

Joana Margarida Rosmaninho Salgado

Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina 1- β e do neuropeptídeo Y

Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

2007

Joana Margarida Rosmaninho Salgado

Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina 1- β e do neuropeptídeo Y

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para prestação de provas de Doutoramento em Ciências e Tecnologia da Saúde, especialidade Biologia Celular e Molecular.

Este trabalho foi realizado no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, ao abrigo de uma bolsa de doutoramento atribuída pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/10394/2002) e financiada pelo projecto POCTI/SAL-FCF/60399/2004).

Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

2007

Agradecimentos

Ao centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra desejo agradecer por me ter acolhido e me ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho

À Professora Doutora Cláudia Cavadas agradeço pela orientação, ensinamentos, incentivo, e empenho que contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada, também, pelo seu apoio, disponibilidade, e por todos os momentos de “adrenalina” e alegria nos nossos congressos das cromafins. Obrigada por me ter aceite neste projecto, pela coragem, e pela ajuda que me deu para seguir em frente, e não desistir dum sonho. Obrigada pela confiança e por me ter ajudado e nunca ter questionado a minha decisão e, redescobrir que afinal em ciência também se sorri! Obrigada pela sua amizade!

À Professora Doutora Emília Duarte desejo manifestar o meu profundo agradecimento pelo apoio e encorajamento em todas as etapas deste trabalho, pela disponibilidade com que sempre leu os meus trabalhos e pelas inúmeras sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho. Quero ainda agradecer todos os ensinamentos e confiança que depositou em mim na “árdua” tarefa de trabalhar e “cuidar” do “nosso” HPLC.

Ao Doutor Eric Grouzmann da Divisão de Toxicologia e Farmacologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário de Vaudois, Lausanne, Suíça, agradeço a excelente oportunidade que me deu de fazer parte do seu grupo de trabalho e pelos desafios e confiança que me deu. O seu espírito científico, o seu humor e a sua amizade contribuíram para que os longos meses passados em Lausanne tenham ficado na memória, e com a saudade de um dia voltar.

À unidade de Transplantação do Hospital Universitário de Coimbra, em especial à Enfermeira Teresa Saavedra e ao Professor Doutor Alfredo Mota quero agradecer a eficiência em fornecer as glândulas supra-renais humanas, a qualquer hora do dia e da noite, e que sem elas seria impossível a realização deste trabalho.

À Rita, uma amiga, que por acaso “partilho o mesmo espaço de trabalho”, agradeço toda a colaboração e apoio na realização prática deste trabalho. Quero ainda agradecer por todos aqueles momentos hilariantes de cansaço de final de dia, por todas as nossas “manhas e truques”, por todos conselhos, pelo (enorme)

ombro amigo, pela disponibilidade para me ouvires (sempre) ... e pela tua incondicional amizade. Obrigada, miúda!

Aos meus colegas e amigos do laboratório, agradeço a companhia, o verdadeiro espírito de entreajuda e partilha, e a boa disposição: Ana, Ana Maria, Ana Paula, Armando, Áurea, Denisa, Dr. Caetana, Carreira, Célia, Ermelindo, Francisco, Gabriel, Inês Almeida, Inês Araújo, João M., Joana L., Joana G., Lúgia, Liliana B., Marco, Paulo, Raquel, Sara, Susana, Tiago. Um agradecimento muito especial à Ana e à Raquel por todos os desabafos, confidências, conselhos e ajudas trocadas dentro do “nosso” gabinete; Ao Carreira, ao Marco, à Inês Araújo e à Joana L. porque fora do laboratório a amizade continua!

À Fátima um muito obrigada pela disponibilidade e ajuda sem a qual teria sido impossível superar o medo dos “terríveis” ratinhos.

À Daniëla Grand, “ma mère en suisse”, um muito obrigado pela preciosa ajuda laboratorial, paciência, disponibilidade e amizade. Ao Daniël Cefai desejo agradecer o auxílio e os ensinamentos práticos sem os quais seria impossível realizar uma parte do trabalho experimental que apresento nesta dissertação.

Quero agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRJf/BD/10394/2002) a Bolsa de Doutoramento que me foi concedida para a concretização do projecto de Doutoramento.

Aos Amigos, que fora da bancada me acompanharam neste percurso, agradeço as palavras de incentivo e de amizade que me deram nestes últimos 4 anos, em especial: os meus meninos Gonçalo e João; a minha watermelon Joana; as minhas meninas Ana e Lena; a minha “família emprestada” Amílcar, Romi, Pedro e Lisete; a família “verdadeira”: Beto, Isaura, Tio Carlos, Tia Lena, Ritinha e Ana. Ao Rui um obrigado especial, simplesmente pelo especial que és!

Aos meus pais, os meus maiores orientadores, agradeço todo o carinho e amizade que deram ao longo deste percurso. Obrigada por acreditarem e confiarem em mim, e sobretudo por compreenderem a minha “ausência”. Ao meu irmão quero agradecer por seres o melhor irmão! Obrigado “caramelo”... sem ti, tudo seria mais difícil de ultrapassar!

Os resultados apresentados nesta dissertação estão publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas com arbitragem:

Rosmaninho-Salgado J, Álvaro AR, Grouzmann E, Duarte EP, Cavadas C.. Neuropeptide Y regulates catecholamine release evoked by interleukin-1beta in mouse chromaffin cells. Peptides. 2007 Feb; 28(2): 310-4

Cavadas C, Cefai D, Rosmaninho-Salgado J, Vieira-Coelho MA, Moura E, Busso N, Pedrazzini T, Grand D, Rotman S, Waeber B, Aubert JF, Grouzmann E. Deletion of the neuropeptide Y (NPY) Y₁ receptor gene reveals a regulatory role of NPY on catecholamine synthesis and secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 5;103 (27): 10497-502.

Rosmaninho-Salgado J, Araújo IM, Álvaro AR, Duarte EP, Cavadas C. (2007) Intracellular signalling mechanisms mediating catecholamine release upon activation of NPY Y₁ receptors in mouse chromaffin cells (submetido para publicação).

Rosmaninho-Salgado J, Araújo IM, Álvaro AR, Mendes AF, Ferreira L, Grouzmann E, Mota A, Duarte EP, Cavadas C. (2007) Interleukin-1 β stimulates catecholamine release from human chromaffin cells: roles of nitric oxide and neuropeptide Y (submetido para publicação)

Índice

Abreviaturas	1
Resumo	3
Abstract	7

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. A célula cromafim na glândula supra-renal	13
1.1.1. As glândulas supra-renais	13
1.1.2 As células cromafins	14
1.1.2.1 Regulação da síntese de catecolaminas	16
1.1.2.2 A hidroxilase da tirosina	17
1.1.2.2.1 Factores de regulação da transcrição da TH	19
1.1.2.2.2 A regulação da actividade da TH	19
1.1.2.3 Metabolização das catecolaminas	22
1.1.2.4 Mecanismos de regulação do conteúdo intracelular das catecolaminas	23
1.1.2.5 A síntese de peptídeos nas células cromafins	25
1.1.2.6 Libertação de catecolaminas	25
1.1.2.6.1 O processo de libertação de catecolaminas por exocitose	25
1.1.2.6.2 Mecanismos intracelulares associadas à libertação de catecolaminas	29
1.2 Neuropeptídeo Y (NPY)	32
1.2.1 Estrutura, localização e síntese do NPY	32
1.2.2. Metabolização do NPY	34
1.2.3 Receptores do NPY	35
1.2.3.1. Vias de transdução de sinal acopladas ao receptor Y ₁	38
1.2.4 O NPY na glândula supra-renal	40
1.2.4.1 Localização do NPY e seus receptores na glândula supra-renal	40
1.2.4.2 Efeitos do NPY na medula supra-renal	41
1.3 Interleucina-1β (IL-1β)	43
1.3.1 A família da interleucina-1	43
1.3.1.1 Interleucina-1 β	43
1.3.1.1.1 Síntese, processamento e libertação	43
1.3.1.2 Receptores da Interleucina-1	44
1.3.1.3 Antagonista do receptor da Interleucina-1 β (IL-1ra)	45
1.3.1.4 Vias de transdução de sinal acopladas aos receptores da IL-1 β	46
1.3.2 A Interleucina-1 β na glândula supra-renal	47
1.3.3 A Interleucina-1 β e patologias	47
1.4 Monóxido de azoto (NO)	50
1.4.1 Produção de NO pelas sintases do monóxido de azoto (NOS)	50
1.4.2 Regulação da NOS	51
1.4.3 Mecanismos intracelulares activados pelo NO	52
1.4.4 NO e patologias	52
1.4.5 O efeito do NO na medula da glândula supra-renal	53
1.5 Objectivos do trabalho	55

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 Cultura de células cromafins	59
2.1.1 Cultura de células cromafins humanas	59
2.1.2 Cultura das células da glândula supra-renal de murganho	60
2.2 Experiência de libertação de catecolaminas e NPY	61
2.2.1 Experiência de libertação em perfusão	61
2.2.2 Experiência de libertação em placas	62
2.3 Separação e doseamento de catecolaminas (NA e AD)	63
2.3.1 Processo de extracção de catecolaminas pelo método da alumina	63
2.4 Doseamento do NPY	64
2.5 SDS-PAGE e “Western e Blot”	65
2.6 Medição da actividade do promotor da Hidroxilase da tirosina	66
2.6.1 Cultura celular da linha celular SK-N-MC	66
2.6.2 Transfecção por electroporação das células SK-N-MC	66
2.6.3 Actividade da luciferase	67
2.7 Imunohistoquímica da glândula supra-renal	69

Capítulo 3

Mecanismos intracelulares acoplados à activação do receptor Y_1 do NPY que estimulam a libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho

3.1 Introdução	73
3.2 Resultados	74
3.2.1 O NPY aumenta a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y_1 e de uma forma dependente de Ca^{2+}	74
3.2.2 A libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY depende da activação da via da MAPK e da PKC, mas de uma forma independente da PKA	75
3.2.3 A via NO-GMPc modula a libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY, num processo dependente da PKC	76
3.3 Discussão	78

Capítulo 4

O receptor Y_1 e a síntese de catecolaminas: regulação do promotor da hidroxilase da tirosina

4.1 Introdução	85
4.2 Resultados	86
4.2.1 O NPY, activando o receptor Y_1 , regula o efeito da forskolina na activação do promotor da TH	86
4.2.2 O papel da PKA na activação do promotor da TH	88
4.2 Discussão	90

Capítulo 5

O neuropeptídeo Y regula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho quando estimuladas por interleucina-1 β

5.1 Introdução	97
5.2 Resultados	97
5.2.1 A IL-1 β aumenta a libertação de NPY nas células cromafins de murganho.....	97
5.2.2 A IL-1 β aumenta a libertação de catecolaminas (NA e AD): efeito regulado pelo NPY	98
5.3 Discussão	100

Capítulo 6

A libertação de catecolaminas das células cromafins humanas estimuladas pela interleucina-1 β : papel do neuropeptídeo Y e do monóxido de azoto

6.1 Introdução	105
6.2 Resultados	106
6.2.1 A IL-1 β estimula a libertação e a síntese de catecolaminas das células cromafins humanas	106
6.2.2 O NPY endógeno regula a libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β em células cromafins humanas.....	109
6.2.3 O NO e a libertação de catecolaminas nas células cromafins humanas.....	110
6.2.4 Papel das cinases MAPK, PKA e PKC na libertação de catecolaminas estimuladas pela IL- β	112
6.2.5 A libertação de catecolaminas estimulada por NPY envolve a via das MAPK e a via PKA/NOS/PKC	114
6.3 Discussão	116

Capítulo 7

Conclusões gerais	123
Referencias Bibliográficas	127

Índice__

Abreviaturas

AD	adrenalina
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
AMPT	alfa-metil-para-tirosina
AP-P	aminopeptidase P
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BH₄	tetrabiopterina
[Ca²⁺]_i	concentração intracelular de cálcio livre
CaMKII	proteína cinase dependente de cálcio e de calmodulina do tipo II
COMT	catecol-O-metiltransferase
CPE	enzima do tipo carboxilase B
CPON	peptídeo que flanqueia o NPY
CRE	elementos de resposta para o AMPc
CREB	proteína com afinidade para o elemento de resposta para o AMPc
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
DβH	β hidroxilase da dopamina
DHPG	ácido -3,4-dihidroxifenilglicol
DMEM	meio de Dulbecco modificado por Eagle
DNA	ácido dexoxirribonucleico
DOPA	3,4-dihidroxi-fenilalanina
DPP8	dipeptidil-peptidase 8
DPP9	dipeptidil-peptidase 9
DPP-IV	dipeptidil-peptidase IV
CE₅₀	concentração que estimula 50 % do efeito máximo
ECF	quimiofluorescência melhorada
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático em “sandwich”
eNOS	sintase do monóxido de azoto do tipo endotelial
FCS	soro fetal bovino
FMN	flavina adenina mononucleotídica
GC	guanidil ciclase
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)peperazina-N'-2-etanosulfónico
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
IC₅₀	concentração que inibe 50 % do efeito máximo
IL-1β	Interleucina-1β
IL-1RI	receptor da interleucina do tipo I
IL-1RII	receptor da interleucina do tipo II
IL-1ra	antagonista do receptor da IL-1
IL-1RAcP	proteína acessória do receptor da IL-1
iNOS	sintase do monóxido de azoto do tipo indutível
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
MAO	monoaminoxidase
MAPK	proteína cinase activada por agentes mitogénicos
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
MN	metanefrina
MOPEG	metoxihidroxifenilglicol
MOPEGAL	3,4-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldeído
NA	noradrenalina
NET	transportador membranar de noradrenalina

Abreviaturas

NGF	factor de crescimento neuronal
NMN	normetanefrina
NO	monóxido de azoto
NOS	sintase do monóxido de azoto
nNOS	sintase do monóxido de azoto do tipo neuronal
NPY	neuropeptídeo Y
PACAP	factor activador da adenilciclase pituitária
PC-12	linha celular derivada de feocromocitoma de rato
PDE	fosfodiesterases dependentes do GMPc
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase sensível ao GMPc
PLA	fosfolipase A
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PNMT	metiltransferase da feniletanolamina
PP	polipeptídeo pancreático
PYY	peptídeo YY
p/v	peso por volume
r.p.m	rotações por minuto
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	ácido ribonucleico mensageiro
SEM	erro padrão da média
SNAP	proteína soluvel de ligação ao NSF
SNAP-25	proteína sinaptossomal de 25KDa
SNARE	receptor das SNARE
TBS-T	solução de PBS com Tween 20
TH	hidroxilase da tirosina
VMT	transportadores membranares das vesículas
v/v	volume por volume
VIP	peptídeo intestinal vasoactivo
VOCC	canais de cálcio sensíveis à voltagem
Tris	2-amino -2 hidroximetil – 1,3 – propanodiol
Y₁^{-/-}	animais deficientes para o receptor Y ₁ (“knock-out”)
Y₁^{+/+}	animais controlo

Resumo

A activação do eixo hipotálamo-glândula pituitária-suprarrenal (HPA) pode modular o sistema imunitário. As citocinas e o neuropeptídeo Y (NPY) são reguladores do eixo HPA e ambos são produzidos pela medula da supra-renal. A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina cuja função na libertação de catecolaminas pelas células cromafins é ainda controversa. Por outro lado, o NPY é um neuropeptídeo que pode ser co-libertado com as catecolaminas e ainda estimular a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas e de murganho. No entanto os mecanismos intracelulares acoplados à activação dos receptores do NPY e à estimulação da libertação de catecolaminas ainda é desconhecido.

O primeiro objectivo deste trabalho consistiu em estudar os mecanismos intracelulares acoplados à activação do receptor Y₁ do NPY que induzem um aumento da libertação de catecolaminas (noradrenalina, NA e adrenalina, AD) pelas células cromafins de murganho. O antagonista do receptor Y₁, BIBP 3226, inibiu o efeito estimulador do NPY, comprovando que o receptor Y₁ está envolvido no processo de libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho. Além disso, verificou-se que libertação de catecolaminas estimulada pela activação do receptor Y₁ ocorre através de um processo dependente de Ca²⁺. Por outro lado, o inibidor da sintase do monóxido de azoto (NOS) e o inibidor da guanidil ciclase (GC) também diminuíram o efeito estimulador do NPY, sugerindo que o monóxido de azoto (NO) e o monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) produzidos são importantes reguladores da libertação de catecolaminas estimuladas por NPY. A função do NO como regulador da libertação de catecolaminas foi, ainda, confirmada incubando as células com um dador externo de NO, o NOC-18, que estimulou a libertação de catecolaminas de um modo semelhante ao observado com NPY. O efeito estimulador do NOC-18 foi também inibido na presença do inibidor da GC, ODQ, o que sugere que o NO activa a GC levando a um aumento de produção de GMPc.

De modo a avaliar o envolvimento de outras vias de sinalização intracelulares acopladas à activação do receptor Y₁ e à libertação de catecolaminas, as células

Resumo _____

cromafins de murganho foram incubadas com inibidores das MAPK, PKC e PKA na presença de NPY ou NOC-18. Os resultados mostram que o efeito estimulador do NPY foi inibido pelos inibidores das MAPK e da PKC; no entanto, o efeito do NOC-18 foi apenas inibido na presença do inibidor da PKC. Estes resultados sugerem que libertação de catecolaminas estimuladas por NPY ocorre através da activação de duas vias: a via das MAPK, independente de NO, e a via da PKC, dependente de NO.

Em conclusão, esta parte do trabalho aqui apresentado demonstra que a activação do receptor Y_1 nas células cromafins de murganho induz um aumento na libertação de catecolaminas de uma forma dependente de Ca^{2+} e ainda através da activação das MAPK. A libertação de catecolaminas estimulada pela activação do receptor Y_1 é ainda dependente da produção de NO, que por sua vez activa a GC e subsequentemente a PKC.

Sabendo que a activação do receptor Y_1 induz o aumento da libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho e que a concentração intracelular de catecolaminas é resultante de um equilíbrio entre a libertação e a síntese de catecolaminas, o segundo objectivo desta tese foi avaliar a existência de uma interacção molecular entre a activação do receptor Y_1 e o promotor da hidroxilase da tirosina (TH).

Como modelo celular foi utilizado a linha celular SK-N-MC, que possui o receptor Y_1 e que foi transfectada com um plasmídeo contendo o gene da luciferase acoplado a um fragmento do promotor da TH humana. Este promotor da TH possui alguns dos locais de ligação para factores de transcrição que são importantes para a activação do promotor da TH e a consequente indução da expressão da TH. Um exemplo é o local de ligação dos elementos de resposta ao AMPc (CRE). Assim, o aumento ou a diminuição da actividade da luciferase corresponde a activação ou inibição do promotor da TH. A forskolina aumentou a actividade da luciferase e o NPY inibiu este efeito estimulador. O antagonista do receptor Y_1 , BIBP 3226, inibiu o efeito do NPY na activação da luciferase pela forskolina. O inibidor da PKA produziu um efeito semelhante ao efeito do NPY, enquanto que o inibidor da PKC não modificou a actividade da luciferase. Em conclusão, estes resultados sugerem uma relação directa entre a activação do receptor Y_1 e o promotor da TH através da PKA.

Como foi referido anteriormente, é ainda controverso o papel da IL-1 β na libertação do conteúdo dos grânulos cromafins pelas células cromafins. Assim, nos capítulos 5 e 6 foi avaliado o efeito da IL-1 β na libertação de catecolaminas e de NPY pelas células cromafins de murganho e humanas. Os resultados obtidos mostraram que a IL-1 β aumenta a libertação de catecolaminas e de NPY, sendo este efeito inibido pelo antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). O papel do NPY na libertação de catecolaminas estimulada pela IL-1 β foi avaliado através da imunoneutralização do NPY com o anticorpo anti-NPY, verificando-se uma inibição do efeito estimulador da IL-1 β . Estes resultados sugerem que o efeito estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho e humanas é, em parte, mediado pelo NPY. Por outro lado, nas células cromafins humanas a activação das MAPK e a produção de NO com a consequente activação da PKC e da GC são as principais vias de sinalização intracelular responsáveis pelo efeito estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas nas células cromafins humanas.

Nas células cromafins humanas foi ainda avaliado o papel da IL-1 β na síntese de catecolaminas. Para tal, as células foram incubadas com um inibidor da hidroxilase da tirosina (TH), o AMPT, que inibiu o efeito estimulador da IL-1 β , sugerindo a possibilidade de uma relação entre a IL-1 β e a TH. Uma vez que a actividade da TH é regulada pela fosforilação dos seus resíduos de Ser⁴⁰, pela técnica de Western Blot, verificou-se que uma incubação de 2 minutos com IL-1 β aumentou a fosforilação do resíduo Ser⁴⁰ da TH.

Nas células cromafins humanas foram ainda investigados os mecanismos intracelulares acoplados ao receptor Y₃ cuja activação estimula a libertação de catecolaminas. A inibição do efeito estimulador do NPY ocorreu na presença do inibidor da NOS, e ainda pelos inibidores da GC, das MAPK, da PKC e da PKA. Por outro lado, a inibição da PKA não alterou o efeito estimulador do NOC-18 na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas, e o efeito estimulador do activador da PKA, a forskolina, foi inibido pelo inibidor da NOS, L-NAME. Estes resultados sugerem que activação do receptor Y₃ das células cromafins humanas induz um aumento da libertação de catecolaminas actuando pela via das MAPK e pela activação da PKA que por sua vez estimula a produção de NO, responsável pela activação da GC e da PKC.

Resumo__

Em conclusão estes resultados sugerem que a IL-1 β poderá ser um factor importante na regulação de catecolaminas pelas células cromafins das glândulas supra-renais em situações fisiopatológicas, como em situações de stresse ou hipertensão. Por outro lado, sugere-se ainda que o NPY funcione como um elemento chave entre o sistema imunitário e a glândula supra-adrenal, contribuindo para um aumento adicional de catecolaminas que poderá ser determinante para o agravamento de determinadas situações patológicas.

Abstract

Activation of hypothalamic-pituitary-adrenal gland (HPA) axis can modulate the immune system. Cytokines and neuropeptide Y (NPY) are potent regulators of the HPA axis and are both produced by the adrenal medulla. Interleukin-1 β (IL-1 β) has a controversial role in catecholamine release from chromaffin cells. NPY is a neuropeptide that can be co-released with catecholamines and can also stimulate catecholamine release from mice and human chromaffin cells. However the intracellular pathways coupled to NPY receptors activation and catecholamine release are not known.

The first aim of our study was to study the intracellular signalling events coupled to NPY Y₁ receptor activation that lead to an increase of catecholamine release (norepinephrine, NE and epinephrine, EP) by mouse chromaffin cells. The stimulatory effect of NPY on catecholamine release was inhibited by the NPY Y₁ receptor inhibitor, BIBP 3226. These results confirmed the involvement of the NPY Y₁ receptor activation in catecholamine release from mouse chromaffin cells. Moreover, catecholamine release due to NPY Y₁ receptor activation is a Ca²⁺-dependent process. Furthermore, the inhibition of nitric oxide synthase (NOS), and guanylyl cyclase (GC) also decreased the stimulatory effect of NPY, suggesting that nitric oxide (NO) and GMPc are important modulators of catecholamine release stimulated by NPY. The role of NO as a modulator of catecholamine release was also confirmed by stimulating mouse chromaffin cells with a NO donor, NOC-18. Thus, it was observed that the increase of catecholamine release induced by NOC-18 was similar to that produced by NPY stimulation. The stimulatory effect of NOC-18 was also inhibited in the presence of the GC inhibitor, ODQ, which suggests that NO activates GC with subsequent increase on GMPc production.

In order to evaluate other intracellular pathways coupled to NPY Y₁ receptor activation and catecholamine release, mouse chromaffin cells were incubated with MAPK, PKC and PKA inhibitors, in the presence of NPY or NOC-18. It was observed that the stimulatory effect of NPY was inhibited by the MAPK and PKC

Abstract___

inhibitors, but the stimulatory effect of NOC-18 was only inhibited in the presence of the PKC inhibitor. These results suggest that NPY Y₁ activation stimulates catecholamine release by a MAPK pathway and also by a PKC-NO dependent pathway.

In summary, in mouse chromaffin cells, NPY evokes catecholamine release by the activation the NPY Y₁ receptor, in a Ca²⁺-dependent manner, by activating MAPK and promoting NO production, which in turn regulates PKC and GC activation.

The second aim of this thesis was based in two facts: 1) the activation of the NPY Y₁ receptor induces catecholamine release from mice chromaffin cells and 2) the balance of the catecholamine intracellular concentration is dependent on exocytosis and catecholamine synthesis. So, in the second part of our work we aimed to evaluate a possible molecular interaction between the NPY Y₁ receptor activation and the tyrosine hydroxylase (TH) promoter.

As an experimental model, an Y₁ receptor-expressing SK-N-MC cell was used, transfected with a TH promoter sequence coupled to the luciferase gene. This promoter has some local sites for the binding of transcription factors important for the activation of the TH promoter and transcription of TH. The cAMP response element (CRE) is one of those transcription factors with binding sites located on the TH promoter. The activation or inhibition of luciferase activity corresponds to activation or inhibition of TH promoter. Forskolin increased luciferase activity and NPY inhibited the stimulatory effect of forskolin. The NPY Y₁ antagonist, BIBP 3226, prevented the inhibitory effect of NPY on forskolin-induced TH promoter activation. On the other hand, we also observed an impairment of forskolin-induced TH promoter activation by the PKA inhibitor, suggesting a role of PKA-mediated cAMP-dependent signaling in this process. In conclusion, these results suggest a molecular interaction between NPY Y₁ receptor activation and the TH promoter by a PKA-dependent pathway.

As mentioned above, IL-1 β has a controversial role on the release of the content of chromaffin granules by chromaffin cells. Thus, in chapter 5 and 6 of this thesis, the role of IL-1 β on catecholamine and NPY release from mouse and human chromaffin cells was evaluated. It was observed that IL-1 β increased NPY and catecholamine

release and that the IL-1 β stimulatory effect was blocked by the IL-1 β antagonist (IL-1ra). The immunoneutralization of NPY also inhibited the stimulatory effect of IL-1 β on catecholamine release from these cells. These results suggest that the stimulatory effect of IL-1 β on catecholamine release was, at least partially, mediated by NPY.

Moreover, in human chromaffin cells, the main intracellular mechanisms responsible for catecholamine release stimulated by IL-1 β are the MAPK pathway and the NO pathway, which is an upstream activator of PKC and GC. In human chromaffin cells the effect of IL-1 β on catecholamine synthesis was also studied. For this purpose, we used an inhibitor of TH activity that decreased the stimulatory effect of IL-1 β on catecholamine release. On the other hand, by an immunoblotting assay we also observed that an incubation of IL-1 β during 2 minutes increased the Ser⁴⁰ phosphorylation of TH. Furthermore, it was also studied the intracellular signalling pathways coupled to NPY Y₃ activation and catecholamine release. The stimulatory effect of NPY was inhibited by the presence of NOS, GC, MAPK, PKC and PKA inhibitors. However, the stimulatory effect of NOC-18 was not inhibited in the presence of the PKA inhibitor, although the stimulatory effect of forskolin (a PKA activator) was inhibited in the presence of the NOS inhibitor, L-NAME. These results suggest that NPY Y₃ activation stimulates catecholamine release by a MAPK-dependent pathway and also by stimulating PKA that in turn stimulates NO production with the consequent activation of PKC and GC.

