; VARCOE, R.W.; STOKES, L.; HOLLAND, K.L.; FRANCIS, S.E.; DOWER, S.K.; SURPRENANT, A.; CROSSMAN, D.C. P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. **Br J Pharmacol.** 151(1):115-27, 2007.
- WITTCHEN, E.S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. **Front Biosci.** 14:2522–2545, 2009.
- WU, Y.; STABACH, P.; MICHAUD, M.; MADRI, J.A. Neutrophils lacking platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis. **J Immunol.** 175(6):3484–3491, 2005.
- XIAO, L.; LIU, Y.; WANG, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 306(3):H317–H325, 2014.
- YANG, L.; KOWALSKI, J.R.; YACONO, P.; BAJMOCZI, M.; SHAW, S.K.; FROIO, R.M.; GOLAN, D.E.; THOMAS, S.M.; LUSCINSKAS, F.W. Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. **J Immunol.** 177(9):6440-9, 2006.
- YUAN, S.Y.; RIGOR, R.R. Signaling Mechanisms in the Regulation of Endothelial Permeability. In: Regulation of Endothelial Barrier Function. San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
- YUAN, S.Y.; SHEN, Q.; RIGOR, R.R.; WU M.H. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. **Microvasc Res.** 83(1):82–88, 2012.

YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; ANDERSON, M.E.; YAKOVLEVA, T.V.; MURRAY, J.S.; SIAHAAN, T.J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Med Res Rev.** 22(2):146-67, 2002.

ZARBOCK, A.; LEY, K.; MCEVER, R.P.; HIDALGO, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood.** 118(26):6743-51, 2011.

ZERR, M.; HECHLER, B.; FREUND, M.; MAGNENAT, S.; LANOIS, I.; CAZENAVE, J.P.; LÉON, C.; GACHET, C. Major contribution of the P2Y receptor in purinergic regulation of TNF α -induced vascular inflammation. **Circulation.** 123(21): 2404-13, 2011.

ZHU, H.Q.; LI, Q.; DONG, L.Y.; ZHOU, Q.; WANG, H.; WANG, Y. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression. **Int J Cardiol.** 176(3):764-70, 2014.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. **Prog Neurobiol.** 49(6):589–618, 1996.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal.** 8(3):437–502, 2012.