In conclusion, IL-1 β might be an important regulator of catecholamine release from adrenal chromaffin cells in some pathophysiological conditions in which plasma levels of IL-1 β increase, as stress or hypertension. On the other hand, our work suggests that NPY is a key element involved in the regulatory loop between the immune and the adrenal system contributing to an additional catecholamine release and an eventual aggravation of a pathological condition.

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. A célula cromafim na glândula supra-renal

1.1.1. As glândulas supra-renais

As glândulas supra-renais localizam-se no pólo superior de cada rim e são envolvidas em tecido adiposo. No homem, as glândulas pesam cada uma entre 6 e 10 g, são achatadas e medem aproximadamente 5 por 3 cm. A glândula supra-renal direita tem uma forma piramidal e, a esquerda, a forma oval^[280].

As glândulas supra-renais são órgãos encapsulados compostos por duas partes funcionais completamente distintas, a medula e o córtex. As glândulas dos mamíferos têm a medula numa posição central rodeada pelo córtex, podendo existir células corticais entre as células medulares, e o inverso, com a presença de feixes de células da medula ou apenas algumas células isoladas, entre as células do córtex^[48]. Na glândula humana, a proporção de medula pode variar entre 10 a 30 %^[48].

O córtex da glândula supra-renal, de origem mesodérmica, responsável pela segregação de mineralocorticóides e glicocorticóides, subdivide-se em três zonas concêntricas conforme a disposição e aspecto das células: glomerulosa, fasciculada e reticulada.

A zona glomerulosa, localizada imediatamente abaixo da cápsula, é uma camada estreita que representa 10-15 % do córtex; as suas células são pouco pigmentadas, associam-se em aglomerados e são responsáveis pela produção de mineralocorticóides (aldosterona). A zona fasciculada, que representa cerca de 75 % da área do córtex, é constituída por células poligonais que produzem glucocorticóides (no homem, o principal glucocorticóide é o cortisol; no rato, a corticoesterona). A zona reticulada constitui a zona mais interna do córtex, está adjacente à medula, e é constituída por células pequenas e pigmentadas que produzem glucocorticóides e hormonas sexuais^[51, 280].

A medula tem origem na crista neural sendo composta por células neuroendócrinas especializadas na produção de catecolaminas - em especial a adrenalina (AD) e a noradrenalina (NA) - designadas por células cromafins.

Para além destas células, a medula da supra-renal apresenta ainda pequenos aglomerados de células corticais, células de Schwann e fibroblastos^[28, 193, 445]. Na

medula supra-renal, a percentagem de NA é menor que a de AD havendo, no entanto, grande variabilidade entre as espécies. Relativamente ao total de catecolaminas, a percentagem de NA é de 40% na glândula supra-renal do gato, 30% no boi, 10-30% no homem, 10% no rato, 3% no cobaio^[449]. A principal fonte de AD na corrente sanguínea provém das células cromafins, exercendo a medula da glândula supra-renal importantes funções nas diferentes situações de agressão ou stresse.

A glândula supra-renal é irrigada por um ramo da aorta e pelas artérias frénica inferior e renal. Uma vez na glândula estes ramos arteriais formam um plexo debaixo da cápsula, irrigam o córtex e chegam à medula. O sangue, de todos os vasos na glândula supra-renal, reúne-se numa única veia central, a veia supra-renal^[280]. A direcção do fluxo sanguíneo na supra-renal é no sentido centrípeto, deste modo, os produtos do córtex afectam directamente as células cromafins da medula. No entanto, os produtos derivados das células medulares não conseguem alcançar as células corticais através da perfusão vascular. Assim, as comunicações parácrinas entre as células ganglionares da medula e as células corticais, ou as intercomunicações entre as células cromafins e as células corticais mais internas, permitem que as substâncias libertadas pelas células cromafins actuem nas células corticais^[47, 211, 420]. Quanto à inervação da glândula supra-renal, há um feixe de fibras proveniente do nervo esplâncnico que, após atravessar a cápsula da glândula, forma uma extensa rede neuronal subcapsular que se entende até ao córtex e, finalmente, à medula^[367].

1.1.2 As células cromafins

As células cromafins são o principal tipo celular da medula da supra-renal e dispõem-se em cordões em redor dos capilares sanguíneos^[445]. O nome “cromafim” tem como base a cor amarelo-acastanhado que estas células adquirem quando sujeitas a fixação com agentes que contêm ácido crómico. As catecolaminas nos grânulos cromafins oxidam, resultando uma cor amarela acastanhada; a esta reacção dá-se o nome de “reacção cromafim”. Nas células cromafins, as catecolaminas são sintetizadas e armazenadas em vesículas secretoras

(designadas por grânulos cromafins) e libertadas directamente para a corrente sanguínea.

As células cromafins são inervadas por fibras pré-ganglionares do sistema nervoso simpático, que estimulam estas células neuroendócrinas a libertar as catecolaminas para a corrente sanguínea, as quais irão actuar nos receptores adrenérgicos das células alvo (Figura 1.1).

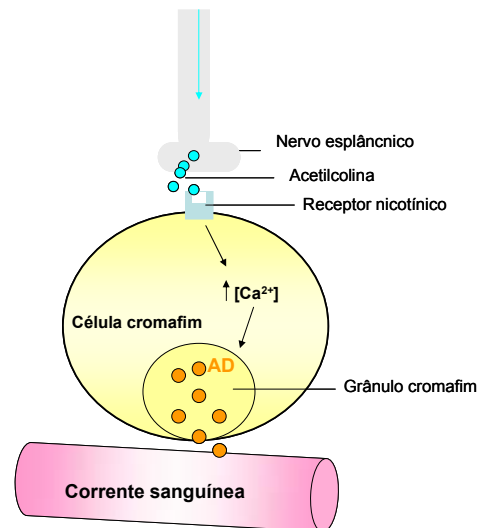


Figura 1.1 As células cromafins localizam-se na medula das glândulas supra-renais.

Um estímulo, com origem na medula espinal, é transmitido às células cromafins através de neurónios simpáticos. Estes neurónios apresentam um longo axónio que viaja pelo nervo esplâncnico e liberta acetilcolina que se liga ao receptor nicotínico da célula cromafim. Como consequência, as células cromafins libertam adrenalina (AD) e noradrenalina (bem como outras substâncias) para a corrente sanguínea. As catecolaminas na corrente sanguínea actuam nos diversos órgãos que possuem os receptores adrenérgicos.

Existem quatro tipos de fenótipos distintos de células cromafins: i) as que produzem e libertam AD (células adrenérgicas), com um conteúdo pouco electro-denso; ii) as que produzem e libertam NA (células noradrenérgicas), com um conteúdo bastante electro-denso; iii) o grupo mais pequeno de células com grânulos secretores de pequenas dimensões com fluorescência intensa e fenótipo intermédio entre as células adrenérgicas e noradrenérgicas (células cromafins de pequenos grânulos); iv) um quarto tipo de células, constituídas por neurónios ganglionares que podem apresentar características noradrenérgicas ou colinérgicas^[26].

Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina-1 β e do neuropeptídeo Y

Os grânulos cromafins além de NA e AD contêm muitas outras substâncias (Tabela 1.1) que, após estimulação, são libertados para o espaço extracelular juntamente com as catecolaminas.

Tabela 1.1 Composição dos grânulos cromafins das células cromafins

Moléculas presentes nos grânulos cromafins	Referências bibliográficas
Neuropeptídeo Y (NPY)	[51, 260, 288, 407]
Leu-encefalinas e Met-encefalina	[238, 439]
Substância P (SP)	[259]
Peptídeo intestinal vasoactivo (VIP)	[464]
Somatostatina	[484]
Neurotensina	[459]
Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina	[261]
Serotonina	[56, 150]
Histamina	[194, 364]
Cerebelina	[406]
Vasopressina	[242, 243]
Factor activador da adenilciclase da pituitária (PACAP)	[323, 446]
Cromogranina A, B, C e EM66	[19, 20, 27, 241, 305, 346, 442, 492]
Factor de crescimento tumoral (TGF β)	[252]
Factor de necrose tumoral α (TNF α)	[171]
Interleucina-1 β	[411, 412]
Interleucina-6	[160]

1.1.2.1 Regulação da síntese de catecolaminas

Na regulação da síntese de catecolaminas é da maior importância o papel de alguns aminoácidos, em especial a tirosina. A tirosina presente na circulação sanguínea ou no líquido extracelular, entra na célula cromafim e no citosol é transformada em 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) pela enzima hidroxilase da tirosina (TH). Em seguida a DOPA é descarboxilada pela enzima descarboxilase da dopa em dopamina (DA). Esta entra para os grânulos cromafins, onde se encontra a β -hidroxilase da dopamina (D β H) que converte a DA em NA. Nas células adrenérgicas, a NA formada no grânulo pode ser transportada para o citoplasma

para ser convertida em AD pela enzima metiltransferase da feniletanolamina (PNMT). A adrenalina é, então, transportada para o interior do grânulo e aí é armazenada até ser segregada. Para a produção de AD, no citoplasma destas células, existe a enzima PNMT, que converte a NA em AD, mas que está ausente nas células noradrenérgicas^[26].

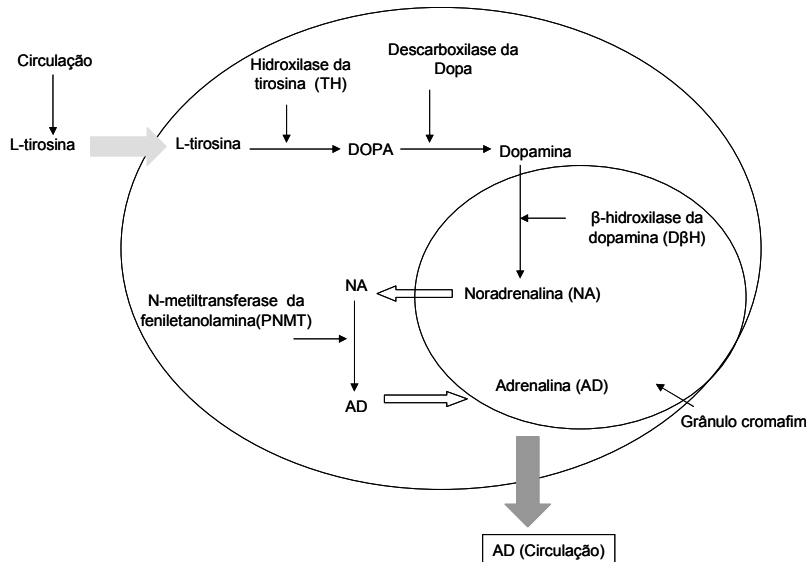


Figura 1.2 - Esquema da síntese de adrenalina (AD) numa célula cromafim adrenérgica.

Na célula cromafim a tirosina é transformada em DOPA pela acção da enzima da hidroxilase da tirosina (TH), por sua vez, a DOPA é descarboxilada a dopamina pela descarboxilase da DOPA. A dopamina é transportada para os grânulos cromafins, e, sob a acção da β-hidroxilase da dopamina, é convertida em noradrenalina (NA). Para ocorrer a síntese de AD, a NA sai do grânulo cromafim e, no citosol, a enzima N-metiltransferase da feniletanolamina (PNMT), converte-a em AD que, para ser armazenada, volta a entrar no grânulo cromafim.

1.1.2.2. A hidroxilase da tirosina

Como já foi referido, a hidroxilase da tirosina (TH) (EC 1.14.16.2) é a enzima que cataliza a conversão da L-tirosina em L-DOPA. A TH é a enzima do passo limitante da síntese de catecolaminas porque, apesar de existir em maior quantidade do que qualquer uma das outras enzimas que estão envolvidas na síntese de catecolaminas, a sua actividade é na ordem de nmol/g tecido/hora, o que

representa uma actividade 1000 vezes inferior à actividade das restantes enzimas^[204, 272, 332].

A TH, juntamente com a hidroxilase da fenilalanina e a hidroxilase do triptofano, pertence a uma família de enzimas que são dependentes de biopterina. Estas enzimas necessitam de tetrahydrobiopterina (BH₄) e de oxigénio (O₂) para hidroxilar os respectivos substratos que são os aminoácidos aromáticos^[152]. Assim, a hidrólise de L-tirosina em DOPA é catalizada pela TH em combinação com BH₄, O₂ e Fe²⁺. No terminal carboxílico da TH encontra-se o domínio de ligação dos substratos (domínio catalítico) e, no terminal amínico, encontra-se o domínio regulador^[258]. O domínio regulador tem quatro locais de fosforilação: a Ser⁸, Ser¹⁹, Ser³¹ e Ser⁴⁰ mas na TH humana existe, ainda, uma treonina na posição 8^[180, 197] (Figura 1.3).

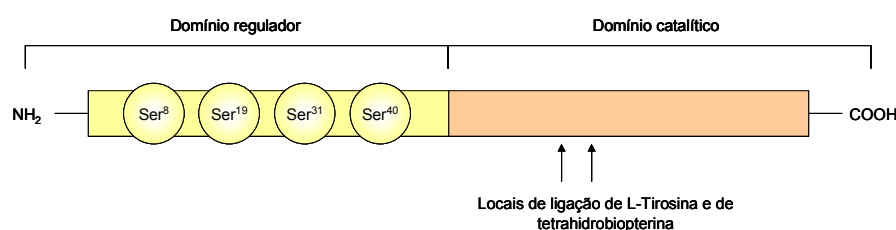


Figura 1.3 - Representação esquemática da hidroxilase da tirosina (TH).

A TH no domínio regulador possui 4 locais de fosforilação responsáveis pela regulação da sua actividade. O domínio catalítico localiza-se na parte carboxílica da enzima onde ocorre a hidroxilação da tirosina, usando como co-factor a tetrahydropterina.

A TH humana tem quatro isoformas, enquanto que a TH de outras espécies de mamíferos têm apenas uma, sendo a variante TH1 (hTH1) comum a todas as espécies^[333]. A TH é codificada por apenas um gene e as múltiplas isoformas são resultantes “splicing” alternativo^[180, 232, 349].

Além da sua localização no cérebro^[254, 284], estômago^[29], retina^[123, 187, 503] e sistema nervoso simpático^[494, 505] a TH está presente em grandes quantidades nas células cromafins, principalmente na sua forma citosólica^[190], podendo no entanto, também existir na sua forma membranar localizada nos grânulos cromafins^[255, 327, 468]. A forma membranar associada aos grânulos cromafins é menos activa do que a sua forma solúvel^[327] e, portanto, pensa-se que a alteração da forma membranar para uma

forma citoplasmática leva a um aumento de enzima activa disponível, contribuindo para um aumento da sua actividade enzimática^[327].

A regulação da expressão da TH pode ser feita através de um processo de longa duração, que ocorre a níveis pós-translacionais, ou a sua actividade pode ser regulada num processo de curta duração.

1.1.2.2.1 Factores de regulação da transcrição da TH

Vários estudos demonstraram que o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e os glucocorticóides regulam os níveis de RNAm da TH através da estimulação da transcrição do seu gene e, por consequência, aumentam a expressão da proteína TH^[93, 191, 277]. O aumento da transcrição do gene da TH está associado à activação dos locais de reconhecimento dos factores de transcrição que existem no promotor da TH. Entre estes elementos, encontram-se os elementos de resposta aos glucocorticóides (GRE) bem como os elementos de resposta ao AMPc (CRE) e portanto, a PKA é uma das principais enzimas envolvidas na transcrição genética da TH^[73, 274, 336]. Por outro lado, a existência de outros locais de ligação dos factores de transcrição, como o AP1, permite que outras cinases regulem a transcrição do gene da TH^[215, 374, 486]. Existem outros factores reguladores da transcrição da TH, como é o caso do monóxido de azoto (NO), através da activação do c-fos de um modo dependente ou não do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)^[216, 334, 486]. A via de transdução de sinal iniciada pela cinase ras que activa a cinase MEK (cinase que activa as cinases activadas por factores mitogénicos, MAPK), é activada quer pelo factor de crescimento neuronal (NGF) quer pelo butirato, e pode actuar ao nível dos locais AP1 e CRE induzindo a transcrição do gene da TH^[418, 444].

1.1.2.2.2 A regulação da actividade da TH

Quando os níveis intracelulares de catecolaminas aumentam há uma inibição da TH. Como já foi referido, a hidroxilação da L-tirosina é catalizada pela TH que juntamente com a BH₄, O₂ e Fe²⁺, levam à formação de DOPA, dihidropterina (BH₂)

e água (H₂O). Para ocorrer a inibição da TH, o Fe²⁺ liga-se à TH e, quando é oxidado a Fe³⁺ pelo O₂, os grupos catecol das catecolaminas ligam-se à TH que fica deste modo inactiva. A TH está sujeita a dois tipos de inibição pelas catecolaminas. No tipo de inibição reversível, a actividade de TH é inibida pelas catecolaminas que competem com BH₄ pela ligação dos iões férricos (Fe³⁺) no local catalítico da enzima inibindo, assim, a interacção com o cofactor e actuando como um sensor da concentração local de catecolaminas^[385]. O segundo tipo de inibição é praticamente irreversível, e as catecolaminas ligam-se a Fe³⁺ no local catalítico da TH, diminuindo a actividade enzimática^[258] (Figura 1.4).

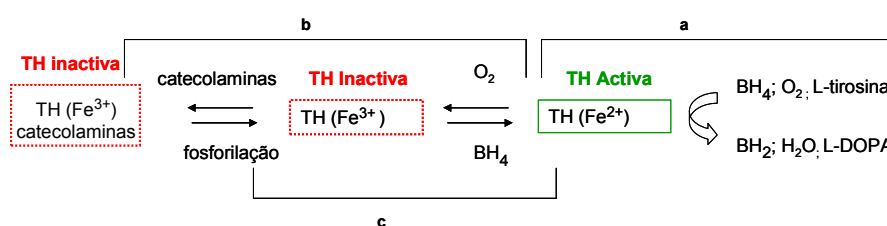


Figura 1.4 - Inibição da hidroxilase da tirosina (TH).

a) Na sua forma activa, a TH está ligada ao Fe²⁺, sendo capaz de converter a L-tirosina em DOPA, usando o co-factor tetrahydrobiopterina (BH₄) e O₂. No final forma-se além da DOPA, H₂O e a dihydrobiopterina (BH₂); **b)** a TH associada a Fe²⁺ pode ser oxidada a Fe³⁺ pelo O₂ e, nesta forma, é capaz de se ligar às catecolaminas tornando-se, desta maneira, numa enzima inactiva; **c)** quando a TH é fosforilada, ocorre uma mudança estrutural com a consequente dissociação das catecolaminas da TH. Quando as catecolaminas deixam de estar ligadas à TH, o Fe³⁺ pode ser reduzido pelo BH₄, e assim a enzima volta ao seu estado activo (adaptado de Dunkley *et al.*, 2004)^[124].

A activação da TH ocorre através de um processo designado por activação de curta-duração, que envolve a fosforilação de vários resíduos de serina no domínio regulador da TH. A PKA fosforila a TH no resíduo Ser⁴⁰ [42, 495] e o aumento de AMPc induz um aumento da fosforilação da TH nas células cromafins de bovino^[169]. Os ésteres de forbol (activadores das PKC) induzem a fosforilação dos resíduos de Ser³¹ da TH sugerindo que a PKC também poderá estar envolvida na fosforilação do resíduo Ser³¹ [42, 197, 198] (Figura 1.5). As propriedades cinéticas da TH fosforilada pela PKC são semelhantes às fosforiladas pela PKA^[9]. O nitroprussido de sódio e o peptídeo natriurético do tipo C (dadores externos de NO) aumentam a fosforilação da Ser⁴⁰ da TH, bem como os níveis de GMPc e a actividade de PKG nas células cromafins bovinas^[394]. A proteína cinase II dependente de Ca²⁺/Calmodulina

(CaMKII) é uma enzima que induz a fosforilação da TH no resíduo Ser¹⁹, mas esta fosforilação não está associada a um aumento da actividade enzimática^[220, 467]. Outros estudos demonstraram que o aumento da fosforilação da TH, por arsenite e por anisomicina^[43, 462], foi bloqueado por um inibidor das MAPK^[199, 467] o que sugere que as estas cinases responsáveis pela fosforilação da TH no resíduo de Ser³¹ ^[44, 64, 199, 405] (Figura 1.5).

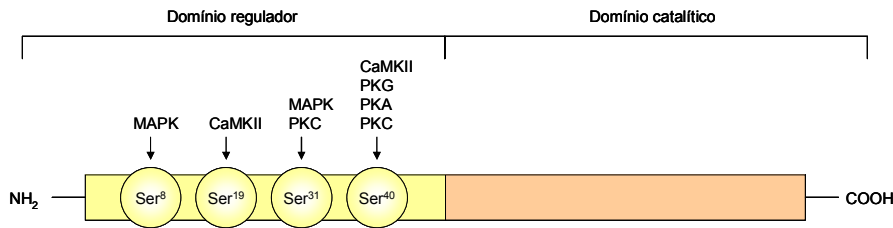


Figura 1.5 – Fosforilação dos resíduos de Ser da hidroxilase da tirosina por várias cinases.

A hidroxilase da tirosina é fosforilada por várias cinases em diferentes serinas que se encontram no domínio regulador da enzima localizadas no seu terminal amina. A fosforilação das várias cinases ocorre de uma forma hierárquica conduzindo à activação da TH.

A fosforilação dos resíduos Ser¹⁹ e Ser³¹ altera o estado de fosforilação do resíduo Ser⁴⁰ e conseqüentemente a activação da TH. Quando o resíduo de Ser¹⁹ está fosforilado ocorre um aumento de 3 vezes na velocidade de fosforilação do resíduo Ser⁴⁰, enquanto que o inverso não ocorre, ou seja o resíduo Ser⁴⁰ não pode fosforilar o resíduo Ser¹⁹ ^[38, 43]. A fosforilação do resíduo Ser³¹ também aumenta a fosforilação de Ser⁴⁰ e, conseqüentemente, a activação da TH, enquanto que a fosforilação do resíduo Ser⁴⁰ não induz qualquer alteração na fosforilação do resíduo Ser³¹ ^[270]. Deste modo, conclui-se que existe uma fosforilação hierárquica, onde a fosforilação dos resíduos de Ser¹⁹ e Ser³¹ permite que a TH se mantenha activa durante um período mais longo, através da manutenção da fosforilação da Ser⁴⁰. Ou seja, a fosforilação nos primeiros 2-3 minutos ocorre apenas na Ser⁴⁰, no entanto devido à acção das fosfatases, a TH entra num estado inactivo. Deste modo, para tempos de activação mais prolongados da TH é necessário um maior número de fosforilações que ocorrem devido à acção da fosforilação de Ser³¹ e Ser¹⁹ ^[270].

1.1.2.3 Metabolização das catecolaminas

O primeiro passo na metabolização das catecolaminas envolve uma de duas enzimas: a monoamina-oxidase (MAO), que remove a parte amina das catecolaminas e a catecol-O-metiltransferase (COMT) que adiciona um grupo metil, formando a normetanefrina (NMN) a partir da NA e a metanefrina (MN) a partir da AD^[133]. Existem dois tipos de MAO, a MAO-A e a MAO-B^[227], que têm actividades enzimáticas diferentes e localizações diferentes^[384, 397, 398, 432]. A nível da medula da glândula da supra-renal, a MAO-A tem uma actividade enzimática maior comparativamente à MAO-B e, além disso, a sua localização difere: enquanto que a MAO-B se encontra nas células cromafins da camada mais inferior da medula, a MAO-A localiza-se nas células cromafins que estão na camada mais exterior, em contacto com as células corticais^[239, 399]. A acção da MAO na NA e na AD resulta na formação de um metabolito designado por ácido 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), que pode ser metabolizado pela COMT formando o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) (Figura 1.6). No Homem, cerca de 90 % da MN, e mais de 40 % da NMN resulta do metabolismo de AD e NA das células cromafins (Figura 1.6), antes das catecolaminas terem sido lançadas para a corrente sanguínea, ou seja a metabolização ocorre intracelularmente^[132]. Assim a medula adrenal da glândula supra-renal é a principal fonte de NMN e MN no organismo, excedendo mesmo a contribuição do fígado^[129, 133]. Na célula cromafim a COMT existe principalmente na sua forma membranar^[139], e esta forma da enzima tem uma maior afinidade para as catecolaminas do que a forma solúvel que se encontra nos outros tecidos, como é no caso do fígado e rins^[400].

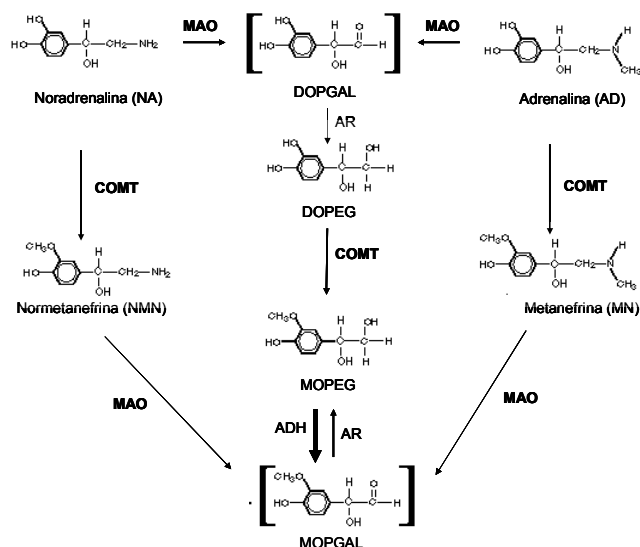


Figura 1.6 - Vias de metabolização de noradrenalina (NA) e de adrenalina (AD).

A NA e a AD pela acção da MAO são desaminadas a 3,4-hidroxi-alfa-hidroxi-2-fenilacetaldeído (DOPGAL), que é um aldeído intermediário de curta semi-vida, e é reduzido por uma aldeído redutase (AR) a dihidroxi-alfa-hidroxi-2-fenilacetanol (DOPEG). Por outro lado, a COMT converte a NA em normetanefrina (NMN), e a adrenalina em metanefrina (MN) e o DOPEG em metoxihidroxi-alfa-hidroxi-2-fenilacetanol (MOPEG). Este último, sob acção de uma enzima álcool desidrogenase (ADH) e também a NMN e MN sob a acção de MAO são convertidas em 3,4-metoxi-4-hidroxi-2-fenilacetaldeído (MOPGAL). Adaptado de Eisonhofer et al., 2004^[130].

1.1.2.4 Mecanismos de regulação do conteúdo intracelular das catecolaminas

Os mecanismos de recaptação de catecolaminas para dentro das células, bem como os mecanismos de sequestro de catecolaminas para dentro dos grânulos cromafins, actuam no sentido de permitir a reciclagem de catecolaminas libertadas e também de modo a permitir que uma maior quantidade de catecolaminas esteja disponível para voltar a ser segregada. Existe outro mecanismo que regula o conteúdo intracelular em catecolaminas e que consiste na sua saída passiva dos grânulos cromafins para o citoplasma das células cromafins, processo designado por *leakage* (Figura 1.7). Este processo é contrabalançado pela re-entrada de cerca de 90 % das catecolaminas para os grânulos cromafins, através de transportadores localizados nas membranas dos grânulos cromafins (VMT's) (Figura 1.7). É de referir ainda que, 10% das catecolaminas após saírem dos grânulos cromafins, são

sujeitas à acção da COMT citoplasmática (Figura 1.7). Este processo de metabolização ocorre antes e de forma independente da exocitose^[130, 131].

Além de *leakage* das catecolaminas, cerca de 90% das catecolaminas que saem para o meio extracelular, são recaptadas para dentro das células cromafins através dos transportadores de NA (NET's) (Figura 1.7). As restantes são libertadas, entram na circulação sanguínea e/ou são metabolizadas (Figura 1.7). Apesar da designação dos transportadores se referir apenas à NA, os NET's têm a mesma afinidade para NA e para AD^[285, 361] e está demonstrado que em células cromafins de rato e humanas este transportador só existe nas células adrenérgicas mas é responsável pelo transporte para o interior da célula tanto de AD como de NA^[91, 235, 373]. Por outro lado, são os níveis de catecolaminas que influenciam a expressão destes transportadores: elevadas concentrações de catecolaminas aumentam a densidade de transportador e, quando existe pouca quantidade de catecolaminas, observa-se o inverso^[497].

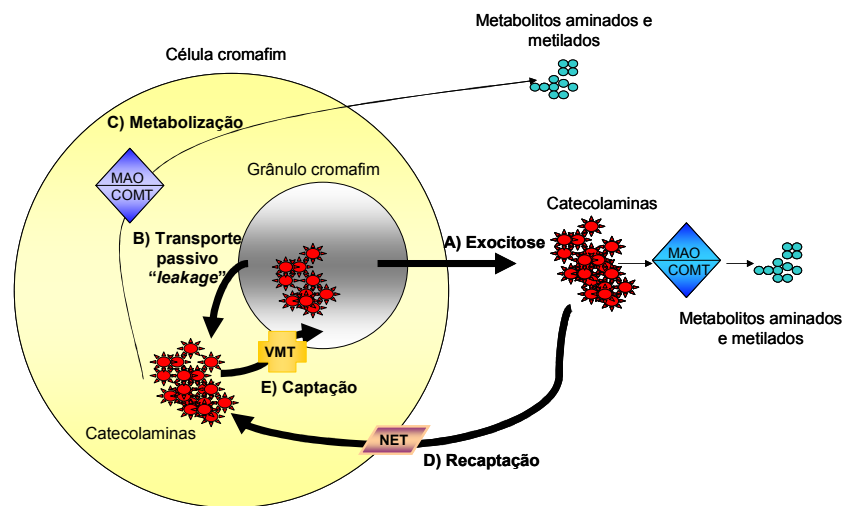


Figura 1.7 - Esquema representativo dos mecanismos de manutenção do conteúdo intracelular de catecolaminas constante.

A) libertação de catecolaminas por exocitose; **B)** saída passiva de catecolaminas para o citoplasma (*leakage*); **C)** metabolização; **D)** recaptação de catecolaminas pelos transportadores de NA (NET); **E)** sequestro de catecolaminas do citoplasma para os grânulos cromafins através dos transportadores vesiculares (VMTs). Adaptado de Eisonhefer *et al.*, 2004^[130].

1.1.2.5 A síntese de peptídeos nas células cromafins

Como já foi referido, as células cromafins acumulam nos grânulos cromafins diversos peptídeos. Os grânulos cromafins formam-se a partir de dilatações do complexo de Golgi^[158]. O complexo de Golgi apresenta duas zonas distintas, uma designada por *cis*, que é a zona externa com aspecto convexo, e outra por *trans*, que é a zona interna com aspecto côncavo. Os propeptídeos (grandes moléculas precursoras dos peptídeos) são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso. Os propeptídeos são então transportados para a região do complexo de Golgi onde entram para as cisternas pela zona *cis* e deslocam-se na cisterna para a zona *trans*. Em seguida, os propeptídeos ficam incorporados nas vesículas de Golgi que resultam do destacamento das partes dilatadas das cisternas. Estas vesículas fundem-se com outras, aumentando assim de tamanho, designando-se por grânulos secretores imaturos. Os propeptídeos começam a ser processados ou clivados pela acção de proteases específicas durante o seu transporte no interior do complexo de Golgi e essas modificações enzimáticas continuam dentro dos grânulos^[441, 445].

1.1.2.6 Libertação de catecolaminas

1.1.2.6.1 O processo de libertação de catecolaminas por exocitose

As células cromafins libertam por exocitose o conteúdo dos grânulos cromafins, nomeadamente catecolaminas e peptídeos. Diversos estímulos aumentam a libertação como a activação do nervo esplâncnico e a libertação de acetilcolina. Outros estímulos aumentam a libertação de catecolaminas pelas células cromafins: a estimulação das células com agonistas dos receptores nicotínicos, ou muscarínicos, bradicinina, angiotensina II, histamina, VIP ou ATP, e a despolarização com o KCl^[25, 127, 283]. Foi calculado que quando existe uma estimulação muito intensa ocorre a libertação de 10 000 grânulos cromafins, mas 10 000 grânulos foi o número médio calculado que existe em cada célula cromafim^[102]. A exocitose de catecolaminas pelas células cromafins é um processo extremamente regulado, de modo a que não ocorra uma libertação excessiva de catecolaminas^[28].

Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina-1 β e do neuropeptídeo Y

A exocitose pode ser de dois tipos: constitutiva ou regulada. A exocitose constitutiva é um processo contínuo que ocorre sem qualquer estímulo. A exocitose regulada ocorre após determinado estímulo externo, que leva a um aumento de $[Ca^{2+}]_i$ ^[441].

Actualmente, considera-se que o processo de libertação de catecolaminas pelas células cromafins pode ocorrer por outros processos distintos da exocitose. O processo de exocitose consiste na fusão da membrana do grânulo cromafim com a membrana plasmática e ocorre a libertação do conteúdo do grânulo cromafim para o exterior da célula, este processo também é designado por exocitose de fusão total. Para a formação de novos grânulos cromafins aptos para o armazenamento de catecolaminas e outros peptídeos ocorre um processo de endocitose a partir da membrana plasmática (Figura 1.8). Um outro processo alternativo ou complementar de libertação de catecolaminas é designado por “*kiss and run*”^[363]. Este processo difere da exocitose de fusão total, uma vez que a membrana dos grânulos cromafins não se funde completamente com a membrana plasmática, mas forma um poro plasmático transitório que rapidamente se fecha, sem alterar a integridade da membrana do grânulo cromafim (Figura 1.8). Ao contrário da exocitose de fusão total, que é um processo de “tudo ou nada”, aqui apenas uma parte do material que está armazenado é libertado para o meio extracelular, durante a formação do poro transitório, parecendo que há uma libertação selectiva onde as moléculas grandes, como as cromagraninas, ficam retidas e pequenas moléculas, como as catecolaminas são libertadas^[14]. Alguns autores referem-se ainda a um terceiro tipo de libertação, designada por desgranulação em partes “*piecemeal degranulation*”, (que designaremos por PMD). Aqui, os grânulos não se fundem uns com os outros, nem com a membrana plasmática, mantendo a sua estrutura inicial com perda total ou parcial dos seus constituintes. Além disso, as células que sofrem PMD apresentam várias vesículas localizadas quer no citoplasma, quer em contacto com a membrana plasmática ou com a membrana do grânulo cromafim. As vesículas que contêm o conteúdo dos grânulos cromafins movem-se no citoplasma e fundem-se com a membrana plasmática. Ao mesmo tempo, ocorre a formação paralela de vesículas endocíticas da membrana que depois se fundem com o grânulo cromafim. Quando a formação de vesículas secretoras é menor que a formação de vesículas endocíticas, aparecem grânulos bastante mais largos, com uma redução do

conteúdo granular, encontrando-se na periferia do grânulo (Figura 1.8). O PMD permite uma libertação de catecolaminas de longa duração e muito controlada. Este processo foi observado em células cromafins de murganho, de rato e humanas^{[98, 99,}

100, 101]

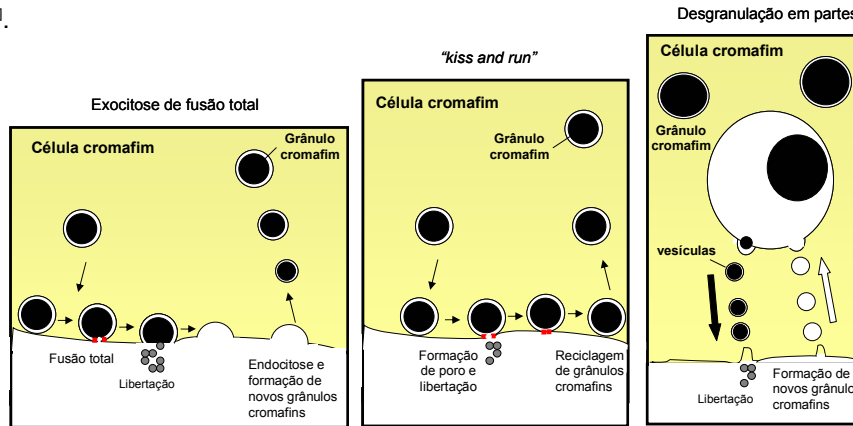


Figura 1.8 - Esquema representativo dos diferentes padrões de libertação de catecolaminas das células cromafins.

Durante a exocitose de fusão total, os grânulos secretores libertam todo o seu conteúdo vesicular para o exterior. Na exocitose selectiva "kiss and run", grânulos cromafins, quando entram em contacto com a membrana plasmática, formam poros transitórios que rapidamente voltam a fechar. Na desgranulação por partes (PMD) existem as vesículas citoplasmáticas, que possuem o mesmo conteúdo que o grânulo cromafim e circulam no citoplasma entre o grânulo cromafim e a membrana plasmática, com a consequente libertação do seu conteúdo para o meio extracelular. Desta maneira formam-se diferentes tipos de grânulos cromafins, normalmente dilatados mas com uma redução no conteúdo intracelular. Adaptado de Crivellato et al., 2006^[102].

Nas células cromafins existe uma rede filamentosa de actina formando um citoesqueleto que, no estado de repouso, impede os grânulos cromafins de atingirem a membrana plasmática tornando-se assim numa barreira à exocitose. Apenas uma pequena percentagem de grânulos cromafins se localiza junto à membrana plasmática^[83]. Após um estímulo há um aumento do $[Ca^{2+}]_i$ intracelular e ocorre uma desorganização do citoesqueleto, em especial junto às zonas de exocitose, permitindo que os grânulos secretores se movimentem e aproximem da membrana plasmática^[469]. O grânulo desloca-se para o local de exocitose na membrana plasmática: esta etapa designa-se por atracagem ou ancoragem^[26]. Para este passo, e de modo a assegurar que os grânulos secretores se vão fundir apenas com as membranas alvo, existe um modelo proposto designado pelo complexo SNARE^[372, 435, 436] (Figura 1.9). Existe uma ATPase, denominada de NSF

(“N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein”; proteína de fusão sensível à N-etilmalamida), e uma segunda proteína que se une à NSF e designada por α -SNAP (“solubre NSF-attachment protein; proteína solúvel de ligação a NSF”). Este conjunto une-se a um receptor específico para as SNAP, designado por SNARE (receptor de SNAP). Os SNARE são constituídas por uma proteína que predomina na membrana vesicular, v-SNARE ou sinaptobrevina, e duas que existem na membrana plasmática (t-SNARE), a sintaxina e a SNAP-25^[26, 63, 443]. A sinaptogamina I, uma proteína vesicular, é um sensor de Ca^{2+} , importante para o último passo da exocitose^[149]. Esta bloqueia o terminal carboxílico da SNAP-25 funcionando assim como um inibidor da fusão. O aumento de Ca^{2+} intracelular inibe a ligação, favorecendo a fusão^[443] e a formação do poro de fusão. A formação do poro inicia-se quando NSF é hidrolizada por ATP (Figura 1.9).

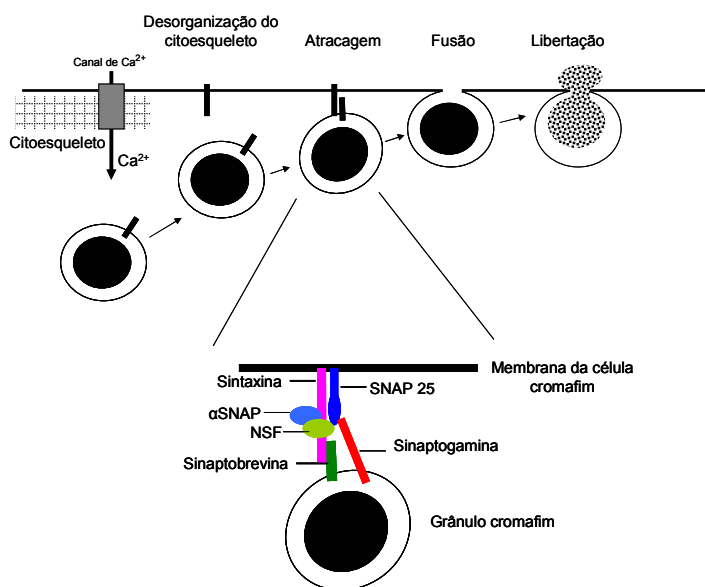


Figura 1.9 - Esquema representativo do processo de exocitose na célula cromafim.

Quando há aumento de $[Ca^{2+}]_i$ nas células e ocorre desorganização do citoesqueleto. Deste modo, o grânulo cromafim vai atracar-se à membrana e, em seguida, ocorre a formação do poro de fusão e a libertação do conteúdo dos grânulos para o meio extracelular. Para que ocorra a atracagem é necessário a formação de um complexo pelas 3 SNAREs (sinaptobrevina, sintaxina e a SNAP-25) juntamente com a NSF e a α -SNAP. Adaptado de Burgoyne e Morgan (2003)^[59].

1.1.2.6.2 Mecanismos intracelulares associadas à libertação de catecolaminas

Os níveis intracelulares de catecolaminas mantêm-se constantes pela estreita relação entre a libertação e a síntese de catecolaminas^[521]. Assim, as vias de transdução de sinal associadas a receptores cuja actividade promove a libertação de catecolaminas podem igualmente estar envolvidas na regulação da actividade da TH.

Como já foi referido anteriormente, a libertação de catecolaminas está associada a um aumento intracelular de Ca^{2+} que entra pelos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (VOCCs) do tipo L, N e P/Q, ou pela mobilização de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares^[24, 347] (Figura 1.10). A libertação de catecolaminas associada a aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pelos VOCCs já foi observada em células cromafins quando estimuladas por exemplo, com a histamina, a angiotensina II, a leptina, o NPY ou o PACAP^[76, 89, 104, 371, 448]. O Ca^{2+} proveniente dos reservatórios intracelulares resulta da estimulação das células e da formação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e da activação da fosfolipase C (PLC)^[376] (Figura 1.10).

O Ca^{2+} que entra pelos VOCCs também contribui para a activação da TH^[347, 348]. Alguns estudos mostraram que a fosforilação da TH é mais sensível ao Ca^{2+} do que o próprio processo de exocitose^[213, 348, 509]. No entanto, sabe-se que, por exemplo, o PACAP estimula a fosforilação da TH mas de uma forma independente de Ca^{2+} ^[213, 301], sugerindo que outros mecanismos intracelulares estão envolvidos na fosforilação da TH e, portanto, na libertação de catecolaminas da célula cromafim (Figura 1.10). A leptina é outro exemplo em que o aumento da síntese de catecolaminas é dependente de Ca^{2+} , e o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa a PLC que activa a PKC e, conseqüentemente, leva à fosforilação da TH^[447, 448] (Figura 1.10). A PKC activa pode também activar a Raf que é uma cinase associada à activação das ERK^[447, 448], que fosforilam o resíduo Ser³¹ da TH^[199] (Figura 1.10). O mesmo acontece com a histamina, que induz a fosforilação da TH de um modo dependente de Ca^{2+} e da produção de AMPc^[303, 347] (Figura 1.10). Por outro lado, tal como foi descrito anteriormente para a leptina, a histamina activa a PLC formando-se o IP_3 e diacilglicerol, DAG, com a conseqüente activação da PKC (Figura 1.10). Outros estudos referem que a activação do receptor da histamina H_1 activa a via PLC/PKC que actua directamente na PKA^[324] (Figura 1.10). O efeito da angiotensina na

libertação de catecolaminas está associado ao aumento da libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas^[74], mas também associado ao aumento da síntese de catecolaminas, através da fosforilação do resíduo Ser¹⁹, Ser⁴⁰ e Ser³¹ de uma forma dependente da PKC e da p38^[44].

Diversos trabalhos descrevem outros mecanismos de transdução de sinal associados à libertação de catecolaminas mas independentes da activação da TH. A forskolina ou outros análogos de AMPc, e activadores da adenilciclase, levam a um aumento da libertação de catecolaminas (Figura 1.10). No entanto, outros estudos demonstraram um efeito inibitório do AMPc na libertação de catecolaminas^[31, 84]. Estas diferenças dos efeitos da via AMPc/PKA podem ser explicados pela diferença de concentrações de forskolina utilizada nos diferentes trabalhos experimentais de outros autores^[161]. Já foi demonstrado o papel de diferentes PKCs na exocitose de catecolaminas, independentemente da sua acção na TH^[174, 454, 458]. Vários mecanismos explicam o aumento de catecolaminas acoplado à activação da PKC, nomeadamente a regulação de entrada de Ca²⁺ pelos VOCCs^[491], aumentando a disponibilidade de Ca²⁺ para o processo da exocitose (Figura 1.10).

Recentemente foi ainda sugerido que o NO, actuando na cascata de sinalização de proteínas cinase dependentes de GMPc (PKG), pode levar a alterações no processo de exocitose^[292]. O NO actua na GC e leva à produção de GMPc, que pode alterar a matriz granular e, conseqüentemente, a afinidade para as catecolaminas, bem como contribuir para a formação do poro de fusão^[292] (Figura 1.10). Por outro lado, está também descrito que o NO pode regular a libertação de catecolaminas^[358, 394]. O efeito de GMPc é bifásico: baixas concentrações levam ao aumento da libertação de catecolaminas, enquanto que concentrações muito altas induzem a inibição de libertação de catecolaminas^[352].

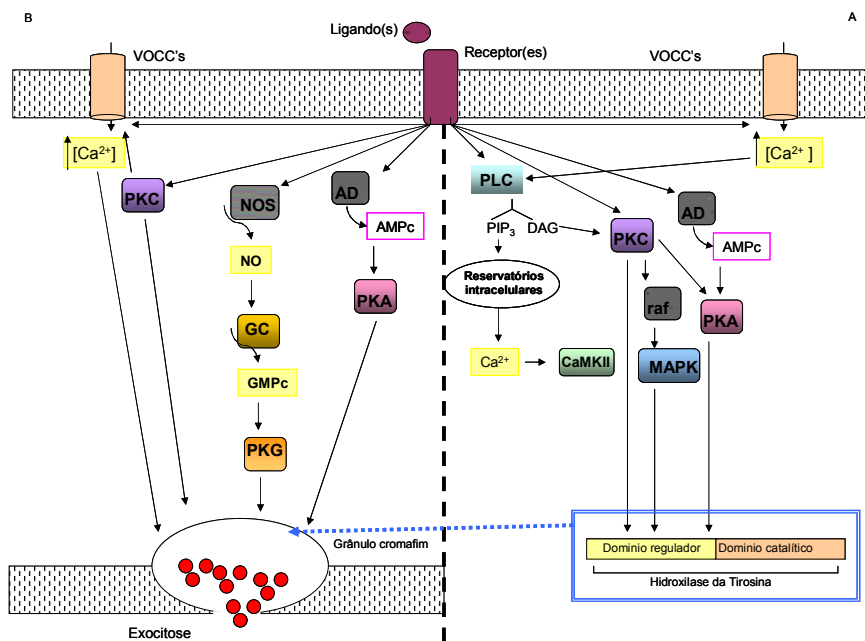


Figura 1.10 - Esquema representativo dos mecanismos intracelulares associados à libertação de catecolaminas pelas células cromafins.

Dependendo do tipo de estímulo, os diferentes ligandos ligam-se aos respectivos receptores activando várias vias de transdução de sinal associadas à exocitose e/ou à activação da hidroxilase da tirosina (TH). **A)** Vias de sinalização intracelular que regulam a actividade da TH, fosforilando diferentes resíduos que se encontram no domínio regulador. O aumento do $[Ca^{2+}]_i$ ocorre devido à abertura dos canais de Ca^{2+} (VOCC's) da membrana plasmática, ou através da mobilização de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares. Este último processo deve-se à acção do PIP_3 formado aquando da activação da fosfolipase C (PLC). Além de PIP_3 , forma-se também o diacilglicerol (DAG) que activa a PKC que pode fosforilar directamente a TH, ou actuar ao nível da MAPK e induzir também a fosforilação da TH. Por outro lado, o AMPc formado pela adenilciclase (AD) activa a PKA que fosforila a TH, aumentando a sua actividade. **B)** Vias de sinalização intracelulares que regulam o processo de exocitose. Para além das vias dependentes de Ca^{2+} , existem as vias da PKC e da PKA, a produção de monóxido de azoto (NO) com a consequente activação da guanidil ciclase (GC) e das cinases dependentes de GMPc (PKG). Todas estas vias regulam a libertação de catecolaminas pelas células cromafins.

1.2 Neuropeptídeo Y (NPY)

1.2.1 Estrutura, localização e síntese do NPY

O neuropeptídeo Y (NPY) é um peptídeo constituído por 36 aminoácidos, e foi isolado pela primeira vez do cérebro de porco e sequenciado por Tatemoto et al. (1982)^[453] (Figura 1.11).

O NPY pertence a uma família de peptídeos, a família do NPY, que inclui o peptídeo YY (PYY) e o polipeptídeo pancreático (PP)^[413, 453].

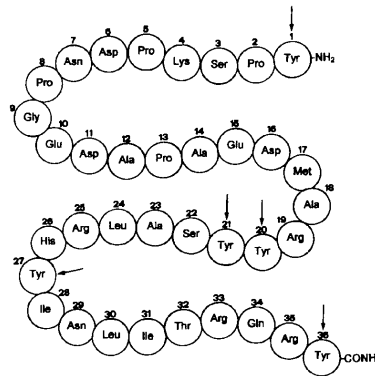


Figura 1.11 Esquema da estrutura do Neuropeptídeo Y (NPY).

O NPY é um peptídeo com 36 aminoácidos que possui um terminal carboxílico com um resíduo tirosina (na posição 36) e outros 4 resíduos na posição 1, 20, 21 e 27. A abreviatura do resíduo de tirosina é a letra “Y”, dando o nome ao neuropeptídeo^[413].

O NPY é considerado um dos neuropeptídeos mais abundantes nos mamíferos estando presente em elevadas concentrações no sistema nervoso central e periférico. A Tabela 1.2 mostra a distribuição do NPY no organismo, presente quer nos tecidos dos vários órgãos, quer presente nas fibras nervosas que inervam os vários órgãos.

Tabela 1.2 Distribuição do NPY

Distribuição	Referencias Bibliográfica
Sistema nervoso central, como por exemplo: hipotálamo, córtex, hipocampo, mesencéfalo, metencéfalo, medula espinal	[65, 79, 80] ver revisão [430]
Hipófise	[184, 228]
Glândulas sebáceas	[126, 240]
Glândulas lacrimais	[415]
Globo ocular: células da retina, córnea, íris, gânglios ciliares	[13, 354, 360, 431]
Mucosa nasal	[244, 514]
Baço	[225]
Pâncreas	[3, 378]
Coração	[4, 356]
Células endoteliais	[221, 222, 429]
Placenta	[119, 173]
Cólon, neurónios entéricos, esfíncter pilórico	[18, 95, 279, 391]
Fígado	[144]
Sistema reproductor feminino e masculino	[229, 230, 455]
Sistema urinário	[381, 511]
Língua, glândulas salivares e polpa dentária	[78, 136, 137, 515]
Glândula supra-renal	[76, 288, 449, 487]
Células de Langerhans	[263]
Timo	[249]

Como todos os polipeptídeos e proteínas, o NPY é produzido por clivagem de um peptídeo precursor que foi, por sua vez, sintetizado pelos ribossomas e transportado para o lúmen do retículo endoplasmático, e deste para o complexo de

Golgi. O precursor do NPY é o propeptídeo de 97 aminoácidos designado por pro-NPY^[320]. Nos grânulos secretores ocorre a clivagem deste precursor (Figura 1.12). A remoção da sequência de 28 aminoácidos resulta no peptídeo de 69 aminoácidos designado por pro-NPY. Este consiste no NPY₁₋₃₉ em que o grupo carboxílico terminal, Gly³⁷-Lys-Arg³⁹, está flanqueado por um grupo de 33 aminoácidos (o CPON, "C Flanking Peptide of NPY" o peptídeo que continua ou ladeia o NPY no grupo carboxílico). Este peptídeo é, em seguida, sujeito à acção da enzima carboxipeptidase B (CPE) resultando o NPY₁₋₃₇ que, por sua vez, é o substrato da enzima de amidação (PAM; peptil-glicina-amino-monoxigenase), resultando o NPY₁₋₃₇ amidado que é biologicamente activo^[311]. Ao NPY₁₋₃₆, designaremos simplesmente por NPY.

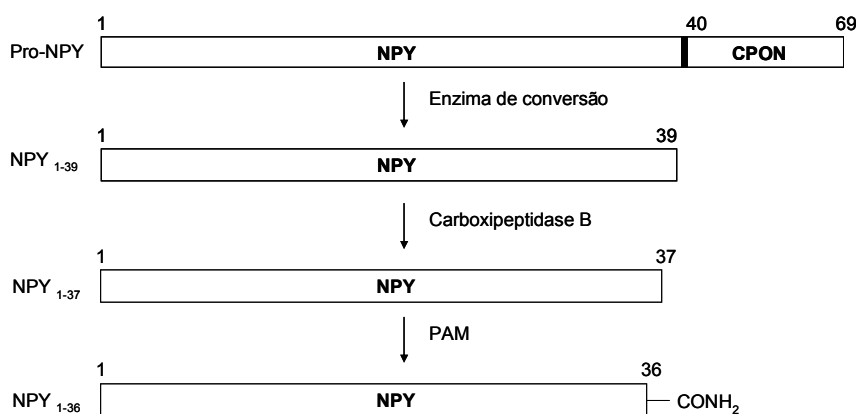


Figura 1.12 - Esquema da síntese de NPY a partir do precursor pro-NPY.

O pro-peptídeo é constituído pelo NPY₁₋₃₉ e pelo peptídeo CPON. O NPY₁₋₃₇, resultante da acção da enzima de conversão e da enzima carboxipeptidase B, é o substrato da enzima de amidação, PAM, que o converte no peptídeo biologicamente activo, o NPY₁₋₃₆ ou NPY.

1.2.2. Metabolização do NPY

Entre as peptidases que apresentam alta afinidade para o NPY, a principal parece ser a dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5). Esta exopeptidase da família das propil-oligopeptidases é uma protease ligada à membrana plasmática que cliva uma ligação peptídica, quando no peptídeo alvo existe o aminoácido prolina na penúltima posição. Assim, actuando no NPY, a DPP-IV cliva a ligação Ser-Pro do

terminal amina dando origem ao NPY₃₋₃₆. Este peptídeo perde a afinidade para o receptor Y₁ e torna-se agonista para os receptores Y₂ e/ou Y₅^[310, 311, 312]. Para além da DPP-IV existem outras aminopeptidases que estão descritas como sendo capazes de clivar o NPY. A dipeptidil-peptidase 8 (DPP8) está localizada no citoplasma como uma proteína solúvel e, aparentemente, não é libertada para o meio extracelular, e tal como a DPP-IV, cliva uma ligação peptídica no aminoácido Pro^[2], no entanto com menor eficiência que a DPP-IV. A dipeptidil-peptidase 9 (DPP9) é uma enzima citosólica e tal como a DPP-IV e a DPP8 tem a capacidade de clivar o NPY na ligação peptídica com um aminoácido prolina^[6].

A aminopeptidase P (AP-P; EC 3.4.11.9) é outra peptidase que hidrolisa o NPY. A AP-P tem duas isoformas, sendo a AP-P1 solúvel no citosol, enquanto que a AP-P2 está ancorada à membrana plasmática. Ambas hidrolisam a ligação peptídica entre o primeiro e o segundo aminoácido no terminal amina do peptídeo, sendo o segundo aminoácido a prolina^[478, 480] resultando em NPY₂₋₃₆. Os peptídeos NPY₃₋₃₆ e NPY₂₋₃₆ podem ainda ser degradados pela endopeptidase neutra-24-11, sendo os principais locais de clivagem a Tir²⁰-Tir²¹ e Leu³⁰-Ile³¹ dando origem aos peptídeos biologicamente inactivos NPY₁₋₂₀ e NPY₃₁₋₃₆^[310, 311, 510].

1.2.3 Receptores do NPY

Os receptores do NPY têm 7 domínios transmembranares e estão acoplados às proteínas G^[488, 490]. Até ao momento, considera-se que existem seis tipos de receptores mas apenas 5 deles foram clonados (Y₁, Y₂, Y₄, Y₅ e y₆). O receptor Y₃ ainda não foi clonado^[314]. O perfil de ligação dos diferentes ligandos para cada tipo de receptor está esquematizado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 Perfil de potência de ligação do NPY e seus análogos aos diferentes receptores do NPY

Receptor do NPY	Perfil
Y ₁	NPY≈PYY≈[Leu ³¹ ,Pro ³⁴]NPY>NPY ₂₋₃₆ >NPY ₃₋₃₆ ≥PP>NPY ₁₃₋₃₆
Y ₂	NPY≥NPY ₂₋₃₆ ≈NPY ₃₋₃₆ ≈NPY ₁₃₋₃₆ >>[Leu ³¹ Pro ³⁴]NPY
Y ₃	NPY>NPY ₁₃₋₃₆ >PYY
Y ₄	PP>PYY≥NPY>NPY ₂₋₃₆
Y ₅	NPY≈PYY≈NPY ₂₋₃₆ >hPP>[D-Trp ³²]NPY>NPY ₁₃₋₃₆ >rPP
y6 (§)	1) NPY≈PYY≈[Leu ³¹ ,Pro ³⁴]NPY>>PP 2) PP>[Leu ³¹ ,Pro ³⁴]NPY>NPY≈PYY

(§) Dois laboratórios diferentes clonaram o receptor y6 de murganho, mas os perfis de ligação dos vários ligandos é bastante diferente um do outro. **1)** de acordo com [496] e o **2)** de acordo com [177]. Tabela adaptada de Berglund et al., 2003 [37].

Os receptores Y₁, Y₂ e Y₅ têm apenas 30% de homologia^[314]. Vários subtipos do receptor Y₁ foram encontrados nos peixes, mas não em mamíferos. Recentemente foi descoberto um receptor semelhante ao Y₂, e foi designado por Y₇^[156]. O receptor Y₇ existe em anfíbios, tubarões e em peixes ósseos. Aparentemente, este receptor desapareceu evolutivamente na linhagem dos mamíferos^[55, 265].

O receptor NPY Y₁

O receptor Y₁ para ser activado necessita que o terminal amina do NPY esteja intacto. Assim, o receptor Y₁ é activado pelo NPY, NPY₂₋₃₆, NPY₃₋₃₆, NPY₁₃₋₃₆ e NPY₁₈₋₃₆ não permitindo, no entanto, que a activação seja feita com um peptídeo com substituições no terminal carboxílico^[183, 250].

A activação do receptor Y₁ provoca vasoconstrição^[71, 498] e proliferação das células do músculo liso^[522]. A sua activação está associada à diminuição da ansiedade e depressão^[388, 403], ao aumento de apetite^[94, 266, 267], bem como ao consumo de álcool^[234, 461] e, ainda, na proliferação tumoral^[234, 248, 392].

As vias de transdução de sinal intracelulares associadas ao receptor Y₁ serão apresentadas mais à frente (secção 1.2.3.1).

O receptor Y₂

Ao contrário do que acontece, com o receptor Y₁, o receptor Y₂ não é internalizado depois de uma prolongada exposição ao agonista^[166, 365]. Funcionalmente, o receptor Y₂ é principalmente, angiogénico^[105, 135, 269, 428, 522], e diferentes polimorfismos no receptor Y₂ estão associados à obesidade^[291, 427, 465].

O receptor Y₃

Enquanto o receptor Y₁ e Y₂ têm a mesma afinidade para o NPY e os seus fragmentos, bem como para o PYY, o receptor Y₃ não é capaz de reconhecer o PYY, e é caracterizado farmacologicamente como sendo o que tem maior afinidade para o NPY^[314]. O facto de ainda não estar clonado implica que este receptor esteja pouco caracterizado, e é apenas baseado em estudos farmacológicos. Fizeram-se estudos de ligação com quimeras de peptídeos NPY-PYY, onde o terminal amina do NPY foi ligado ao terminal carboxílico do PYY, revelando que quando os resíduos Pro¹³ e Ala¹⁴ do NPY eram substituídos pela Ser¹³ e Pro¹⁴, a Pro¹⁴ cria uma conformação estrutural no PYY que torna impossível a ligação com o receptor Y₃^[167]. A presença do receptor Y₃ foi demonstrada farmacologicamente nos tecidos periféricos como o gânglio cervical de rato^[153], cólon de rato^[122], na medula suprarrenal bovina^[343, 489] e nas células cromafins humanas^[76]. Funcionalmente, o receptor Y₃, está também associado a hipotensão, bradicardia e inibição dos efeitos do glutamato^[182] e ainda como receptor responsável pelo efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas^[76].

O receptor Y₄

O receptor Y₄ tem uma maior afinidade para o peptídeo pancreático, PP, do que para o NPY. A farmacologia e a distribuição do receptor Y₄ é bastante variável de espécie para espécie^[289, 290]. No Homem, o RNAm do receptor Y₄ foi encontrado na próstata, no cólon, pâncreas, no intestino delgado, nas células do músculo liso e em determinadas regiões do cérebro como é o caso do hipotálamo^[34, 37, 321]. O receptor Y₄ está envolvido na secreção gástrica^[148] e induz um aumento de apetite^[66]. O receptor Y₄ ainda está ainda envolvido na regulação da reprodução^[223, 386].

O receptor Y_5

O receptor Y_5 tem uma região do promotor comum ao Y_1 ^[165]. A função do receptor Y_5 está relacionada com a estimulação de apetite e com o aumento da adipólise^[61, 214, 218, 267], na excitabilidade cerebral^[32, 337, 387, 500] e com a angiogénese^[328, 522].

O receptor y_6

O receptor y_6 apesar de já ter sido clonado, ainda não foi encontrada qualquer função fisiológica. O receptor y_6 já foi detectado no coração, musculo esquelético, hipotálamo e tracto gastrointestinal^[178, 304].

1.2.3.1. Vias de transdução de sinal acopladas ao receptor Y_1

O receptor Y_1 está acoplado às proteínas G, e a sua activação leva à inibição da adenilciclase^[145] (Figura 1.13). Selbie *et al.*, (1995) refere que o receptor Y_1 activa a PKC através da activação da PLA_2 ^[416] (Figura 1.13). Outros estudos indicam que o receptor Y_1 está acoplado à via das MAPK^[233] através da fosforilação dos resíduos de Tre-Ser, um efeito que é dependente da via da PI-3-K^[18, 299, 340] ou da activação da PKC^[300] (Figura 1.13). A activação das MAPK parece estar também associada a proteínas G, constituindo portanto, o mesmo mecanismo da inibição da adenilciclase e da mobilização do Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares (Figura 1.13). No entanto, segundo Kribben *et al.*, (1997) e van Biesen *et al.*, (1996) a activação das MAPK associadas às proteínas G não envolve a diminuição do AMPc através da inibição da adenilciclase, nem como efeito secundário do aumento do $[Ca^{2+}]$ ^[251, 475] (Figura 1.13). É possível que esta activação das MAPK esteja associada às subunidades $\beta\gamma$ das proteínas G^[233] (Figura 1.13). O receptor Y_1 activa as ERK 1/2 e, apenas em parte a p38, induzindo a proliferação celular das células de Müller^[319]. Outros estudos indicam que a fosfolipase A_2 , C e D e a PKC não são as principais vias de transdução de sinal acopladas à activação dos receptores Y_1 em determinados tipos de células, como por exemplo, nas células HEL^[106, 316]. Apesar da fosfolipase C (PLC) e do receptor Y_1 não estarem acoplados nas células HEL e

CHO, noutros modelos foi possível observar que a PLC é uma das vias acopladas ao receptor Y_1 ^[366] (Figura 1.13).

O receptor Y_1 rapidamente dessensibiliza em resposta a vários activadores da PKC ou de tirosina-cinase^[166, 210]. Além disso, a estimulação do receptor Y_1 induz a fosforilação de CREB, contribuído deste modo para a expressão dos genes que contêm os locais de ligação para CREB, CRE, o que inclui o gene do receptor Y_1 . Este processo ocorre através da mobilização de Ca^{2+} e activação de CaMKs^[421, 422] (Figura 1.13).

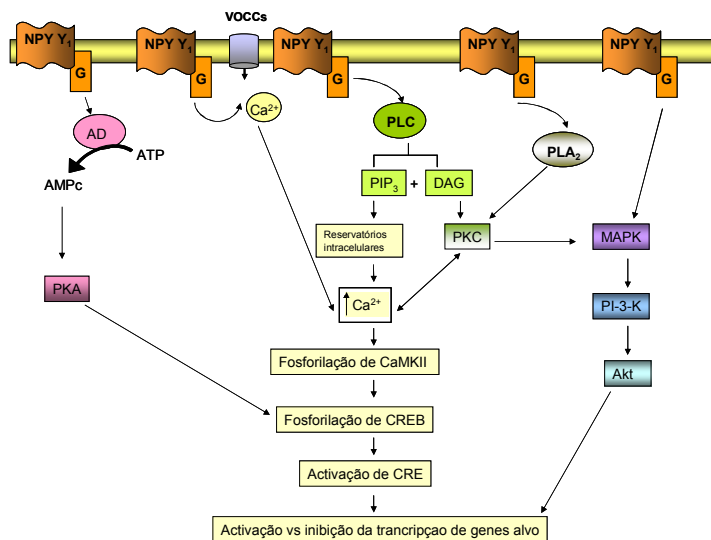


Figura 1.13 - Esquema representativo das vias de sinalização acopladas ao receptor NPY Y_1 .

Os receptores Y_1 , NPY Y_1 , estão acoplados às proteínas G (G). A activação do receptores Y_1 inibe a adenilciclase (AD) com a consequente diminuição de AMPc e activação da PKA. Esta, por sua vez, induz a fosforilação das proteínas com afinidade para o elemento de resposta ao AMPc (CREB) que, ao ligarem-se aos locais de reconhecimento dos elementos de resposta ao AMPc (CRE), permitem a activação ou inibição da transcrição de determinados genes alvo, que possuem nos seus promotores as sequências CRE. O NPY activa os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (VOCCs), aumentando $[Ca^{2+}]_i$. A fosforilação da proteína cinase do tipo II dependente de Ca^{2+} e calmodulina (CaMKII) activa CRE. Quando ocorre a activação da fosfolipase C (PLC) há a formação de 1,4,5-trifosfato inositol (PIP_3) e diacilglicerol (DAG). O PIP_3 induz a mobilização de Ca^{2+} e, consequentemente, a fosforilação de CaMKII; o DAG activa a PKC, que pode contribuir para ao aumento do $[Ca^{2+}]_i$ ou activar as MAPK. A PKC pode ser activada pela fosfolipase A_2 , e as MAPK directamente, pela activação dos receptores Y_1 . Quando a via das MAPK é activada, a fosforilação da proteína Akt induz a activação de outros factores de transcrição responsáveis pela activação ou inibição da transcrição de genes alvo.

1.2.4 O NPY na glândula supra-renal

1.2.4.1 Localização do NPY e seus receptores na glândula supra-renal NPY

Diversos trabalhos demonstram que o NPY está presente na glândula supra-renal de diversas espécies de mamíferos tais como no rato, murganho, cão, boi, cobaia, cavalo, gato, porco e, ainda no homem^[54, 111, 150, 186, 208, 260, 287, 295, 357, 369, 438, 479]. A quantidade de NPY-ir na glândula supra-renal é muito variável entre espécies, sendo muito elevada nos gatos (250-500 pmoles/g), moderada em bovinos (60-100 pmoles/g) e baixa em humanos e ratos (5-20 pmoles/g). Na glândula supra-renal, o NPY está localizado em maior quantidade na medula, em especial nas células cromafins, estando ainda presente nas fibras nervosas^[76, 295].

Os estudos de localização do NPY nas células cromafins adrenérgicas ou nas noradrenérgicas são controversos. Estudos demonstram que na medula da glândula supra-renal de rato, murganho, cobaia e gato o NPY-ir está localizado nas células cromafins positivas para PNMT, isto é nas células adrenérgicas^[288, 383]. Contrariamente, outros estudos demonstraram que nas células cromafins da glândula supra-renal de gato, cobaia, cão, cavalo e boi, o NPY está localizado nas células noradrenérgicas^[186, 295, 408, 479]. No rato, foi ainda encontrado NPY-ir nos dois tipos de células cromafins^[408]. Na glândula supra-renal humana, Lundberg *et al.* (1986) mostraram que cerca de 90 % do NPY-ir estava localizado nas células adrenérgicas, havendo ainda outras células que contêm NPY-ir e que não são adrenérgicas^[288].

Receptores de NPY

Diversos trabalhos demonstram a presença de receptores de NPY na supra-renal. O RNAm para o receptor Y₁ foi detectado em células cromafins de boi^[513], e os receptores Y₁, Y₂, Y₄ e Y₅ nas de células cromafins humanas e de rato em cultura^[76, 390]. Nos estudos com células cromafins bovinas ou com células cromafins humanas não foram detectados locais de ligação para [¹²⁵I]PYY^[489, 513], sugerindo a presença dos receptores Y₃ funcionais em células cromafins de boi e humanas^[76, 343].

1.2.4.2 Efeitos do NPY na medula supra-renal

Os efeitos do NPY na medula da glândula na libertação de catecolaminas são dependentes da espécie animal em estudo e até do protocolo utilizado.

Nas células cromafins bovinas em cultura e nas células PC12 o NPY inibe a libertação de AD e NA estimulada pela nicotina^[113, 205, 207, 343]. Nas células cromafins de rato, um anticorpo anti-NPY aumenta a libertação de catecolaminas estimuladas pela nicotina^[424]. No entanto, na glândula supra-renal bovina perfundida e na zona glomerular/capsular da glândula de rato, o NPY tem o efeito contrário, isto é, aumenta a libertação de catecolaminas^[205, 390]. Para além do seu papel na libertação de catecolaminas, o NPY modula a síntese de catecolaminas nas células cromafins. Assim, nas células cromafins bovinas em cultura, o NPY diminui a actividade da TH^[518]. No entanto, em estudos com ratos, o NPY tem um efeito oposto, isto é, a administração de NPY ou de [Leu³¹, Pro³⁴]NPY ou PYY induz um aumento dos níveis de RNAm da TH na medula da glândula supra-renal^[212].

Nas células cromafins humanas, o NPY aumenta a libertação de catecolaminas de uma forma dependente da concentração^[76]. O envolvimento do receptor Y_3 nesse efeito foi demonstrado em experiências de libertação em sistema de placas, nas quais se usaram vários peptídeos análogos do NPY. Verificou-se que o hPP, o NPY₁₃₋₃₆ e o NPY₃₋₃₆ aumentavam a libertação de catecolaminas humanas mas o PYY não aumentava libertação de catecolaminas nas células cromafins humanas. Por outro lado, os antagonistas dos receptores de NPY, BIBP 3226 (antagonista do receptor Y_1), T4 [NPY-(33-36)]₄ (antagonista do receptor Y_2), ou o antagonista do receptor Y_5 não alteraram a libertação de catecolaminas. Estes resultados sugerem que o NPY estimula a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y_3 ^[76]. A imunoneutralização do NPY com um anticorpo anti-NPY (NPY 05) diminuiu a libertação basal de catecolaminas das células cromafins humanas, o que indica que o NPY que é constitutivamente libertado estimula a libertação de catecolaminas^[76].

Nas células cromafins de murganho, o NPY aumenta a libertação de catecolaminas^[73]. Esse aumento também ocorre com o PYY e com o agonista dos receptores Y_1/Y_5 ([Leu³¹ Pro³⁴] NPY, 100nM). O NPY não alterou a libertação de catecolaminas de culturas de células cromafins de murganhos deficientes no

receptor Y_1 , $Y_1^{-/-}$, o que sugere fortemente o envolvimento do receptor Y_1 no efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas das células cromafins de animais $Y_1^{+/+}$.^[73] Comparando o conteúdo de catecolaminas das glândulas $Y_1^{+/+}$ e $Y_1^{-/-}$, as glândulas dos animais $Y_1^{-/-}$ contêm uma maior quantidade de catecolaminas. Este facto poderia ser explicado por uma maior acumulação intracelular de catecolaminas devido à ausência de estimulação pelo NPY nas células que não possuem o receptor Y_1 . No entanto, as células cromafins dos animais $Y_1^{-/-}$ apresentam maior libertação basal de catecolaminas comparativamente com as células controlo ($Y_1^{+/+}$)^[73]. As células cromafins $Y_1^{-/-}$ estimuladas com nicotina libertavam menos catecolaminas comparativamente com as células dos animais $Y_1^{+/+}$, o que poderia sugerir uma deficiência nas vesículas secretoras. Por outro lado, a expressão e a actividade da TH está aumentada nas glândulas supra renais de animais $Y_1^{-/-}$ comparativamente com as glândulas dos animais controlo, mas a afinidade da enzima para as catecolaminas não se apresentava alterada nos dois grupos de animais. Estes resultados sugerem a existência de uma alteração molecular entre o receptor Y_1 e o promotor da TH^[73].

1.3 Interleucina-1 β (IL-1 β)

1.3.1 A família da interleucina-1

A interleucina 1 é uma família de proteínas (a interleucina-1 α (IL-1 α) e a interleucina-1 β (IL-1 β)), que exercem funções idênticas actuando no mesmo receptor, o receptor do tipo I (IL-1RI). Este receptor necessita de uma proteína acessória (IL-1RAcP) para a sua activação. O antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) é o terceiro membro da família, e que funciona como um antagonista selectivo e competitivo e que bloqueia a acção da IL-1^[350]. Em conclusão, a família de IL-1 consiste assim em 2 agonistas, IL-1 α e IL-1 β e um antagonista específico do receptor (IL-1ra), e dois tipos de receptores, IL-1RI e o receptor da IL do tipo II, IL-1RII^[22, 115].

1.3.1.1 Interleucina-1 β

1.3.1.1.1 Síntese, processamento e libertação

Apesar da maioria dos precursores de IL-1 β existirem no citoplasma, uma fracção move-se para os lisossomas secretores^[15]. Nos lisossomas, além de precursores da IL-1 β existe a pro-caspase-1^[15]. Para o processamento continuar é necessário que a pro-caspase inactiva seja convertida em caspase-1 activa, através de um complexo proteico designado por inflamassoma de enzima convertora de IL-1 β ("IL-1 β inflamassome")^[470]. Esta caspase-1 é também designada por enzima conversora de IL-1 β na sua forma activa (ICE). Quando a IL-1 β é transformada na sua forma madura está pronta a ser libertada (Figura 1.14).

A libertação de IL-1 não ocorre segundo os mecanismos pré-estabelecidos, uma vez que tanto a IL-1 α como a IL-1 β não possuem a sequência de sinalização classicamente definida^[116, 117]. Para que ocorra a libertação da IL-1 β tem de ocorrer uma gradiente de protões resultante da produção de ATP e do efluxo de potássio que leva à activação da caspase-1^[185, 434]. Como consequência, há um influxo de Ca²⁺ que por sua vez activa as fosfolipases dependentes de cálcio, como a PLC^[16], ou as independentes de Ca²⁺, como a PLA₂^[87, 370] (Figura 1.14).

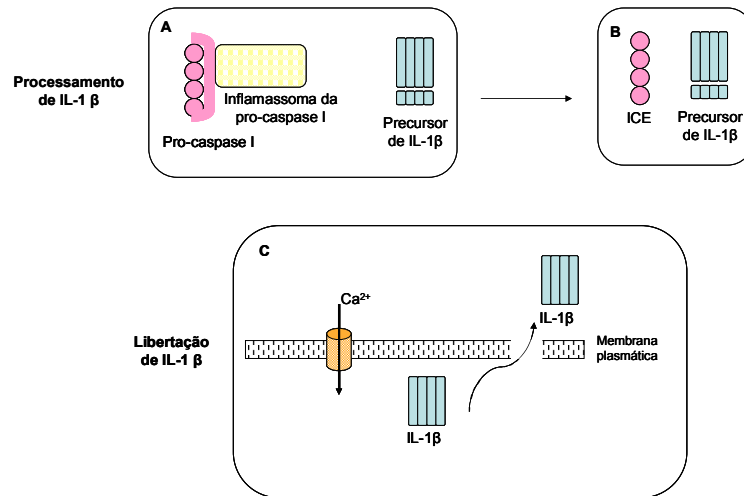


Figura 1.14 - Esquema representativo do processamento e libertação de IL-1 β .

A) a IL-1 β é sintetizada na forma de precursor. Nos lisossomas secretores, além do precursor da IL-1 β , existe a procaspase I inactiva. Um complexo proteico, designado por inflamassoma de pro-caspase I, **B)** torna a enzima numa sua forma activa, a caspase I (ICE). **C)** A ICE transforma o precursor de IL-1 β na sua forma activa, e a IL-1 β é libertada dos lisossomas para o exterior celular.

1.3.1.2 Receptores da Interleucina-1

O receptor IL-1R1 é uma proteína de 80 KDa com 3 domínios extracelulares com 319 aminoácidos: uma região transmembranar de 20 e um domínio citoplasmático de 215 aminoácidos. O receptor O IL-1RII é uma proteína de 60 KDa, com 3 domínios extracelulares de 330 aminoácidos, um transmembranar de 26 aminoácidos enquanto que o domínio intracelular apenas tem 29 aminoácidos^[307]. O IL-1RII como não tem o domínio citoplasmático, não ocorre sinalização intracelular. A iniciação do sinal pela activação do IL-1RI só ocorre na presença de uma proteína acessória, a IL-1RAcP^[176]. Actualmente existem dois modelos que explicam a interacção das proteínas: IL-1 β , IL-1RI e IL-1RAcP. O primeiro refere que o IL-1RI e o IL-1RAcP já se encontram ligados mas, aquando da ligação da IL-1 β ocorre uma mudança estrutural e inicia-se a cascata de sinalização. A teoria mais aceite descreve que para ocorrer a ligação de IL-1RAcP, a IL-1RI é dependente da ligação da IL-1 β que provoca uma modificação estrutural no receptor e, assim, a proteína

acessória já pode interagir^[483]. Estas mudanças estruturais permitem que a IL-1RAcP se ligue ao receptor e sem este complexo IL-1RAcP/IL-1R1/ IL-1 β a sinalização não ocorre (Figura 1.15).

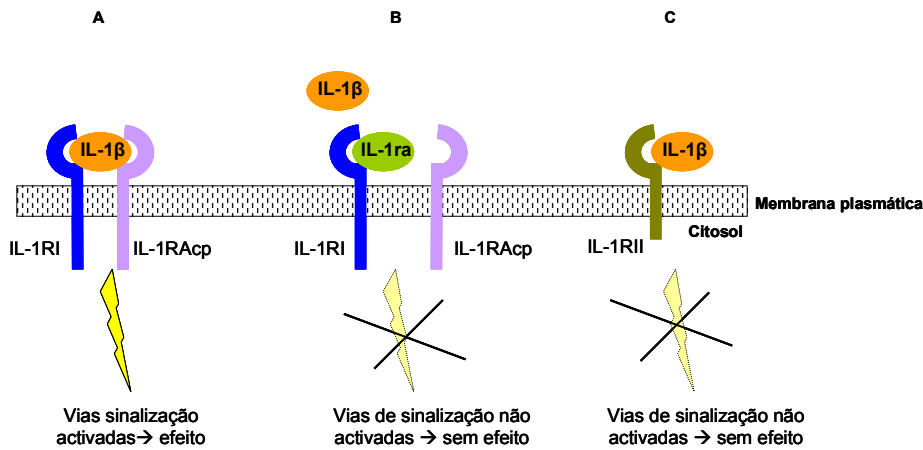


Figura 1.15 – A activação dos receptores de IL-1.

A) A ligação da IL-1 β com o IL-1RI permite a associação de IL-1RAcP, e a consequente activação das vias de sinalização. **B)** A activação dos receptores de IL-1 β é inibida na presença de IL-1ra. **C)** O receptor IL-1RII é um receptor não funcional, impedindo a transdução de sinal.

1.3.1.3 Antagonista do receptor da Interleucina-1 β (IL-1ra)

O antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) ocorre na forma solúvel (sIL-1ra) pronto a ser libertado ou pode ser citoplásmico (icIL-1ra). O sIL-1ra é sintetizado como uma proteína de 177 aminoácidos e necessita da clivagem da sequência sinal de 25 aminoácidos para ser libertado como uma proteína glicosilada constituída por 152 aminoácidos. O icIL-1ra não tem uma sequência sinal e assim fica retida no citoplasma^[60, 195]. Outras formas que não são libertadas apenas foram descritas nos humanos^[297, 330]. A IL-1ra é uma variante estrutural de IL-1, que se liga igualmente a IL-1R, mas que não activa as células. A IL-1ra tem uma homologia de 18 % com a IL-1 α e 22 % com a IL-1 β ^[22, 128].

1.3.1.4 Vias de transdução de sinal acopladas aos receptores da IL-1 β

A via de sinalização intracelular acoplada aos receptores da IL-1 β que melhor caracterizada está é a via que leva à fosforilação do factor de transcrição NF- κ B^[69, 70, 103]. A fosforilação do NF- κ B ocorre quando a I κ B, uma proteína inibitória, é fosforilada e degradada. As cinases responsáveis pela fosforilação de I κ B são as cinases de I κ B (IKK) 1 e 2^[389, 485, 501]. As cinases que estão acima de IKK são as NIK, e por sua vez as IRAK e as TRAF6 estão acima destas^[70] (Figura 1.16).

Outras vias estão associadas a IL-1 β , que inclui as MAPK cinases, as p38, as JNK^[351], a via da PI3K/Akt^[237, 379], PKC^[237, 298], cAMP/PKA^[175, 231] (Figura 1.16).

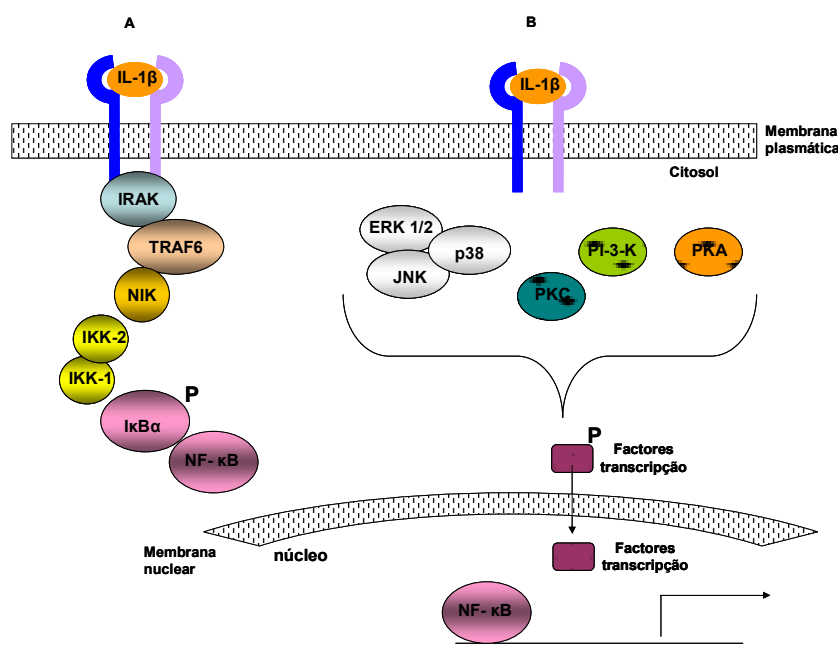


Figura 1.16 - Vias de sinalização intracelulares acopladas à activação do IL-1RI.

A) A activação do factor de transcrição NF- κ B através de fosforilações sucessivas. A cinase responsável pela fosforilação da NF- κ B é a I κ B α . As cinases que estão acima de IKK são as NIK, IRAK e as TRAF6. **B)** As MAPK (ERK1/2, p38 e JNK), PKC, PI-3-K e PKA são cinases capazes de fosforilar e consequentemente activar outros factores de transcrição responsáveis pela activação ou inibição da transcrição de genes alvo.

1.3.2 A Interleucina-1 β na glândula supra-renal

A presença de IL-1 β já foi descrito em células cromafins de murganho^[411], em células cromafins bovinas^[411, 507], em células de feocromocitoma humano^[170] e nas células PC12^[11]. A injeção de lipossacarídeo bacteriano, LPS, na medula da supra-renal de ratos e de murganhos aumentou a imunorreactividade para IL-1 β (IL-1 β -ir)^[35]. Por outro lado, a estimulação com nicotina leva a uma diminuição dos níveis de IL-1 β nas células cromafins bovinas, o que indica que a estimulação colinérgica influencia a libertação de IL-1 β ^[507]. E foi ainda observado que quando as células cromafins de murganho ou de rato são incubadas com reserpina que leva à depleção dos grânulos cromafins, ocorre uma diminuição da IL-1 β -ir, o que sugere que a IL-1 está co-localizada com as catecolaminas nos grânulos cromafins^[411].

Por outro lado, está descrito que a IL-1 β induz a libertação de catecolaminas das células PC-12^[189, 507] e de células cromafins bovinas^[507], e que este efeito é mediado pelos receptores da IL-1^[507]. Além disso, a IL-1 β induziu um aumento dos níveis de RNAm e proteicos de vários peptídeos, nomeadamente de secretogranina II, VIP, galanina^[5, 472], neurotensina e SP^[143].

1.3.3 A Interleucina-1 β e patologias

A produção de IL-1 β em indivíduos normais é bastante baixa e, deste modo, dificilmente detectado no plasma (ver revisão ^[116]). No entanto, em diversas patologias ocorre um aumento da concentração plasmática de IL-1 β . A injeção de apenas alguns ng/kg de IL-1 β induz toda uma série de acções tipicamente associada à inflamação (ver revisão ^[116]). A IL-1 β aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e em leucócitos^[45]. A combinação de libertação de quimiocinas e a indução de moléculas de adesão estimula a extravasão de leucócitos e a infiltração nos tecidos. Para que ocorra efeito, apenas uma pequena porção dos receptores de IL-1 precisam de estar ocupados^[121] e, portanto, a razão entre a disponibilidade de IL-1 β /IL-1ra é que determina a extensão da resposta, em vez de ser a quantidade de IL- β por si só. Esta razão entre IL-1 β /IL-1ra é um processo determinante para determinar uma doença inflamatória^[90].

Diversos estudos demonstraram que as doenças cardiovasculares são mais prevalentes em doentes com stresse psicossocial crónico. Por exemplo, as pessoas com altos cargos, indivíduos socialmente isolados ou com sintomas de ansiedade e depressão têm maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares^[201]. O stresse psicossocial activa o sistema nervoso simpático, que permite a regulação do ritmo cardíaco e a libertação de catecolaminas^[40, 201, 401]. Deste modo altos níveis plasmáticos de catecolaminas contribuem para disfunções endoteliais e para o aparecimento de lesões ao nível da artéria coronária. A aterosclerose e as alterações do sistema imunitário podem resultar como uma consequência do stresse psicossocial^[401, 437]. Está igualmente comprovado, que numa situação de stresse psicossocial há uma activação de factor de transcrição NF-κB em células sanguíneas periféricas mononucleares^[40, 58] que, por sua vez, induz a expressão de várias proteínas inflamatórias, como é o caso da IL-1β^[58]. E deste modo, a IL-1β tem sido referenciada como um importante factor na interacção entre o sistema imunitário e o sistema cardiovascular.

A hipertensão, e consequentemente a aterosclerose, são doenças inflamatórias de baixo grau^[276, 368]. Também em situações de hipertensão há uma activação do factor de transcrição NFκB que, consequentemente, induz a transcrição de genes ligados à inflamação^[271]. Foi ainda observado que indivíduos hipertensos têm uma maior produção de IL-1β comparativamente com indivíduos normais^[157, 275, 517]. Existem alguns estudos que estabelecem uma relação entre variações genéticas e alterações na expressão e libertação de IL-1β e de IL-1ra. Polimorfismos no gene da IL-1ra, como a variante polifórmica IL-1RN*2 estão associados a doenças cardiovasculares^[155, 502], possivelmente devido a um aumento da produção de IL-1β^[108]. A relação entre o stresse e as doenças cardiovasculares e aumento de IL-1β é ainda reforçada pelo facto de, nestas situações, ocorrer um aumento de catecolaminas no plasma que, por sua vez, levam ao aumento da produção de citocinas pelas células do sistema imunitário. Os macrófagos, principais produtores de citocinas pró-inflamatórias, possuem receptores adrenérgicos β₂ que, quando activados, levam à produção de IL-1β^[450]. Para além de patologias do sistema cardiovascular, foi ainda descrito o aumento da IL-1β plasmática em atletas durante exercício físico e no período 3h após o fim desse exercício^[322]. Uma elevada

concentração de IL-1 β plasmática também foi observada em indivíduos com tumores sólidos, leucemias, hepatite, asma, choque séptico ou artrite reumatóide (ver revisão ^[116]). Assim, existe uma interacção entre o sistema imunitário e a glândula supra-renal, produtora de catecolaminas.

1.4 Monóxido de azoto (NO)

O monóxido de azoto (NO) é um mensageiro intracelular envolvido na regulação de várias funções fisiológicas. O NO não é armazenado, libertado ou inactivo através dos mecanismos convencionais. O NO não actua através de receptores, mas difunde-se para dentro das células interagindo com os seus alvos intracelulares. A distância de difusão do NO é de cerca 40-300 µm de diâmetro e isto implica que, apenas as células que estão na vizinhança das células produtoras de NO, sejam influenciadas por ele^[163, 268].

1.4.1 Produção de NO pelas sintases do monóxido de azoto (NOS)

Existem três isoformas da sintase do NO (NOS): a NOS neuronal (ou a NOS do tipo I; nNOS ou NOS-1)^[52]; a NOS indutível (NOS II, iNOS ou NOS-2)^[338, 344]; e a NOS endotelial (NOS do tipo III, eNOS ou NOS-3)^[224]. As formas endotelial e neuronais são expressas constitutivamente, enquanto que a iNOS só é expressa após um estímulo adequado. Após a estimulação, por exemplo pelo LPS, a iNOS é sintetizada “de novo”, com a conseqüente produção de grandes quantidades de NO, comparativamente com as quantidade de NO produzido pelas duas isoformas constitutivamente expressas^[39, 219]. Na Figura 1.17 está representada a estrutura da NOS. De acordo com a sua contribuição durante a síntese de NO, o terminal carboxílico, corresponde à fracção redutase, e estão incluídas a flavina adenina mononucleotídica (FMN), flavina adenina dinucleotídica (FAD) e a calmodulinas; enquanto que a protoporfirina IX, a tetrabiopterina (BH₄) e o local de ligação do substrato se encontram na fracção oxigenase, que corresponde ao terminal amina^[134].

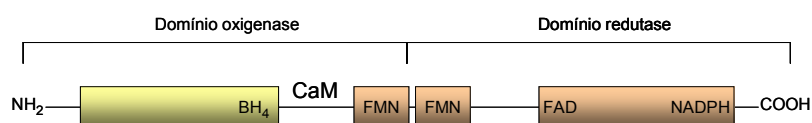


Figura 1.17 - Esquema representativo da NOS.

O terminal amina corresponde ao domínio oxigenase, onde estão localizadas a tetrabiopterina (BH₄), que é um cofactor para a síntese de catecolaminas, a calmodulina e a flavina adenina mononucleotídica (FMN). No terminal carboxílico, existe o domínio redutase onde se encontra a flavina adenina dinucleotídica (FAD) e o cofactor nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH).

Para a síntese de NO, as três isoformas dependem do substracto L-arginina, dos cofactores/coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a BH₄, FAD, O₂ e protoporfirin IX (protoporphyrin IX)^[245].

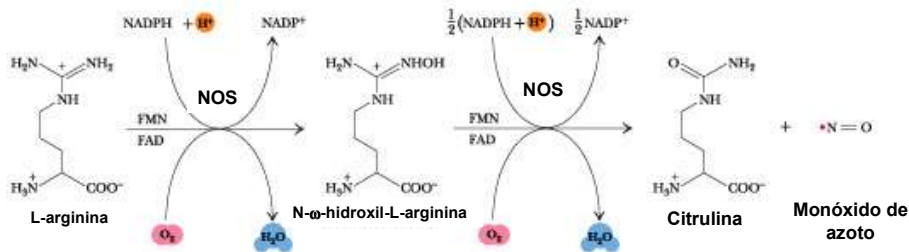


Figura 1.18 - Esquema representativo da síntese do monóxido de azoto.

Para a síntese de NO, a reacção catalítica ocorre em duas etapas: na primeira, a L-arginina é hidroxilada por O₂ e NADPH formando a N-ω-hidroxi-L-arginina; em seguida, N-ω-hidroxi-L-arginina é oxidada e forma-se a citrulina, hidrogénio e NO. Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH); tetrabiopterina (BH₄); flavina adenina dinucleotídica (FAD); oxigénio (O₂).

1.4.2 Regulação da NOS

A activação da iNOS é independente de Ca²⁺, enquanto que as isoformas eNOS e nNOS são dependentes da elevação dos níveis de Ca²⁺ citoplasmático para que ocorra a sua activação^[10, 164, 196]. Nas formas constitutivas, eNOS e nNOS, os estímulos que aumentam [Ca²⁺]_i, permitem que o complexo Ca²⁺/calmodulina se ligue às NOS. Quando os níveis de Ca²⁺ diminuem, ocorre uma dissociação da calmodulina que, por sua vez, se dissocia da NOS. Portanto, as diferenças de [Ca²⁺]_i na célula funcionam como o interruptor que permitem a activação/inactivação da NOS^[410, 506]. A iNOS, apesar de não ser regulada por Ca²⁺, tem locais de ligação da calmodulina^[164].

As NOS podem ainda ser reguladas por fosforilação. A actividade catalítica diminui quando ocorre a fosforilação por cinases dependentes de AMPc^[57], PKC^[335] ou cinases dependentes de Ca²⁺/calmodulina^[196, 410].

1.4.3 Mecanismos intracelulares activados pelo NO

A enzima guanidil ciclase (GC) é descrita como sendo o principal alvo do NO com a consequente produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)^[23, 362]. O GMPc é sintetizado a partir duma família de enzimas, a já referida GC, que têm uma sequência de aminoácidos idêntica à região catalítica da adenilciclase^[253, 463]. Existem duas isoformas da GC, uma GC associada à membrana plasmática e outra GC citoplasmática. Os alvos do GMPc na célula são variados, como por exemplo, os canais de cálcio e de sódio, as cinases dependentes de GMPc (PKG) e fosfodiesterases dependentes de GMPc (PDEs)^[278, 286]. O GMPc está fortemente envolvido na regulação do conteúdo intracelular de Ca^{2+} . A activação de canais de cálcio sensíveis ao potássio pela PKG, induz a hiperpolarização da membrana impedindo a entrada de Ca^{2+} pelos VOCCs^[12, 21]. Por outro lado, está descrito que a via GMPc/PKG regula os receptores de IP_3 através da sua fosforilação com a consequente diminuição de libertação de Ca^{2+} das reservas intracelulares para o citoplasma^[77, 329, 409]. Para além destes mecanismos dependentes de GMPc, o NO pode activar a PKC de uma forma independente de GMPc^[375, 512]. Além disso, o NO reage muito rapidamente com aniões superóxidos de modo a formar o peroxinitrito ($ONOO^-$), que depois se decompõe de modo a formar radicais hidroxil ($\cdot OH$) ou outro bioproducto reactivo que pode directamente activar a PKC^[172].

1.4.4 NO e patologias

O NO é um importante factor na inflamação. Ele reduz a agregação de plaquetas e a sua adesão, inibe várias funções dos mastócitos durante uma inflamação e funciona ainda como um regulador do recrutamento de leucócitos. As espécies reactivas derivadas do NO, incluindo o radical anião superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o anião hipoclorito (OCl^-), produzidos por células fagocitárias como os neutrófilos e macrófagos activos^[30] possuem uma actividade antimicrobiana que lhes permitem danificar o DNA, proteínas e lípidos de agentes invasores^[402, 499]. A activação da NOS e a subsequente produção de elevados níveis de NO é um importante mecanismo de defesa contra infecções e, pode mesmo, funcionar como um mecanismo anti-tumoral da imunidade inata^[159]. No entanto, a sobreprodução

de NO ocorre em várias condições patológicas: doenças neurodegenerativas, doenças auto-imunes, doenças infecciosas, proliferação tumoral, angiogénese e diabetes^[7, 109, 142, 154, 159, 226, 282, 339].

1.4.5 O efeito do NO na medula da glândula supra-renal

O efeito do NO na glândula supra-renal já foi descrito por vários autores. Na medula supra-renal, o NO pode ser produzido pelas células endoteliais^[466] e pelos nervos aferentes que estão em contacto com as células cromafins^[206, 302, 451]. Além disso, também já foi descrito a presença de NOS em células cromafins bovinas^[359, 414, 482] e em grupos de células cromafins que se agrupam à volta dos vasos sanguíneos^[217]. Deste modo, pode antecipar-se que o NO tenha um efeito autócrino/ parácrino nas células cromafins, modulando, por exemplo, a libertação de catecolaminas.

O efeito do NO na libertação de catecolaminas pelas células cromafins é bastante controverso. Alguns estudos demonstram que o NO aumenta a libertação de catecolaminas em células cromafins de bovino^[353, 358, 473], outros indicam que há uma inibição de catecolaminas em células cromafins de bovino e de truta-francesa^[358, 396, 414] e outros, ainda, que indicam que o NO não tem qualquer efeito em células cromafins bovinas e em glândulas supra-renais de rato^[256, 426]. Por outro lado, Kolo *et al.* (2004) demonstrou que o NO tem a capacidade de degradar as catecolaminas^[247] e outros estudos corroboram estes resultados ao demonstrar que o NO diminui a estabilidade das catecolaminas após a sua libertação^[309].

O efeito do NO na regulação da síntese e libertação de catecolaminas está relacionado com alterações dos níveis intracelulares de cálcio e/ou regulação da activação da TH. O aumento da libertação de catecolaminas poderia ser explicado pelo facto de os dadores de NO aumentarem o conteúdo intracelular de Ca^{2+} ^[359, 482]. No entanto foi verificado que o aumento de $[Ca^{2+}]_i$, devido à mobilização dos reservatórios intracelulares não seria suficiente para induzir excitação^[481]. Por outro lado, a modulação dos níveis intracelulares de catecolaminas pode ser explicado pela acção do NO ao nível da TH^[236, 394, 508].

Como já foi referido anteriormente, o NO inicia o seu efeito através da activação da GC com o consequente aumento da libertação de GMPc. Também nas células

Capítulo 1__

cromafins a GC é o principal alvo do NO, com o consequente aumento de GMPc^[118, 353]. O GMPc inibe a libertação de catecolaminas em células cromafins bovinas^[72, 395]. Esta inibição da libertação de catecolaminas foi explicada pelo facto do GMPc fosforilar a proteína associadas aos VOCCs, inibindo o efluxo de Ca^{2+} ^[209, 414, 482] e, consequentemente, a libertação de catecolaminas.

1.5 Objectivos do trabalho

A activação do eixo hipotálamo-glândula pituitária-suprarrenal (HPA) pode modular o sistema imunitário. As citocinas e o NPY são reguladores do eixo HPA e ambos são produzidos pela medula supra-renal. A IL-1 β é uma citocina cujo papel na libertação de catecolaminas pelas células cromafins é ainda controverso. Por outro lado, o NPY é um neuropeptídeo co-libertado com as catecolaminas e actuando nos receptores estimula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas e de murganho. No entanto os mecanismos intracelulares acoplados à activação dos receptores do NPY (receptores Y₃ e Y₁) e da IL-1 β e à estimulação da libertação de catecolaminas pelas células cromafins é ainda desconhecido. Assim os objectivos desta tese são:

- 1) Por um lado, estudar os mecanismos intracelulares acoplados à activação do receptor Y₁ que levam ao aumento da libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho.
- 2) Tendo como ponto de partida que a activação do receptor Y₁ induz o aumento da libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho e que a concentração intracelular de catecolaminas está dependente de um equilíbrio entre a exocitose e a síntese de catecolaminas, o segundo objectivo deste trabalho é investigar a existência de interacção molecular entre o receptor Y₁ e o promotor da enzima da síntese de catecolaminas, a hidroxilase da tirosina (TH).
- 3) O terceiro objectivo do trabalho é avaliar o papel da IL-1 β na libertação de catecolaminas e de NPY pelas células cromafins de murganho. Como o NPY estimula a libertação de catecolaminas, pretende-se ainda estudar o papel do NPY no efeito da IL-1 β .
- 4) O quarto objectivo do trabalho, consiste no estudo do papel da IL-1 β na libertação de catecolaminas e de NPY pelas células cromafins humanas e avaliar o papel do NPY e do NO no efeito estimulador da IL-1 β . Por outro lado, as várias vias de sinalização intracelular acopladas à activação do receptor da IL-1 β e do receptor do NPY Y₃, serão igualmente estudadas. Será também estudado o efeito da IL-1 β na regulação da fosforilação da TH.

Capítulo 2
Material e Métodos

2.1 Cultura de células cromafins

2.1.1 Cultura de células cromafins humanas

As glândulas supra-renais foram obtidas pelo Departamento de Urologia e Transplantação Renal do Hospital Universitário de Coimbra, Portugal, a partir de doadores cadáveres de rim para transplantação renal (20 homens, 16 mulheres, 36 ± 27, idade mínima a idade máxima). As glândulas supra-renais são conservadas na solução fisiológica da Universidade de Wincon. Após um período máximo de 6 horas iniciou-se a preparação da glândula supra-renal para a cultura celular.

A cultura das células cromafins da glândula supra-renal foi realizada como descrito por Cavadas *et al.* (2001)^[76] com algumas alterações. Após a recuperação da glândula do bloco operatório todo o procedimento da cultura celular foi realizado em condições estéreis numa câmara de fluxo laminar. Após a remoção do tecido adiposo circundante à glândula, injectou-se na veia 5 a 7 ml de uma solução de colagenase a 0,2 % (Tipo H, Sigma, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Para iniciar a digestão, a glândula foi em seguida colocada num tubo cónico de 50 ml contendo 20 ml de uma solução de Hanksⁱ suplementada com 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C, que designaremos por HBSS-PS. Após 15 minutos de digestão, a glândula foi aberta e a medula separada do córtex. O tecido medular foi então colocado em 10 ml da solução de colagenase a 37 °C para depois ser sujeito a uma segunda digestão. Após 10 minutos, o sobrenadante foi lavado com 10 ml de meio de cultura, DMEM-F12ⁱⁱ. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 800 r.p.m durante 7 minutos e o tecido dissociado foi lavado novamente com meio de cultura DMEM-F12. O tecido medular ainda não dissociado foi novamente digerido com 10 ml de solução de colagenase. Para uma digestão completa de todo o tecido medular foram necessárias 4 a 8 digestões. No final de todas as digestões o sedimento final, após a última centrifugação a 800 r.p.m durante 7 minutos, foi ressuspenso em 5 ml de DMEM. Posteriormente, procedeu-se à contagem do número de células num hemocitómetro. A viabilidade

ⁱ **Solução de Hanks:** 500 mM KCl; 100 mM KH₂PO₄; 2 M NaCl; 500 mM glucose; 500 mM Hepes

ⁱⁱ **DMEM-F12:** Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com uma mistura de F-12 (Ham) numa proporção de 1:1, 15 mM de Hepes, 14 mM de NaHCO₃, 10 % de soro bovino fetal (FCS) inactivado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina.

celular foi determinada com o teste de Azul de Tripano e obteve-se 90-95 % de células viáveis. As células usadas nos ensaios de libertação em placas foram cultivadas em placas de cultura com 48 poços (Costar, Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA), com uma densidade de 120 000 células por poço. Para extractos de “*Western Blot*”, as células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços com uma densidade de 250 000 células por poço. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM-F12 durante 3-5 dias numa incubadora com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂.

2.1.2 Cultura das células da glândula supra-renal de murganho

Para este trabalho utilizaram-se murganhos da espécie Charles River mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal. Todos os animais tinham 12 semanas de idade e foram mantidos em ciclo claro – escuro, de 12 em 12 horas. Para cada cultura celular utilizaram-se 15 murganhos. Os murganhos foram sacrificados por decapitação e as glândulas supra-renais foram rapidamente retiradas, limpas do tecido adiposo envolvente e colocadas numa solução de HBSS-PS. As glândulas foram cortadas em pedaços mais pequenos e digeridas com 1 ml de uma solução de 0,2 % de colagenase (Tipo H, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Após 30 minutos a 37 °C, com agitação intermitente, o sobrenadante (tecido digerido) foi colocado em 10 ml de DMEM-F12, e o tecido digerido foi lavado mais duas vezes com DMEM-F12. A viabilidade celular foi determinada com o teste do Azul de Tripano e obteve-se 85 a 90 % de células viáveis.

As células utilizadas em ensaios de libertação em perfusão foram cultivadas em lamelas de vidro circulares de 2 cm de diâmetro revestidas com poli-D-lisina (2,5 µg/cm²) e com uma densidade de 190 000 células por lamela. Para os ensaios de libertação em placas, as células foram cultivadas em placas de cultura com 48 poços e com uma densidade de 100 000 células. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM-F12 durante 3-5 dias numa incubadora a 37 °C, com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂.

2.2 Experiência de libertação de catecolaminas e NPY

As experiências de libertação de catecolaminas (NA e AD) e NPY pelas células cromafins humanas foram realizadas apenas em sistema de libertação em placas, enquanto que nas células cromafins de murganho as experiências de libertação foram realizadas de duas formas distintas: experiência de libertação em perfusão e experiência de libertação em placas

2.2.1 Experiência de libertação em perfusão

As experiências de libertação realizadas com o sistema de perfusão ligado a um colector de fracções têm a vantagem de determinar a libertação de NA e AD por períodos curtos ao longo de um determinado tempo. Para além disso, com este sistema os mecanismos de recaptção estão de alguma forma dificultados devido à passagem contínua de um novo soluto fisiológico.

Na câmara de perfusão foram colocadas duas lamelas de vidro de 2 cm de diâmetro contendo as células cromafins de murganho. A câmara de perfusão foi colocada num banho de água a 37 °C e as células perfundidas a 0,7 ml/min com Tampão de Krebsⁱⁱⁱ, pH 7,4. Após 90 minutos de estabilização, de minuto a minuto foram colhidas amostras para dosear catecolaminas (NA e AD). Para evitar a degradação das catecolaminas, as amostras foram recolhidas para tubos contendo HClO₄ (0,4 M de concentração final) e rapidamente congeladas e mantidas a -80 °C até ao seu doseamento. No final da experiência, as células na lamela de vidro foram recuperadas por raspagem de modo a dosear o conteúdo intracelular de catecolaminas em tubos contendo 0,4 M de HClO₄. As amostras foram congeladas a -80 °C até se proceder ao seu doseamento. Após descongelação as amostras foram sonicadas com o objectivo de lisar completamente as células e os grânulos citoplasmáticos, e centrifugadas a 14 000 r.p.m durante 8 minutos a 4 °C.

A quantidade de catecolaminas (NA e AD) libertada foi doseada por HPLC, como se descreve no ponto 2.3.

ⁱⁱⁱ **Tampão Krebs:** 111 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; 4,7 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24,8 mM NaHCO₃; 11,1 mM glucose; 15 mM HEPES, pH 7,4

2.2.2 Experiência de libertação em placas

Para as experiências de libertação em placas, as células cromafins humanas e de murganho foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços. Determinou-se a quantidade de catecolaminas (NA e AD) e NPY libertada durante 10 minutos, na ausência ou na presença dos diferentes compostos a testar.

Após 3 dias em cultura, realizaram-se as experiências de libertação em células cromafins humanas e de murganho. As células foram lavadas 2 vezes com o Tampão Krebs, pré-incubadas durante 20 minutos com o mesmo tampão e posteriormente incubadas na presença de diferentes fármacos. Após 10 minutos, o meio de libertação foi transferido para tubos Eppendorf mantidos no gelo e centrifugado (800 r.p.m; 7 minutos; 4 °C) para eliminar possíveis células que tenham sido recuperadas juntamente com o meio de incubação. Para o doseamento de catecolaminas, o meio de incubação foi recuperado para um tubo com 0,4 M de HClO₄ e congelado até se proceder ao seu doseamento. Para o doseamento de NPY, o meio de incubação foi recolhido em tubos Polysorp (Nunc®) contendo 5 % de Tween 20 (v/v) e 0,4 M de EDTA por cada ml de líquido recolhido. No final da experiência, as células de cada poço foram raspadas para se dosear o conteúdo intracelular de catecolaminas e NPY. No doseamento de catecolaminas, as células foram recuperadas em 0,4 M de HClO₄, enquanto que para o doseamento do NPY as células foram recuperadas em Tampão Krebs contendo 0,08 % de Tween 20 e 50 mM de EDTA. Em ambos os casos, a suspensão de células foi congelada até se proceder ao seu doseamento. Antes de se realizar o doseamento, as amostras foram descongeladas, sonicadas e centrifugadas a 15 000 r.p.m durante 8 minutos a 4 °C. O Tampão Krebs usado em todas as experiências de libertação de NPY continha 0,001 % de Tween 20 com a função de evitar que o NPY cole às paredes das superfícies expostas.

A quantidade de catecolaminas (NA e AD) e NPY libertada e o respectivo conteúdo intracelular foram doseados por HPLC e ELISA, respectivamente, como se descreve no ponto 2.3 e 2.4. A quantidade de catecolaminas e NPY libertada é expressa em % do conteúdo intracelular e o efeito dos fármacos de cada experiência como % em relação ao basal (incubação com Tampão Krebs).

2.3 Separação e doseamento de catecolaminas (NA e AD)

A separação e o doseamento de catecolaminas (NA e AD) foram realizados por HPLC com detecção electroquímica. Esta técnica baseia-se numa reacção de oxidação-redução que ocorre na superfície do eléctrodo de trabalho do detector electroquímico. Nesta reacção de oxidação-redução, as catecolaminas são convertidas em quinonas formando-se uma corrente eléctrica que é proporcional à quantidade de catecolaminas presente na amostra ou no padrão. A energia necessária para iniciar ou aumentar esta reacção electroquímica é dada pela diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o eléctrodo de trabalho do detector electroquímico.

Os conteúdos intracelulares obtidos das libertações em placas e em perfusão foram injectados directamente no HPLC. As amostras recolhidas da incubação, e que correspondem ao conteúdo libertado, foram previamente extraídas com alumina activada.

2.3.1 Processo de extracção de catecolaminas pelo método da alumina

A cada amostra adicionou-se 20 mg de alumina e 500 pg de padrão interno, dihidroxibenzilamina (DHBA, Sigma), o pH foi ajustado a 8,6 com 1 M Tampão Tris com 2 % de EDTA (p/v), e para evitar a oxidação das catecolaminas, foi adicionado 5 mM metabissulfito. Após 15 minutos de agitação e 2 minutos de centrifugação (14 000 r.p.m, 2 minutos), a alumina foi lavada 3 vezes com 1 ml de água. As catecolaminas foram eluídas da alumina em 120 µl de uma mistura de 0,2 M ácido acético e 0,04 M ácido fosfórico (v/v) com agitação durante 15 minutos. Após centrifugação (10 000 r.p.m, 5 minutos), injectou-se 100 µl do eluato no sistema de HPLC. As catecolaminas eluídas na fase móvel^{iv} foram separadas por cromatografia utilizando uma coluna de octadecilsilano de 4 µM, com 75 mm/4 mm (Merck Supersphere 100 RP18) e o HPLC Gilson ligado a um detector electroquímico (ESA Coulochem II, modelo 5100A). Neste sistema, a amostra foi inicialmente sujeita a um potencial de +300 mV na Célula de Condicionamento,

^{iv} **Fase móvel:** 50 mM fosfato de sódio, 50 mM acetato de sódio, 0,5 mM SDS, 0,4 mM EDTA, 12 % acetonitrilo, pH=3,2

depois no primeiro eléctrodo da Célula Analítica a um potencial de +600 mV e finalmente, num segundo eléctrodo da célula analítica, a um potencial de -600 mV. Estas diferenças de potenciais permitiram reduzir as catecolaminas. O sinal resultante desta redução, depois de amplificado, foi transmitido a um computador com o “software” de cromatografia da Gilson modelo 712, e a análise foi feita num “software” modelo 715. A identificação e calibração dos picos obtidos nos cromatogramas foi feita por injeção de padrões com quantidades conhecidas de NA e AD. O limite de detecção para NA e AD foi de 0,125 pmol.

2.4 Doseamento do NPY

Para determinar a concentração de NPY utilizou-se um sistema de ELISA (“Enzymatic Linked Immuno Sandwich Assay”; ensaio imunoenzimático em “sandwich”) com dois anticorpos (NPY02 e NPY05), como descrito por Grouzmann *et al.*, (1992) com algumas modificações^[181]. Cada poço da microplaca de 96 poços Polysorp da Nunc[®] foi revestido com 130 ng (100 µl) do anticorpo monoclonal NPY 02, diluído em 50 mM Tampão Tris, a pH 7,5 durante 16 h a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com Tampão Tris-Tween (50 mM Tris a pH 7,5 com 0,08 % de Tween 20), e os poços revestidos com 200 µl de uma solução 5 % de leite desnatado em tampão Tris-Tween. Após 4 lavagens com o Tampão Tris-Tween foram adicionados 100 µl das soluções padrão de NPY (curva de calibração) e as respectivas amostras a analisar, seguindo-se um período de incubação de 16 horas à temperatura ambiente sob agitação suave. Após 4 lavagens com Tampão Tris-Tween incubou-se durante 7 horas à temperatura ambiente com 100 µl do segundo anticorpo, NPY05 (6 µg/ml) ligado à fosfatase alcalina. Após 2 lavagens com Tampão Tris com 0,25 % de Tween 20 e 2 lavagens com tampão Tris com 0,88% de NaCl adicionou-se a cada poço 50 µl de substrato (solução de NADPH do “kit” de amplificação de ELISA, Immunoselect Kit, Gibco, Life Technologies, USA). Após 45 minutos de incubação, adicionou-se 50 µl do amplificador (mistura de desidrogenase do etanol e diaforase, “kit” de amplificação de ELISA) e a leitura de densidade óptica foi determinada a 492 nM. O limite de detecção foi de 0,5 pM.

2.5 SDS-PAGE e “Western e Blot”

As células cultivadas em placas de cultura de 24 poços foram lavadas 2 vezes, e lisadas a 4 °C com um Meio de lise^v suplementado com 100 µM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM ditioneitol, 1 µg/ml quimostatina 1 mg/ml leupeptina, 1 mg/ml antiparina, 1mg/ml ortovanadato, 5 mg/ml pepstatina A, pH 7,4. Qualquer um dos inibidores usados serviu para impedir a degradação proteica e a fosforilação. A concentração de proteína foi determinada pela técnica de Bradford da Biorad, onde foi adicionado a cada uma das amostras uma solução desnaturante^{vi} o soro de albumina bovina (BSA) foi usado para a realizar a curva-padrão e as amostras foram aquecidas durante 5 minutos a uma temperatura de 95 °C. Para a visualização da proteína total foram usados 30 µg de proteína, enquanto para a proteína fosforilada foram necessárias 90 µg de proteína.

Os extractos celulares foram separados por electroforese^{vii} em gel com 10 % poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de SDS (SDS-PAGE). Para análise por imunodeteção, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVD) previamente activadas com metanol, pela técnica de electrotransferência^{viii}, durante 90 minutos a 500 mA, a 4°C. As membranas foram depois bloqueadas durante 1 hora com 5 % (p/v) de leite desnatado com 0,1 % Tween 20 em PBS (que designaremos por TBS-T) e incubadas durante 90 minutos à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C, com o anticorpo primário, diluído em 1 % (p/v) de leite desnatado em TBS-T. As membranas foram depois lavadas durante 30 minutos com uma solução de 0,5 % (p/v) de leite desnatado em TBS-T e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário marcado com a fosfatase alcalina, diluído a 1 % (p/v) de leite desnatado em TBS-T. De seguida, as membranas foram lavadas com PBS-T e reveladas com o sistema ECF (“Enhanced Chemifluorescence”, Quimiofluorescência melhorada; Amersham Life Sciences). A análise e

^v **Meio de lise:** 50 mM KCl, 50 mM PIPES, 10 mM EGTA, 2 mM, MgCl₂, 0,5% Triton X-100.

^{vi} **Solução desnaturante:** 0,5 M Tris, 30 % glicerol, 10 % SDS, 0,6 M DTT, 0,0012 % de azul de bromofenol.

^{vii} **Solução electroforese:** 0,2 M Tris, 1 M Bicina, 0,017 M SDS, pH=8,3

^{viii} **Solução de electrotransferência:** 0,5 % NAOH 2 M, 10 % Metanol, pH= 11

quantificação da imunorreactividade foi realizada por análise densitométrica usando o sistema *Quantity One* (Biorad).

2.6 Medição da actividade do promotor da Hidroxilase da tirosina

2.6.1 Cultura celular da linha celular SK-N-MC

A linha celular SK-N-MC deriva de um neuroblastoma humano e é constituído por células que expressam o receptor Y_1 do NPY^[264, 476]. As células foram cultivadas no Meio DMEM suplementado com 10 % FCS (Biochrom), 10 mM HEPES, 1 % de aminoácidos não essenciais, 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomina. As células com morfologia semelhante a fibroblastos formam monocamadas e foram mantidas a 37 °C com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂.

2.6.2 Transfecção por electroporação das células SK-N-MC

A electroporação consiste na aplicação de pulsos eléctricos que provocam a abertura de poros na membrana plasmática, permitindo a entrada do ADN, presente no meio de electroporação, nas células.

As células SK-N-MC foram transfectadas por electroporação com um plasmídeo (pKS-L) contendo o gene luciferase (Figura 2.1), isolado do pirilampo *Photinus pyralis*, que codifica a luciferase sob o controlo de uma fracção de 775 pares de bases do gene da TH humana (-774 até ao local de iniciação CTG). Este plasmídeo foi cedido pelo Dr. Faucon Biguet, CNRS, Hôpital Pitie-Salpetriere, Paris. Por cada 5×10^6 células SK-N-MC num Meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10 % de FCS, 10 mM HEPES e 1 % de aminoácidos não essenciais) foram transfectados 10 µg de ADN plasmídico a uma voltagem de 280 V e com a capacitância de 960 µF usando o aparelho de electroporação (BioRad GenePulser). A eficiência de transfecção variou de 50 a 70 % e foi avaliada por citometria de fluxo fluorescente (FACS), em células que foram electroporadas nas mesmas condições, mas com um plasmídeo que contém GFP (proteína verde de fluorescente). As células foram mantidas em caixas de Petri de 100 mm e, ao fim de 24 h, as células foram cultivadas em placas de 48 poços com uma densidade de 1×10^5 por poço

num meio com DMEM, suplementadas com 2 % de FCS. Ao fim de 24 h, as células foram incubadas com diferentes compostos (Figura 2.2). Para impedir que o NPY se colasse ao plástico o meio de cultura foi suplementado com 0,2 % de FCS e 0,0001 % de Tween 20.

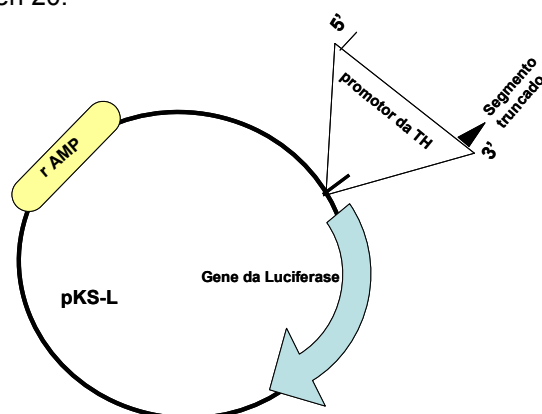


Figura 2.1 - Representação esquemática do plasmídeo usado na transfecção de células SK-N-MC.

Os plasmídeo pKS-L para além do gene que confere resistência à ampicilina (r-AMP), contém ainda o gene da luciferase. Neste plasmídeo foi inserido um fragmento do promotor da TH humana (-775 pares de bases), que possui o terminal 3' truncado e o terminal 5' é cortado pela enzima Hind III.

2.6.3 Actividade da luciferase

A actividade da luciferase foi determinada usando um “kit” luciferase (Promega, Madison, USA). As células que foram cultivadas nas placas de 96 poços e lavadas 2 vezes com PBS. Após a adição de 100 µl de Tampão de lise^{ix}, as células equilibraram à temperatura ambiente durante 15 minutos, foram raspadas e a suspensão foi colocada em tubos de Eppendorf e sujeitas a um vortex de 10-15 segundos. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 12 000 r.p.m durante 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf, e as amostras foram armazenadas a -80 °C.

^{ix} **Tampão de lise:** 25 mM Tris-fosfato (pH 7,8), 2 mM DTT, 2 mM ácido tetraacético-1,2 diaminociclohexano, 10 % glicerol, 1 % Triton X-100

Para se proceder à leitura da actividade da luciferase num luminómetro, adicionou-se 20 µl do sobrenadante a 100 µl da mistura tampão que contém o substrato da luciferase e a leitura foi realizada durante 1 minuto (Figura 2.2).

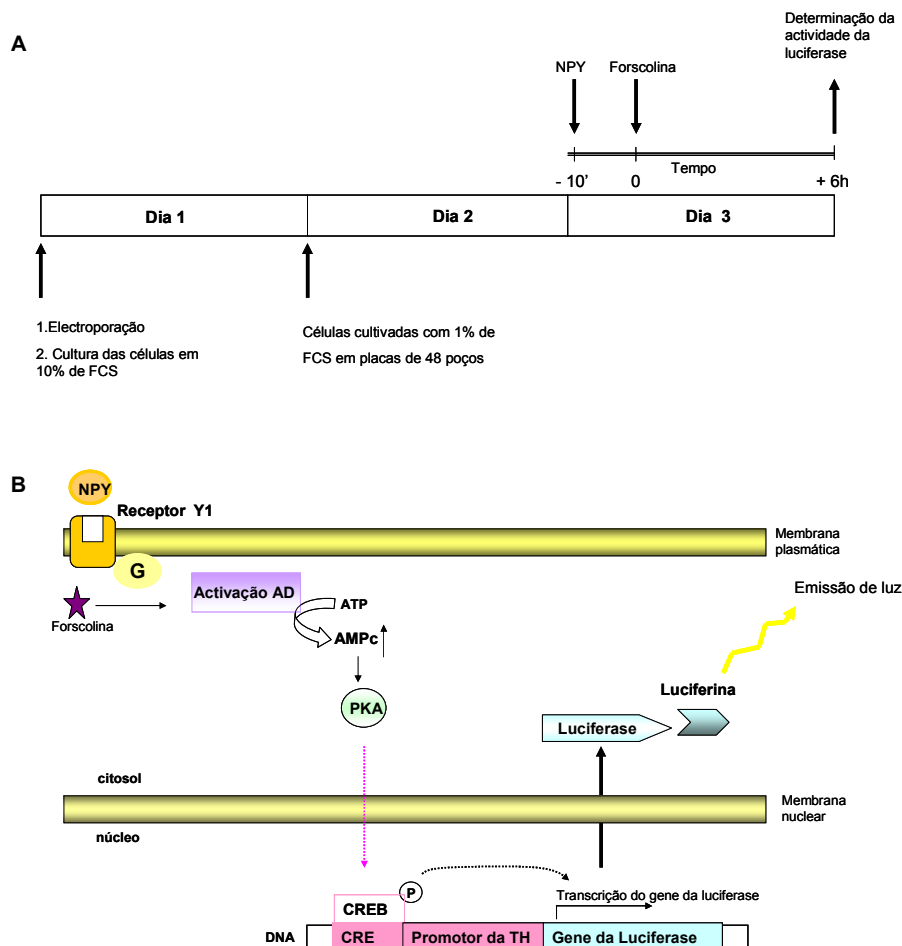


Figura 2.2 - Representação esquemática do protocolo experimental.

A) Representação da experiência por períodos de tempo. As células SK-N-MC são transfectadas com plasmídeo que contém o gene da luciferase e o promotor da TH (Dia 1), e permanecem 24h em repouso a 37 °C. No Dia 2 as células são mantidas em placas de cultura de 48 poços com Meio de cultura suplementado com 1 % de FCS. No Dia 3 as células são incubadas com forscolina (tempo=0), e 10 minutos antes com o NPY. Após 6 h de incubação (a contar desde o tempo 0), mede-se a actividade da luciferase. **B)** Representação esquemática do modelo experimental. A incubação das células SK-N-MC com a forscolina induz a activação da adenilciclase (AD) com a consequente produção de AMPc, que activa a PKA, e a consequente fosforilação da proteína com afinidade para o elemento de resposta ao AMPc (CREB). O CREB, por sua vez, activa o local de ligação de CREB (CRE) que, por sua vez, ao activar o promotor da TH, induz a expressão e transcrição do gene da luciferase. Quando se adiciona o substrato da luciferase, a reacção enzimática é traduzida com emissão de luz que se detecta num luminómetro.

2.7 Imunohistoquímica da glândula supra-renal

A glândula supra-renal foi fixada durante a noite no Tampão Formol com 10 % de PBS. Após o processo de fixação os vários fragmentos do tecido foram imersos em etanol 100% durante 1 h (5 vezes) seguido de imersão Xilol por 3 vezes durante uma hora. Finalmente, os fragmentos de tecido foram embebidos em Histosec[®] durante 4 horas. Em seguida, os fragmentos de tecido foram embebidos em parafina e realizaram-se cortes de 3 µm de espessura que foram colocados em lamelas de vidro previamente revestidas revestidas com poli-D-lisina.

As fatias de 3 µm de espessura foram incubadas durante 2 minutos com Xilol, etanol 100 %, etanol 95 % e etanol 70 %. De seguida foram lavadas com água e PBS durante 2 minutos. Uma vez desparafinadas e hidratadas, as fatias foram tratadas durante 15 minutos com peroxidase de hidrogénio em 0,1 M de PBS e lavadas três vezes com PBS durante 10 minutos cada. As fatias foram incubadas com um tampão de 0,1 M PBS com 0,25 % de Triton X-100. Posteriormente foram incubadas com a solução de anticorpo primário contra a TH (1:1000, Chemicon) ou contra a NOS (1:100, Zymed) em 0,1 M PBS com 0,5 % de Triton X-100 e NGS (soro normal de cabra) durante noite a 4 °C. Após três lavagens à temperatura ambiente com 0,1 M PBS com 2 % de NGS, as fatias foram incubadas durante 1 hora também à temperatura ambiente, com uma solução de imunoglobulinas contra coelho biotiniladas (1:200, Dako, Copenhaga, Dinamarca), numa solução de 0,1M PBS, 0,25 % Triton X-100 e 2 % de NGS. As fatias foram lavadas três vezes com PBS 0,1 M e incubadas durante 1 hora com o substrato de peroxidase, DAB (solução de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Após 3 lavagens com 0,1 M PBS, as fatias foram coradas com o sistema de avidina-biotina-peroxidase. As secções foram analisadas num Microscópio Axiovert 200 e as imagens adquiridas com um Microscópio óptico (Zeiss Axioshop 2 Plus), acoplado a uma câmara digital (AxioCam HRc).

Capítulo 3__

Capítulo 3

Mecanismos intracelulares acoplados à activação do receptor Y_1 do NPY que estimulam a libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho

3.1 Introdução

As células cromafins são células neuroendócrinas especializadas na síntese, armazenamento e libertação de catecolaminas (em especial a AD e a NA). O NPY, como já foi referido anteriormente, é co-armazenado e co-libertado com as catecolaminas e induz a libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho e humanas^[73, 76]. As células cromafins de murganho possuem RNAm para os receptores do NPY do tipo Y₁, Y₂ e Y₅, e o efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas nestas células não é observado quando se utilizam células cromafins de murganhos “knock-out” para o receptor Y₁^[73]. Como já foi descrito na introdução geral (Capítulo 1), a activação do receptor Y₁ está acoplada a vários mecanismos de sinalização intracelular como o aumento da [Ca²⁺]_i e a inibição da adenilciclase, resultando na diminuição da produção de AMPc e consequentemente na inibição da PKA^[1, 76, 203, 318]. Para além destas vias, a activação do receptor Y₁ leva à activação da PLC, PKC e das MAPK^[106, 202, 300, 315, 340, 342]. Por outro lado, a activação das PKC e das MAPK está ainda associada à libertação de catecolaminas pelas células cromafins^[96, 97, 417, 433, 460].

Diversos trabalhos sugerem que o NO modula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins de várias espécies^[308, 358, 414, 482]. Já foi sugerido que o NPY induz a produção de NO noutros tipos de células, sugerindo que o NO poderá constituir um modulador da função do NPY^[114].

Assim, os objectivos deste capítulo são: 1) investigar quais os mecanismos intracelulares que estão acoplados à activação do receptor Y₁ e que estimulam a libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho; 2) estudar a função do NO na libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho quando o NPY activa o receptor Y₁.

3.2 Resultados

3.2.1 O NPY aumenta a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y_1 e de uma forma dependente de Ca^{2+}

Quando as células cromafins de murganho foram incubadas com NPY (100 nM), observou-se um aumento para $243,4 \pm 13,9\%$ e $228,98 \pm 15,7\%$ na libertação de NA e AD, respectivamente, em relação à libertação basal (Figura 3.1). O antagonista do receptor Y_1 , BIBP 3226 (1 μM), diminuiu a libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY (Figura 3.1), indicando que o efeito estimulador do NPY ocorre por activação do receptor Y_1 . Por outro lado, o efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas nas células cromafins de murganho foi igualmente inibido quando as células foram incubadas com um tampão Krebs sem Ca^{2+} (Figura 3.1).

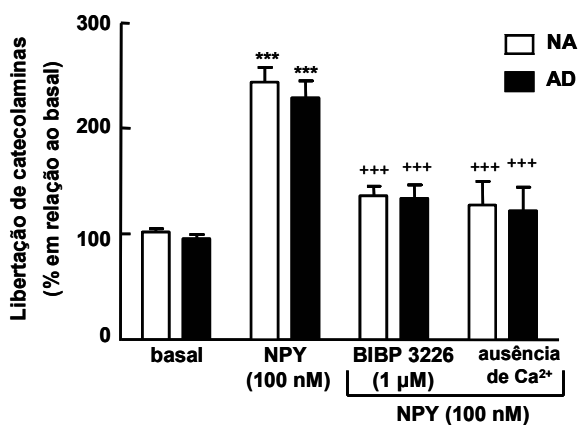


Figura 3.1 - Nas células cromafins de murganho o NPY induz a libertação de catecolaminas através do receptor Y_1 num processo dependente de Ca^{2+} .

As células foram incubadas com NPY (100 nM) durante 10 minutos na presença ou na ausência do antagonista do receptor Y_1 , BIBP 3226 (1 μM), ou num tampão Krebs sem Ca^{2+} . As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3-8 experiências de culturas de murganho; cada condição foi realizada em triplicado. *** $p < 0,001$ comparado com a libertação basal; +++ $p < 0,001$ comparado com NPY (100 nM). ANOVA de duas vias, *post-hoc*.

3.2.2 A libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY depende da activação da via da MAPK e da PKC, mas de uma forma independente da PKA

Para estudar algumas das vias de transdução mais frequentemente acopladas à activação do receptor Y_1 e ao processo de libertação de catecolaminas, testaram-se os inibidores das seguintes cinases: MAPK, PKA e PKC. Na presença do inibidor da MAPK (PD 98059, 50 μ M), o efeito estimulador do NPY na libertação de NA e AD foi inibido em $64,7 \pm 17,9$ % e $59,7 \pm 8,5$ %, respectivamente (Figura 3.2). Do mesmo modo, o inibidor da PKC inibiu $100 \pm 4,6$ % e $71,02 \pm 15,9$ % o efeito estimulador do NPY na libertação de NA e AD, respectivamente (Figura 3.2). No entanto, o inibidor da PKA (H89, 1 μ M) não alterou a libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY (100 nM) (Figura 3.2). Os inibidores das MAPK, PKA e PKC, por si só, não alteraram a libertação não-estimulada de catecolaminas (resultados não apresentados).

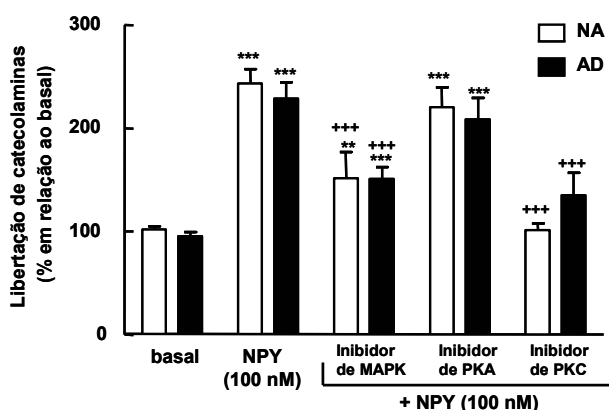


Figura 3.2 - Papel da inibição das MAPK, da PKA e da PKC na estimulação da libertação de catecolaminas induzida pelo NPY.

As células foram incubadas durante 10 minutos com NPY (100 nM) na presença dos inibidores das MAPK (PD 98059, 50 μ M), da PKA (H89, 1 μ M) ou da PKC (bisindolilmaleimida, 1 μ M). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3-8 experiências de culturas de murganho; cada condição foi realizada em triplicado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com a libertação basal; +++ $p < 0,001$ comparado com NPY (100 nM). ANOVA de duas vias, *post-hoc*

3.2.3 A via NO-GMPc modula a libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY, num processo dependente da PKC

O papel do NO na libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY foi investigado incubando as células cromafins com um inibidor da NOS, o L-NAME (500 μ M). O L-NAME inibiu a libertação de NA e AD estimulada pelo NPY em 40,5 \pm 14,9 % e 42,3 \pm 20,3 %, respectivamente (Figura 3.3). Quando as células cromafins de murganho foram incubadas com o dador externo de NO, NOC-18 (100 μ M), verificou-se um aumento de 255,3 \pm 17,5 % e 251,1 \pm 21,1 % na libertação de NA e AD respectivamente, em relação à libertação basal. Na presença de um inibidor da guanidil ciclase (GC, ODQ, 50 μ M) verificou-se uma diminuição do efeito estimulador do NOC-18 e do NPY na libertação de catecolaminas. O ODQ inibiu 37,4 \pm 11,5 % e 39,8 \pm 11,1 % a libertação de NA e AD estimulada pelo NPY, e 63,3 \pm 6,7 % e 59,7 \pm 10,7 % a libertação de NA e AD estimulada pelo NOC-18 (Figura 3.3). O D-NAME (500 μ M), estereoisómero inactivo do L-NAME, o L-NAME e o ODQ não alteraram a libertação basal de catecolaminas (resultados não apresentados).

Estudou-se ainda, o envolvimento das cinases MAPK, PKA e PKC na libertação de catecolaminas estimulada pelo NO. Os inibidores das MAPK e da PKA não alteraram a libertação de catecolaminas estimulada com NOC-18 (100 μ M) (Figura 3.4). No entanto, o inibidor da PKC diminuiu significativamente a libertação de catecolaminas estimuladas por NOC-18, sugerindo que o NO pode activar a PKC. Para comprovar esta hipótese, as células foram incubadas com activador da PKC, o PMA (200 nM). Verificou-se que o PMA aumentou 219,1 \pm 18,6 % e 209,8 \pm 13,2 % a libertação de NA e AD respectivamente. O L-NAME não alterou a libertação de catecolaminas estimulada pelo PMA (Figura 3.4).

A activação do receptor Y_1 e a libertação de catecolaminas de células cromafins de murganho

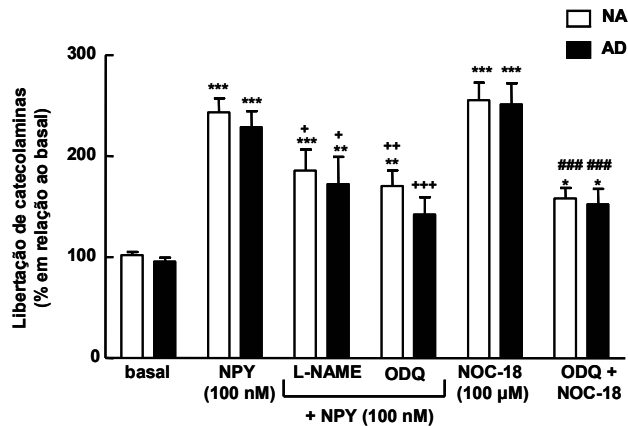


Figura 3.3 - O papel do NO e do GMPc na libertação de catecolaminas estimuladas pelo NPY em células cromafins de murganho

As células foram pré-incubadas durante 15 minutos com os inibidores da NOS (L-NAME, 500 μ M) ou da GC (ODQ, 50 μ M), e depois incubadas durante 10 minutos com os inibidores na presença de NPY (100 nM). As células foram estimuladas por um dador externo de NO (NOC-18, 100 μ M) na presença ou na ausência de ODQ (50 μ M). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3-8 experiências de culturas de murganho; cada condição foi realizada em triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com a libertação basal; + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ comparado com NPY (100 nM); ### $p < 0,001$ comparado com NOC-18 (100 μ M). ANOVA de duas vias, *post-hoc*.

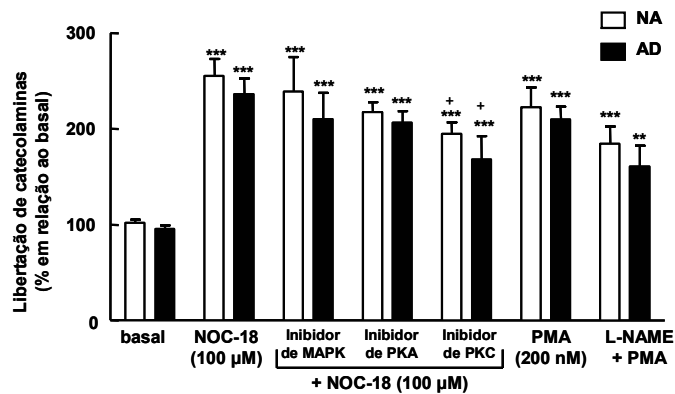


Figura 3.4 - As vias de transdução de sinal envolvidas na libertação de catecolaminas estimuladas pelo dador de NO (NOC-18).

As células cromafins de murganho foram incubadas durante 10 minutos com NOC-18 (100 μ M), na presença de inibidores das MAPK (PD 98059, 50 μ M), da PKA (H89, 1 μ M) e da PKC (bisindolilmaleimida I, 1 μ M). As células foram incubadas com o éster de forbol, PMA (200 nM) *per se*, ou na presença do inibidor da NOS (L-NAME, 500 μ M). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3-8 experiências de culturas de murganho; cada condição foi realizada em triplicado. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com a libertação basal; + $p < 0,05$ comparado com NOC-18 (100 μ M). ANOVA de duas vias, *post-hoc*.

3.3 Discussão

Os resultados deste capítulo mostram que o antagonista do receptor Y_1 , BIBP 3226, inibiu o efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho. Estes resultados estão de acordo com resultados apresentados por Cavadas *et al.* (2006), onde se verificou que o NPY estimula a libertação de catecolaminas de células cromafins de murganho isoladas de glândulas supra-renais de murganhos normais, $Y_1^{+/+}$. Contudo não se obteve o mesmo efeito em células cromafins de murganho isoladas de murganhos *knock-out* para o receptor Y_1 ($Y_1^{-/-}$)^[73]. Estes resultados demonstram que, em células cromafins de murganho, o NPY induz a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y_1 . Nesse mesmo estudo verificou-se que a actividade da TH nas glândulas supra-renais $Y_1^{-/-}$ é superior à actividade da mesma enzima nas glândulas de murganhos $Y_1^{+/+}$, sugerindo um possível envolvimento do receptor Y_1 na síntese de catecolaminas. Uma vez que a síntese e a libertação de catecolaminas são dois fenómenos associados à regulação do conteúdo intracelular de catecolaminas, estes resultados sugerem que o receptor Y_1 regula e contribui para a homeostase do conteúdo intracelular de catecolaminas nas glândulas supra-renais de murganho. Outros trabalhos demonstraram que, em células cromafins bovinas, o NPY regula a homeostase do conteúdo intracelular de catecolaminas, tendo no entanto um efeito diferente. Nestas células o NPY tem um efeito inibitório na libertação de catecolaminas e na actividade da TH^[518]. Por outro lado, também nas células cromafins bovinas, o NPY inibe a produção de AMPc e, consequentemente, a actividade da PKA^[520].

Um dos principais mensageiros intracelulares envolvidos na exocitose das células cromafins, a exocitose, é o Ca^{2+} que entra pelos VOCCs da membrana plasmática^[120, 162]. Diferentes segretagogos das células cromafins, como a leptina, a angiotensina II ou a histamina activam diferentes VOCCs com a consequente estimulação da libertação de catecolaminas^[73, 347, 447]. Neste capítulo também se observou que a remoção do Ca^{2+} extracelular diminui o efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas, induzido pela activação dos receptores Y_1 . Apesar da relação entre a activação do receptor Y_1 e o aumento do Ca^{2+} intracelular nestas células ainda não ter sido investigado, vários estudos utilizando outros tipos de

celulas descrevem que a activação do receptor Y₁ induz um aumento de [Ca²⁺]_i^[1, 76, 107, 318, 477]. Para além do papel do Ca²⁺ na excitose, este ião pode ainda regular a síntese de catecolaminas, uma vez que activa a CaMKII levando à activação da TH por fosforilação do resíduo Ser¹⁹^[467].

Tendo como base as vias de sinalização mais frequentemente acopladas à activação do receptor Y₁, este trabalho foi direccionado para esses mecanismos e, para isso, avaliou-se o efeito de inibidores de diferentes cinases na libertação de catecolaminas. Verificou-se que o NPY estimula a libertação de catecolaminas através de um mecanismo dependente das MAPK e da PKC. No entanto, o inibidor da PKA não altera significativamente o efeito estimulador do NPY, o que sugere que a PKA não está envolvida neste mecanismo intracelular.

Apesar da activação do receptor Y₁ estar normalmente associada a uma inibição da adenilciclase^[1, 313], vários estudos demonstraram que o NPY, *per se*, não tem qualquer efeito na acumulação de AMPc^[380]. Em células cromafins bovinas e humanas observou-se que o NPY inibe a acumulação de AMPc induzida pela forskolina, mas que não tem qualquer efeito em células que não foram previamente estimuladas com forskolina^[76, 519]. Estas observações poderão explicar os resultados apresentados neste capítulo, em que o inibidor de PKA não alterou a libertação de catecolaminas nas células cromafins de murganho estimulada pelo NPY.

A relação entre a activação do receptor Y₁ a activação das MAPK foi já demonstrada em diferentes tipos de células^[81, 233, 300]. Por outro lado está, ainda, descrita uma relação entre a activação das MAPK e a libertação de catecolaminas pelas células cromafins bovinas^[97, 140], onde se observou que o inibidor das MAPK induziu uma inibição do efeito estimulador da nicotina e do KCl na libertação de catecolaminas^[97]. Assim sendo, estas evidências estão de acordo com os resultados apresentados mostrando que em células cromafins de murganho as MAPK estão envolvidas na libertação de catecolaminas induzida pela activação do receptor Y₁.

Para além das MAPK, verificou-se que a activação do receptor Y₁ e a estimulação da libertação de catecolaminas em células cromafins de murganho ocorre via um mecanismo dependente da PKC. A activação do receptor Y₁ e a consequente activação da PKC já foi descrita noutros tipos de células^[110, 192, 416]. Além disso, foi também sugerido que a activação da PKC regula a libertação de catecolaminas nas

células cromafins de outras espécies^[296, 306, 417, 425, 448, 452, 493]. Apesar de ainda controverso, existem alguns estudos que demonstram que a activação da PKC estimula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins bovinas, de rato, de porco e ainda nas células PC12, induzindo um aumento do influxo de Ca^{2+} , e consequentemente promovendo a exocitose^[296, 306, 417, 425, 448, 452, 493]. Para além disso, a PKC está ainda envolvida no processo de recrutamento dos grânulos cromafins para a membrana plasmática e a sua fusão com a membrana plasmática e a consequente exocitose^[257].

Neste trabalho demonstrou-se que o NO é um mensageiro intracelular entre a activação do receptor Y_1 e a activação da PKC. Além disso, o efeito estimulador da activação do receptor Y_1 é inibido por inibidores de NOS, o L-NAME, bem como pelo inibidor da GC, o ODQ. Estes resultados sugerem que a activação da via NO-GMPc é importante na regulação da libertação de catecolaminas pelo NPY. O papel regulador do NO na libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho foi ainda confirmado, uma vez que a estimulação das células cromafins de murganho com NOC-18 (dador externo de NO) tem um efeito estimulador na libertação de catecolaminas semelhante ao induzido pelo NPY nas células cromafins de murganho. De uma forma semelhante ao que foi observado para o efeito do NPY, a inibição da PKC inibiu o efeito estimulador do NOC-18 na libertação de catecolaminas. A estimulação directa da PKC com o éster de forbol, o PMA, levou a um aumento na libertação de catecolaminas que não foi inibido pelo inibidor da NOS. Estas evidências sugerem que a PKC é activado pela produção de NO. Por outro lado, o inibidor das MAPK não alterou o efeito estimulador do NOC-18 na libertação de catecolaminas. Estes resultados, conjuntamente, indicam que a libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY ocorre através da activação das MAPK de uma forma independente da via NO-GMPc e da PKC.

O papel do NO como activador da PKC foi anteriormente demonstrado noutros sistemas, nomeadamente em modelos de coração, onde o NO activa a PKC^[281, 375]. Outros estudos sugerem que o NO funciona como um mediador intracelular da activação do receptor Y_1 . Em ratos modelos de isquémia-reperfusão, quando o NPY é injectado i.c.v. ocorre um aumento dos neurónios marcados positivamente para a nNOS, um aumento da actividade da nNOS e da produção de NO^[85, 86]. Estes efeitos

foram inibidos na presença do antagonista do receptor Y₁, o BIBP 3226^[85, 86]. Este papel do NO como modulador dos efeitos do NPY foi ainda demonstrado noutro estudo em que o NPY tem um efeito vasodilatador através da activação do receptor Y₁, e este efeito é inibido na presença da L-NAME^[341]. Finalmente, outros estudos demonstram uma relação entre a produção de NO e a libertação de catecolaminas pelas células cromafins. Na verdade, em células cromafins bovinas e de truta-francesa o NO activa a GC e funciona como um modulador da libertação de catecolaminas^[308, 358, 359, 482].

Como conclusão final, nas células cromafins de murganho, o NPY estimula a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y₁, de uma forma dependente de Ca²⁺, através da activação das MAPK e ainda através da produção do NO. Neste modelo, o NO funciona como o mensageiro intracelular responsável pela activação da GC e da PKC (Figura 3.5).

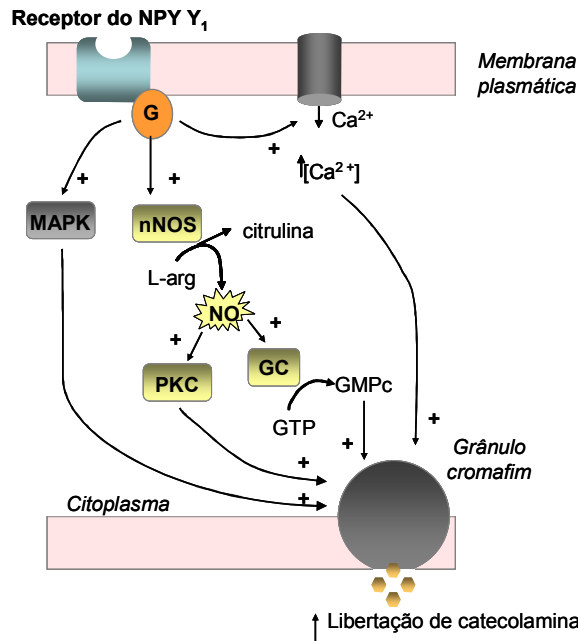


Figura 3.5 - As vias de sinalização intracelular acopladas à activação do receptor Y₁ e à estimulação da libertação de catecolaminas pelas células cromafins de murganho.

Quando o receptor Y₁ é activado há um aumento da [Ca²⁺]_i e uma activação das MAPK estimulando a libertação de catecolaminas. Por outro lado, a activação do receptor Y₁ vai ainda activar a produção de NO que, por um lado, activa a PKC e, por outro, activa a GC, sendo estes factores que regulam a excitose

Capítulo 4

O receptor Y_1 e a síntese de catecolaminas: regulação do promotor da hidroxilase da tirosina

4.1 Introdução

O efeito do NPY nas células cromafins é ainda controverso, mas como referido no capítulo anterior, nas células cromafins de murganho, o NPY aumenta a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y_1 . Por outro lado, nas células cromafins de murganho isoladas de animais $Y_1^{-/-}$, o NPY não altera a libertação de catecolaminas, o que sugere o envolvimento do receptor Y_1 no efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas das células cromafins de animais controlo^[73] (Figura 4.1). A TH é a enzima limitante na síntese de catecolaminas cuja regulação está dependente da activação de vários locais de ligação dos factores de transcrição, como é o caso de CRE, GRE ou mesmo do AP1^[191, 274, 331], e a sua actividade depende da fosforilação de alguns dos seus resíduos de serina (ver revisões^[124, 270]).

As células isoladas de animais $Y_1^{-/-}$ apresentam o conteúdo intracelular de catecolaminas e a libertação basal de catecolaminas maior do que em animais $Y_1^{+/+}$. Por outro lado, a actividade da TH nas glândulas supra-renais de animais $Y_1^{-/-}$ está aumentada comparativamente com a actividade desta enzima nas glândulas de animais controlo $Y_1^{+/+}$ ^[73] (Figura 4.1). Estas evidências sugerem que o receptor Y_1 poderá regular a enzima TH.

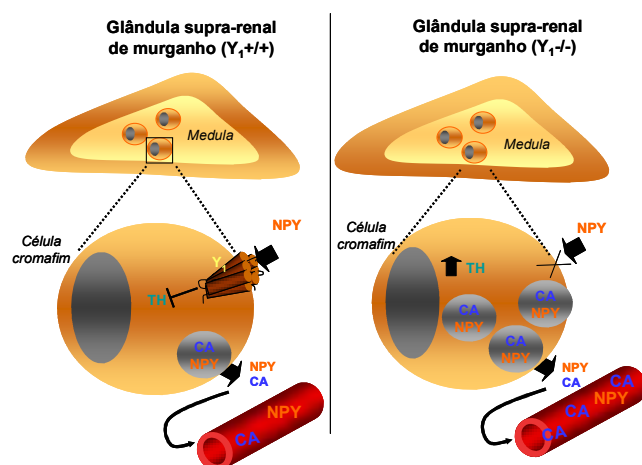


Figura 4.1 - Representação esquemática do efeito no NPY células cromafins de animais que não possuem o receptor Y_1 ($Y_1^{-/-}$) e animais normais ($Y_1^{+/+}$).

As células cromafins dos animais knock-out $Y_1^{-/-}$ libertam mais catecolaminas e a actividade da TH é maior comparado com os animais controlo $Y_1^{+/+}$. (esquema baseado nos resultados da publicação^[73]).

Assim, os objectivos deste capítulo foram: 1) avaliar se ocorre uma interacção molecular entre a TH e o receptor Y_1 ; 2) investigar possíveis cinases envolvidas na activação do promotor da TH pela activação do receptor Y_1 . Para isso, transfectou-se uma linha celular derivada de neuroblastoma, SK-N-MC, que apenas expressa o receptor Y_1 do NPY^[147, 264, 423, 476] com um plasmídeo que possui uma região do promotor da TH acoplado ao gene da luciferase. Este fragmento contém a maioria dos locais de ligação dos factores de transcrição, incluindo o AP1, o GRE e o CRE, que, como já foi referido, são importantes reguladores da transcrição de TH^[273]. A actividade da luciferase foi medida pela intensidade de luz emitada aquando da adição do substrato da enzima da luciferase, a luciferina. A actividade de luciferase traduz a activação do promotor da TH (ver Capítulo 2 – Material e Métodos).

4.2 Resultados

4.2.1 O NPY, activando o receptor Y_1 , regula o efeito da forskolina na activação do promotor da TH

A linha celular SK-N-MC, depois de transfectada com o promotor do gene da TH acoplado ao gene da luciferase, foi incubada durante 6 h com diferentes concentrações de forskolina. A forskolina aumentou a actividade da luciferase, devido à activação do promotor da TH, de uma forma dependente da concentração ($CE_{50} = 1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$) (Figura 4.2).

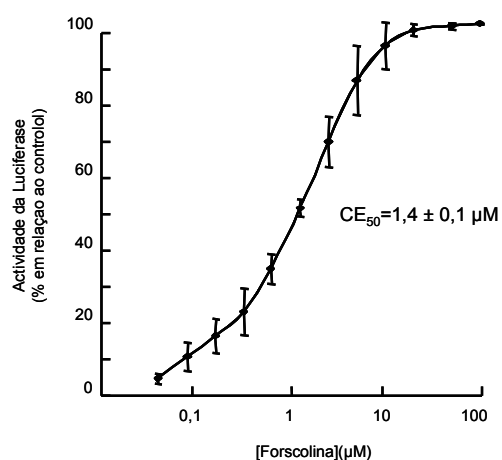


Figura 4.2 - Activação do promotor da TH pela forscolina.

As células SK-N-MC foram transfectadas com um plasmídeo que contém o gene da luciferase sob o controlo do promotor do gene da TH e incubadas 6 horas na presença das concentrações de forscolina indicadas. n=4-5

O NPY inibiu o efeito estimulador da forscolina de uma forma dependente da concentração, com $CI_{50}=1,5\pm 0,5$ nM (Figura 4.3). O antagonista do receptor Y_1 (BIBP 3226, 1 µM) inibiu este efeito do NPY (Figura 4.3 B). Para avaliar o efeito inibitório do NPY ao longo do tempo, incubaram-se as células SK-N-MC com NPY durante diferentes tempos de incubação, antes e depois da estimulação com a forscolina (Figura 4.3 C). Verificou-se que a incubação das células com NPY 16 h antes da estimulação com a forscolina diminuiu 27,7±1,9 % actividade da luciferase. Para tempos de incubação de 1 h antes da incubação e 30 minutos depois com a forscolina, o NPY inibiu em cerca de 70 % o efeito estimulador da forscolina (Figura 4.3 C).

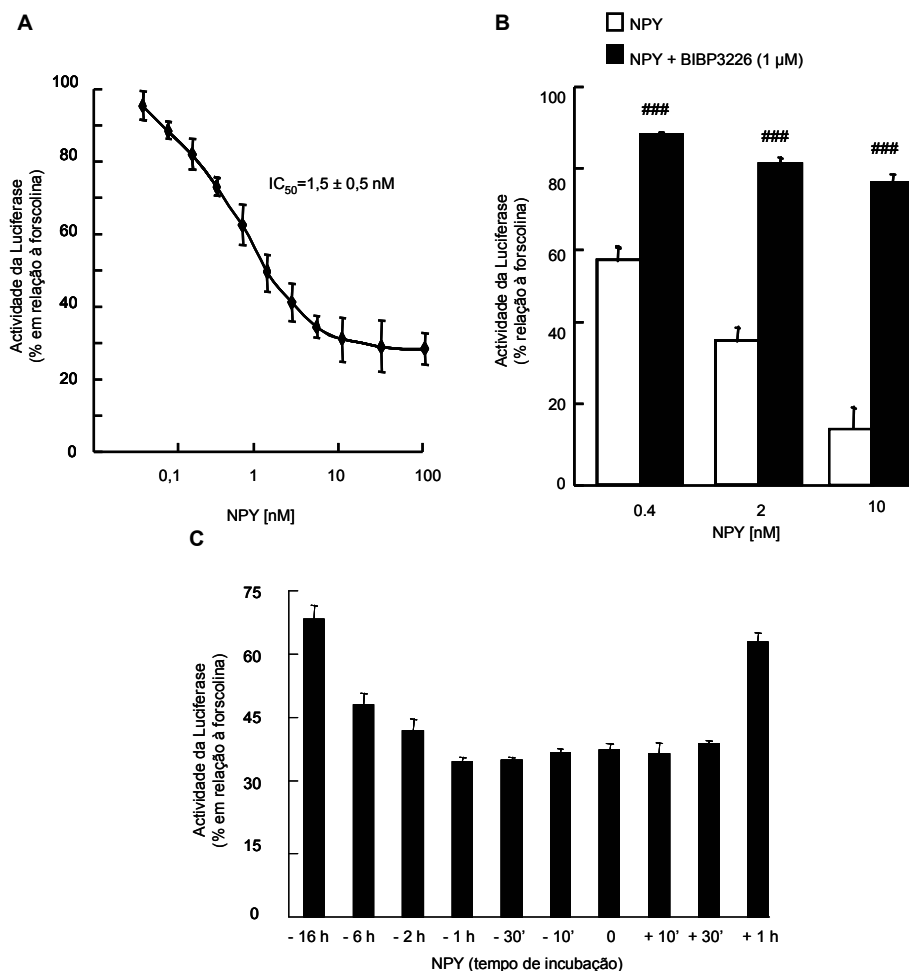


Figura 4.3 - Inibição da actividade do promotor da TH pela activação do receptor Y_1 .

As células SK-N-MC foram transfectadas com um plasmídeo que contém o gene da luciferase sob o controlo do promotor do gene da TH. **A)** as células foram incubadas durante 10 minutos com diferentes concentrações de NPY e estimuladas durante 6 h com forskolina (1,25 μ M). **B)** o efeito do antagonista do receptor Y_1 , BIBP 3226 (1 μ M), no efeito inibitório do NPY na activação da luciferase pela forskolina; **C)** Efeito do NPY (1,2 nM) antes e depois da incubação com a forskolina. ### $p < 0.001$ em relação ao efeito do NPY (ANOVA de uma via, teste de *Dunnet*)

4.2.2 O papel da PKA na activação do promotor da TH

O papel da PKA e da PKC na activação do promotor da TH foi avaliado utilizando um inibidor da PKA (H89) e um inibidor da PKC (Calfostina, CalC). Ambos os compostos inibiram actividade da luciferase, conseqüentemente a activação do

promotor da TH: CI_{50} (H89)= $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e CI_{50} (CalC)= $860 \pm 0,1 \text{ nM}$ (Figura 4.4 A, B). Verificou-se que o H89 ($2 \mu\text{M}$) inibiu a activação da luciferase em $57,8 \pm 1,7 \%$ e que a CalC (50 nM) não teve um efeito significativo (Figura 4.4 C). Quando os dois inibidores foram usados em conjunto verificou-se que não existiu um efeito inibitório aditivo estatisticamente significativo (Figura 4.4 C).

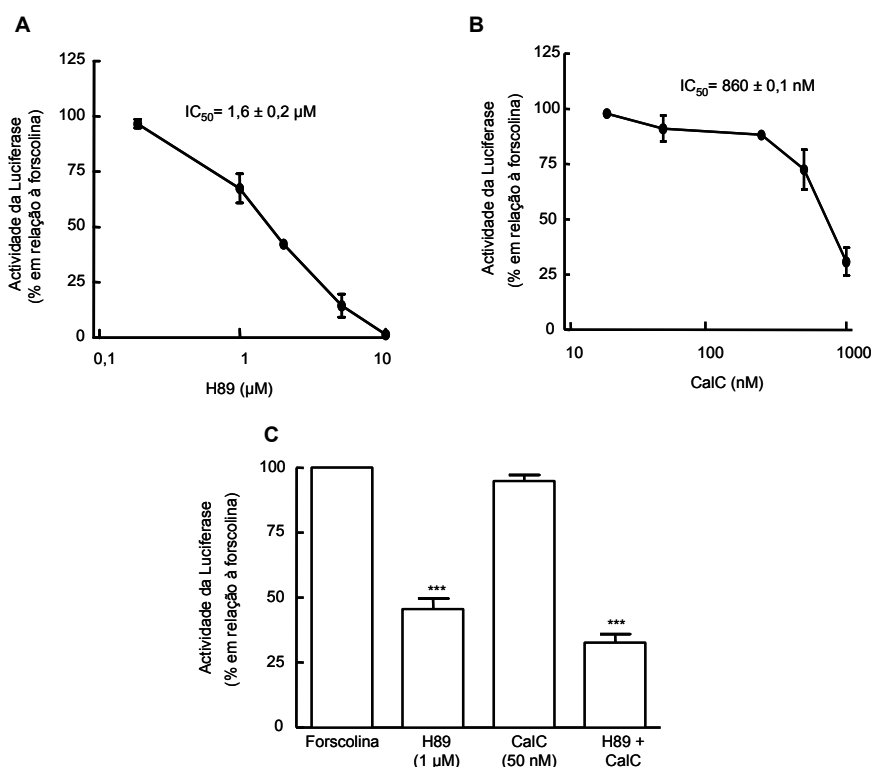


Figura 4.4 - Efeito da inibição da PKA ou da PKC na activação do gene do promotor da TH pela forskolina.

A) As células foram incubadas com forskolina ($1,25 \mu\text{M}$) na presença do inibidor da PKA (H89); ou **B)** na presença do inibidor da PKC (CalC); **C)** as células foram incubadas com forskolina na presença de CalC (50 nM) ou H89 ($2 \mu\text{M}$) ou os dois inibidores em conjunto. *** $p < 0,001$ em relação à forskolina (ANOVA de uma via, teste de *Dunnett*).

O efeito inibitório do NPY não foi alterado pelo inibidor da PKA (H89) (Figura 4.5). Contrariamente, o NPY induziu uma inibição da activação do promotor da TH na presença do inibidor da PKC (CalC, 50 nM), que por si só não produziu qualquer efeito (Figura 4.5).

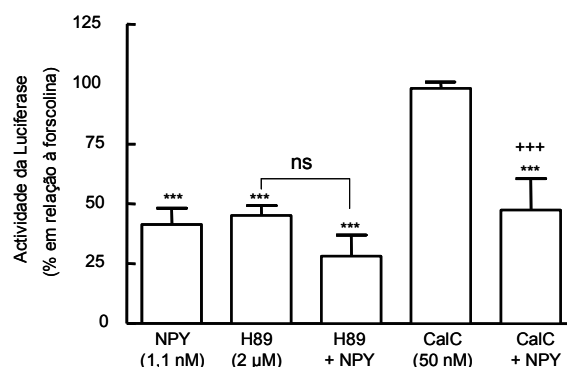


Figura 4.5 - O efeito inibitório do NPY é mediado pela PKA.

As células foram incubadas com o inibidor da PKA (H89, 2 μM) ou com o inibidor da PKC (Calfostina, CalC, 50 nM) na presença ou ausência de NPY (1,1 nM); *** p<0.001 em comparação com a forskolina; ns - não significativo; +++p<0,001 comparando com CalC (50 nM). ANOVA de uma via, teste de *Bonferroni*

4.2 Discussão

Os resultados deste capítulo mostram que em células que expressam o receptor Y_1 , as células SK-N-MC, a activação do receptor Y_1 diminui a actividade do promotor da TH.

A forskolina ao activar a adenilciclase contribui para o aumento da concentração intracelular de AMPc, que é o mensageiro intracelular responsável pela activação de cinases como a PKA. Esta cinase vai fosforilar CREB que, por sua vez, fosforila CRE^[393, 419], e o resultado final é uma activação ou inibição de determinados genes. O promotor da TH contém locais de ligação para os factores de transcrição, como o AP1, o GRE e o CRE^[273]. No nosso modelo experimental, quando se activa o promotor da TH ocorre um aumento da transcrição do gene acoplado a este promotor, neste caso a expressão da luciferase. Deste modo, a medição da actividade de luciferase permite a medição, de uma forma indirecta, da actividade do promotor da TH.

Neste capítulo, verificou-se que a activação do receptor Y_1 inibe a activação do promotor da TH pela forskolina. O papel do receptor Y_1 na expressão da TH foi sugerido noutros trabalhos: a administração do agonista do receptor Y_1 aumenta o RNAm e os níveis proteicos da TH na glândula supra-renal de rato^[141, 212]. O papel

regulador do NPY na síntese de catecolaminas foi ainda estudado usando animais “knock-out” para a TH e os autores verificaram que as glândulas supra-renais destes animais apresentavam maior quantidade de RNAm para o NPY comparativamente às células cromafins de animais controlo^[50]. Por outro lado, resultados obtidos no nosso laboratório em colaboração com o Department of Pharmacology, Drug Development and Therapeutics Itäinen Pitkätatu, Turku (Finlândia) mostram que animais transgênicos que sobreexpressam o NPY apresentam uma maior concentração plasmática de catecolaminas e uma menor quantidade de catecolaminas na glândula supra-renal. Estes resultados sugerem mais uma vez um papel regulador do NPY no conteúdo de catecolaminas a nível da glândula supra-renal. Além disso, o papel do NPY na fosforilação de CREB e a activação do CRE, já foi investigado em neurónios de hipocampo de rato^[422].

Estes dados são concordantes com os resultados apresentados neste capítulo, em que verificámos que o NPY tem um efeito inibidor na activação do promotor da TH pela forskolina, sugerindo a existência de uma interacção molecular entre o receptor Y₁ e o promotor da TH, possivelmente a nível do CRE. Estes resultados podem ainda explicar o aumento no conteúdo intracelular de catecolaminas observada nos animais “knock-out” Y₁^{-/-} comparativamente aos animais controlo Y₁^{+/+}^[73], uma vez que a ausência do receptor Y₁ poderá resultar numa ausência do efeito inibitório do promotor da TH. Assim, estes resultados indicam que o NPY, além do seu papel no controlo da libertação de catecolaminas, também regula a síntese de NA e AD, actuando directamente na TH.

Quando as células foram incubadas com NPY um hora depois de estimuladas com forskolina, o efeito inibitório do NPY na activação do promotor da TH pela forskolina diminui em comparação com uma pré-incubação, o que poderá estar relacionado com a activação constitutiva de cinases endógenas, como por exemplo as MAPK, que fosforilam CREB de modo a manter a fosforilação basal de CRE^[112, 504].

Nas células SK-N-MC a internalização do receptor Y₁ ocorre após um curto período de tempo de exposição ao NPY^[147], impedindo a dessensibilização do receptor Y₁.

Este fenómeno foi sugerido como consequência de uma internalização do receptor do receptor Y₁ e portanto, funciona como um mecanismo adaptativo para impedir uma estimulação/inibição excessiva^[166], podendo ainda explicar a ligeira diminuição

da activação do promotor da TH pela forskolina quando as células foram incubadas 16 h antes com NPY.

O aumento da transcrição da TH está associado à activação dos locais de reconhecimento de factores de transcrição que estão no promotor da TH. Tal como descrevemos neste capítulo, outros autores referem a PKA como uma das principais cinases envolvidas na transcrição do gene da TH^[73, 274, 336]. Por outro lado, diversos trabalhos também demonstram que a PKC regula a expressão da TH^[168, 215, 374, 486]. No entanto, verificamos que o inibidor da PKC, nas concentrações usadas que não produzem morte celular, não alterou significativamente nem o efeito estimulador da forskolina nem o efeito inibidor do NPY. Esta ausência de efeito do inibidor da PKC sugere que a forskolina não activa as vias de transdução de sinal mediadas por PKC e, portanto, as vias PKA e PKC actuam em duas vias independentes na activação do gene da TH.

Em conclusão, o aumento do conteúdo intracelular de catecolaminas e o aumento da libertação basal de catecolaminas observado nas glândula supra-renais de animais $Y_1^{-/-}$ é, em parte, explicado pela interacção molecular que existe entre o receptor Y_1 e o promotor da TH. Assim, o receptor Y_1 tem um importante efeito regulador no conteúdo intracelular de catecolaminas actuando a nível do processo de exocitose e, por outro lado, actuando directamente na regulação do promotor da enzima da síntese de catecolaminas, a TH.

**O receptor Y_1 e a síntese de catecolaminas:
 ___regulação do promotor da hidroxilase da tirosina**

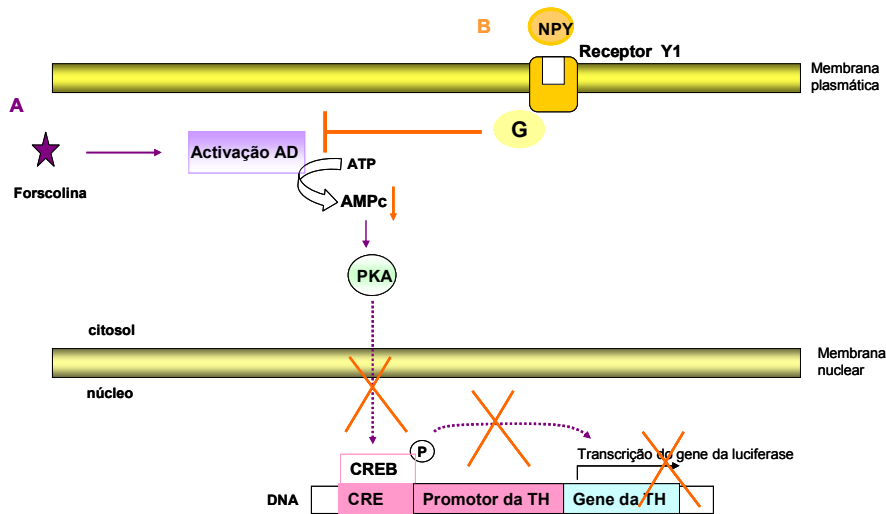


Figura 4.6 - Representação esquemática do efeito da activação do receptor Y_1 no promotor da TH.

A) a forscolina é um activador da adenilciclase (AD). O aumento do AMPc vai activar a PKA, cinase capaz de fosforilar a proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB), que activa o local de reconhecimento de CREB, CRE, que se encontra no promotor da TH. Assim, ocorre a activação da transcrição da TH. **B)** quando o receptor Y_1 do NPY é activado há uma inibição da acumulação do AMPc estimulado pela forscolina. Assim CREB não é fosforilado e não ocorre a activação do promotor da TH. A transcrição do gene da TH é deste modo inibida.

Capítulo 5

**O neuropeptídeo Y regula a liberação de catecolaminas
pelas células cromafins de murganho quando
estimuladas por interleucina-1 β**

5.1 Introdução

A activação do eixo hipotálamo-glândula pituitária-suprarrenal (HPA) induz uma libertação de hormonas adrenocorticotróficas e glucocorticóides que modulam a resposta do sistema imunitário em situações patológicas ou de stresse^[49, 138]. As catecolaminas e os neuropeptídeos podem regular o sistema imunitário^[8, 440]. As concentrações de IL-1 β em circulação são normalmente baixas, mas podem aumentar significativamente chegando a quantidades de ordem dos pg/ml em situações patológicas como em caso de infecção, stresse, artrite reumatóide ou hipertensão^[68, 125, 382]. A presença da IL-1 β já foi demonstrada em células cromafins noradrenérgicas de rato e de murganho^[411, 412]. O papel da IL-1 β nas células cromafins bovinas e de rato são ainda controversas, alguns estudos sugerem que a IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas^[188, 507], outro refere que a IL-1 β inibe a libertação de catecolaminas estimuladas com a acetilcolina^[326]. As citocinas regulam a biossíntese e a libertação de neuropeptídeos das células cromafins bovinas^[5]. Estes resultados sugerem que as citocinas poderão ter um papel importante na regulação da medula da glândula supra-renal. Sabe-se ainda que o NPY é sintetizado e libertado das células cromafins de murganho e humanas^[73, 76], mas não foi ainda investigado a função das citocinas na libertação de NPY.

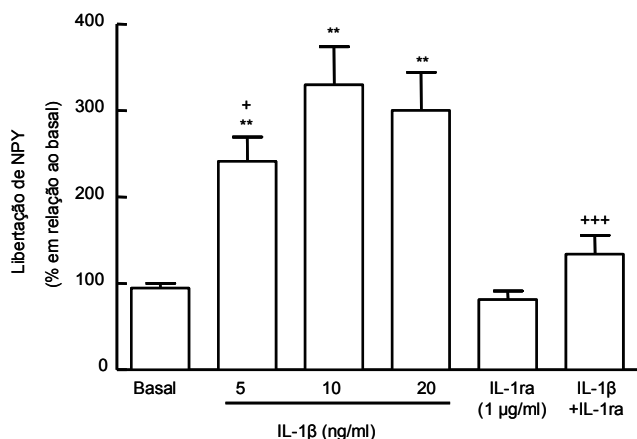
Assim, os objectivos deste capítulo são: 1) avaliar o papel da IL-1 β na libertação de catecolaminas (NA e AD) e do NPY pelas células cromafins de murganho; 2) estudar o papel do NPY endógeno na libertação de catecolaminas quando as células cromafins de murganho são estimuladas pela IL-1 β .

5.2 Resultados

5.2.1 A IL-1 β aumenta a libertação de NPY nas células cromafins de murganho

As células cromafins de murganho foram incubadas com IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml) e observou-se um aumento da libertação de NPY (Figura 5.1). A IL-1 β (10 ng/ml) induziu um aumento de $3,3 \pm 0,4$ vezes na libertação de NPY relativamente à sua libertação basal (Figura 5.1). Para avaliar a especificidade do efeito da IL-1 β , pré-incubaram-se as células durante 30 minutos com o antagonista do receptor (IL-1ra),

e, em seguida, as células foram incubadas com IL-1ra na presença ou ausência de IL-1 β . O IL-1ra diminuiu significativamente a liberação de catecolaminas estimulada pela IL-1 β (Figura 5.1). O IL-1ra não alterou a liberação basal de NPY (Figura 5.1)



5.1 - Efeito da IL-1 β na liberação de NPY das células cromafins de murganho.

As células foram incubadas durante 10 minutos com Tampão de Krebs (libertação basal) ou com Tampão Krebs na presença de IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml). Para avaliar o efeito do antagonista do receptor da IL-1 β (IL-1ra), as células foram pré-incubadas durante 30 minutos com IL-1ra (1 μ g/ml) e 10 minutos na presença ou ausência de IL-1 β (10 ng/ml). A liberação de NPY foi quantificada pelo método de ELISA, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de liberação em relação à liberação basal. Média \pm SEM, 3-8 experiências de culturas primárias de células cromafins de murganho, condição em triplicado. ** p <0,01 comparado com a liberação basal; + p <0,05 e +++ p <0,001 comparado com IL-1 β (10 ng/ml).

5.2.2 A IL-1 β aumenta a liberação de catecolaminas (NA e AD): efeito regulado pelo NPY

A incubação das células cromafins de murganho com IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml) induziu um aumento da liberação de catecolaminas (Figura 5.2). Quando as células foram pré-incubadas com IL-1ra (1 μ g/ml) observou-se uma inibição da liberação de catecolaminas em comparação com o efeito da IL-1 β (10 ng/ml) (Figura 5.2). O IL-1ra não alterou a liberação basal de catecolaminas (resultados não apresentados). A IL-1 β nas concentrações de 10 e 20 ng/ml provocou um maior aumento na liberação de NA do que na liberação de AD (Figura 5.2).

Para avaliar o papel do NPY na liberação de catecolaminas estimulada pela IL-1 β , incubaram-se as células com o anticorpo monoclonal anti-NPY (NPY05, 6 μ g/ml).

Este anticorpo liga-se ao grupo carboxílico do NPY, fracção responsável pela bioactividade do receptor NPY Y₁, Y₂ e Y₅^[181].

A imunoneutralização do NPY diminuiu em 74,7 \pm 13,7 % e 61,6 \pm 7,6 % a liberação de NA e AD, respectivamente, quando as células cromafins de murganho foram estimuladas por IL-1 β (Figura 5.2). O antagonista do receptor Y₁ (BIBP 3226, 1 μ M), inibiu o efeito da IL-1 β em 58,0 \pm 9,2 % e 94,7 \pm 6,5 % na liberação de NA e AD, respectivamente (Figura 5.2).

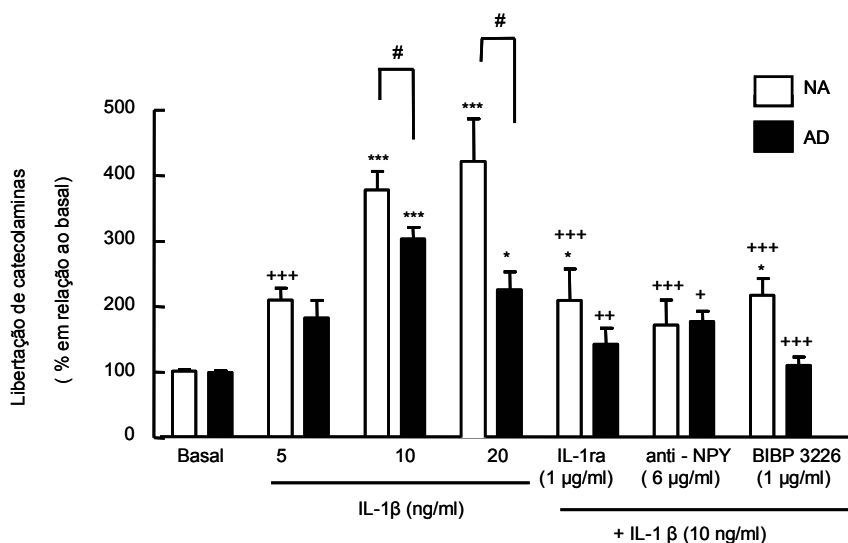


Figura 5.2 - O efeito estimulador da IL-1 β na liberação de catecolaminas (NA e AD) das células cromafins de murganho é inibido pelo antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), pelo anticorpo anti-NPY e pelo antagonista do receptor Y₁ (BIBP 3226).

As células foram incubadas durante 10 minutos com o Tampão Krebs (libertação basal) ou com Tampão Krebs na presença de IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml). As células cromafins de murganho foram pré-incubadas durante 30 minutos com IL-1ra (1 μ g/ml), com o anticorpo anti-NPY (NPY05, 6 μ g/ml) ou com o antagonista do receptor Y₁ (BIBP 3226, 1 μ M) e 10 minutos na presença dos referidos fármacos na presença de IL-1 β (10 ng/ml). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de liberação em relação à liberação basal. Média \pm SEM, 3-8 experiências de culturas de células cromafins de murganho; cada condição foi realizada em triplicado. * p <0,05 e *** p <0,001 comparado com a liberação basal; + p <0,05, ++ p <0,01 e +++ p <0,001 comparado com IL-1 β (10 ng/ml); # p <0,05 comparando com a liberação de NA. ANOVA de duas vias, *post-hoc*

O efeito da IL-1 β na liberação de catecolaminas ao longo do tempo avaliou-se através de experiências de perfusão. Como se pode observar na Figura 5.3, a IL-1 β (10 ng/ml) aumentou a liberação de catecolaminas, ocorrendo um aumento de 10,1 \pm 2,2 e 3,3 \pm 0,4 vezes da área debaixo da curva (AUC/10 minutos de liberação

de catecolaminas) de libertação de NA e AD (Figura 5.3). A libertação máxima de NA e AD foi atingida ao minuto 17, o que significa 5 minutos depois de aplicado o estímulo, 10ng/ml IL-1 β , nas células cromafins de murganho. Após a remoção da IL-1 β , os níveis de libertação de catecolaminas regressaram para valores basais de libertação. Esta observação permite excluir a possibilidade de toxicidade da IL-1 β na viabilidade das células cromafins de murganho.

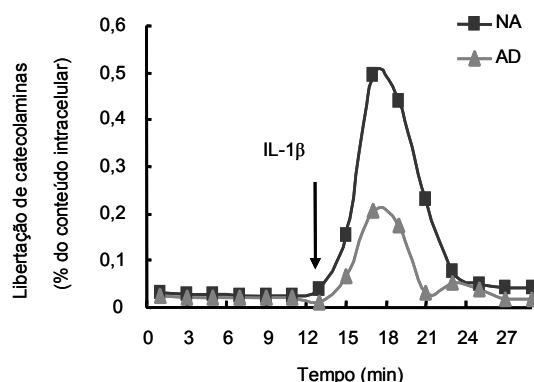


Figura 5.3 – Efeito da IL-1 β na libertação de catecolaminas (NA e AD), ao longo do tempo, pelas células cromafins de murganho usando um sistema de perfusão.

As células cromafins de murganho foram perfundidas a 0,7 ml/minuto, como descrito no capítulo 2, com Tampão Krebs e em seguida com o Tampão Krebs com IL-1 β (10 ng/ml) durante 10 minutos. As fracções para a quantificação de catecolaminas foram recolhidas a cada 2 minutos. A libertação de NA e AD foi expressa relativamente ao conteúdo intracelular; experiência representativa de 3 experiências independentes. As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos (capítulo 2). Os resultados são expressos como a percentagem de libertação em relação ao conteúdo intracelular.

5.3 Discussão

Neste capítulo, demonstrou-se que um período curto de incubação (5 a 10 minutos) é suficiente para a IL-1 β estimular a libertação de NPY e de catecolaminas das células cromafins de murganho. O facto do IL-1ra inibir o efeito estimulador da IL-1 β demonstra que o efeito da IL-1 β é específico e que ocorre através da ligação ao receptor da IL-1 β (IL-1RI). Ao usar o sistema de perfusão, foi possível demonstrar que a IL-1 β tem um efeito rápido na libertação de catecolaminas nas células cromafins de murganho. É interessante salientar que a IL-1 β provocou um maior aumento da libertação de NA do que na libertação de AD. Este efeito diferencial na

libertação das duas catecolaminas das células cromafins já foi observado quando as células são estimuladas com outros segretagogos como a nicotina ou o KCl^[75, 262, 456]. Esta diferença na resposta na libertação de catecolaminas em resposta à IL-1 β poderá estar relacionado com diferenças do número de receptores para a IL-1 β entre células adrenérgicas e células noradrenérgicas. Por outro lado, segundo Kuwaishima *et al.* (2000), estas diferenças poderão estar associadas a diferenças na maquinaria de segregação entre células noradrenérgicas e adrenérgicas^[262].

A presença de IL-1 β nas células cromafins já foi observada em várias espécies como no rato, no murganho e no homem^[170]. Além disso, a síntese de IL-1 β na supra-renal é sugerida pela detecção de RNAm em células cromafins normais e tumorais^[46, 170]. Assim, estes dados sugerem que a IL-1 β libertada pelas células cromafins poderá ter um efeito autócrino na libertação de catecolaminas. No entanto, neste capítulo observou-se que o IL-1ra por si só não alterou a libertação de NPY nem de catecolaminas sugerindo que a IL-1 β libertada endogenamente não tem um efeito autócrino e/ou parácrino na libertação basal de catecolaminas das células cromafins de murganho. Ou, por outro lado, a libertação de IL-1 β nas condições experimentais utilizadas não é suficiente para induzir um aumento de libertação de catecolaminas e de NPY.

Apesar dos níveis circulantes de IL-1 β serem normalmente baixos, podem aumentar em condições de infecção, de stresse ou hipertensão^[67, 125]. Assim, nestas condições patológicas o aumento da IL-1 β poderá levar a um aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas. Assim, pode sugerir-se que a IL-1 β é um importante regulador da concentração plasmática de catecolaminas em condições patológicas. Este aumento de catecolaminas na corrente sanguínea levará à activação de receptores adrenérgicos que resultam na vasoconstrição, no aumento da pressão sanguínea e na resistência vascular periférica, que poderá agravar as condições patológicas do indivíduo^[88].

Neste capítulo demonstrou-se, ainda, que a IL-1 β aumenta a libertação de NPY das células cromafins de murganho. Outro estudo descreve que IL-1 β modula a síntese e a libertação de neuropeptídeos nas células cromafins de bovino. Assim, a IL-1 β aumenta a síntese da substância P na presença de forskolina^[143], aumenta os níveis do RNAm do VIP, galanina e secretogranina II e a libertação da secretoneurina das

células cromafins bovinas^[68]. Por outro lado, foi igualmente demonstrado que o NPY é um modulador do sistema imunitário, uma vez que estimula a produção de histamina pelos mastócitos, a adesão de leucócitos, a agregação de plaquetas, a activação dos macrófagos e, ainda, potencia a acção das catecolaminas nas respostas imunitárias^[36]. Neste capítulo, demonstramos que o NPY induz a libertação de catecolaminas das células cromafins de murganho através do receptor Y_1 , e que a imunoneutralização do NPY inibiu o efeito estimulatório da IL-1 β na libertação de catecolaminas. Estes resultados sugerem que o papel estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas é regulado pelo NPY através da activação do receptor NPY Y_1 . Assim, quando a IL-1 β aumenta a libertação de catecolaminas e de NPY, este peptídeo, por sua vez, tem um efeito adicional na estimulação da libertação de catecolaminas ocorrendo um *feedback* positivo (Figura 5.4). Deste modo, o NPY poderá ter um papel regulador importante entre o sistema imunitário e a glândula supra-renal em especial em condições fisiopatológicas em que ocorre um aumento da IL-1 β circulante, como em situações de sepsia, stresse e hipertensão.

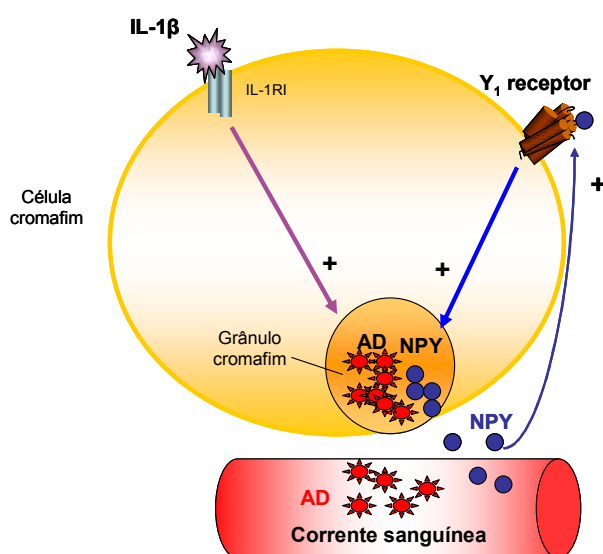


Figura 5.4 - Representação esquemática do efeito regulador do NPY na libertação de adrenalina (AD) pelas células cromafins adrenérgicas de murganho quando estimuladas pela IL- β .

A IL-1 β liga-se ao receptor da IL-1 (IL-1RI) estimula a libertação de AD e do neuropeptídeo Y (NPY). O NPY que é libertado vai ligar-se ao receptor NPY Y_1 que por sua vez, induz um aumento adicional na libertação de AD.

Capítulo 6

A libertação de catecolaminas das células cromafins humanas estimuladas pela interleucina-1 β : papel do neuropeptídeo Y e do monóxido de azoto

6.1 Introdução

Em resposta a diferentes estímulos, como o stresse, ocorre a estimulação do nervo esplâncnico que actua nas células cromafins da medula da supra-renal, e estas libertam catecolaminas para a circulação sanguínea que vão actuar em vários órgãos alvo e mesmo no sistema imunitário^[8, 440]. Os neuropeptídeos e as citocinas são co-libertadas com as catecolaminas das células cromafins ou encontram-se em circulação na corrente sanguínea^[76, 92, 246, 345]. Como já foi referido, a concentração plasmática de IL-1 β aumenta significativamente em certas situações patológicas^[68, 125, 355, 382, 516]. O papel da IL-1 β na libertação de catecolaminas já foi estudado em várias células cromafins não humanas^[17, 189, 326, 411, 507], assim como nas células cromafins de murganho (Capítulo 5). Vários são os mecanismos intracelulares associadas à libertação de catecolaminas pelas células cromafins como é a PKC, a PKA e a MAPK, ou mesmo, o NO, como modulador da libertação basal e estimulada de catecolaminas^[97, 174, 292, 325, 405]. Para além deste papel na libertação de catecolaminas, a IL-1 β está igualmente envolvida na regulação da biossíntese e libertação de neuropeptídeos pelas células cromafins bovinas^[5], mas o efeito das citocinas na libertação de NPY ainda não foi investigado.

A libertação de catecolaminas das células cromafins está dependente da síntese de catecolaminas e, conseqüentemente, com a actividade da TH. Este equilíbrio entre libertação e síntese permite a manutenção do conteúdo intracelular de catecolaminas^[521]. A actividade da TH é regulada por diferente cinases que modificam no seu estado de fosforilação^[270]: PKA, PKC e MAPK^[93, 213, 301, 302].

Assim, os objectivos deste capítulo são: 1) verificar o papel da IL-1 β na libertação e síntese de catecolaminas nas células cromafins humanas; 2) avaliar o papel do NPY na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas estimuladas por IL-1 β ; 3) investigar os mecanismos intracelulares envolvidos no efeito da IL-1 β na libertação de catecolaminas e de NPY nessas células: papel do NO; 4) estudar os mecanismos de sinalização intracelular acoplados ao receptor Y₃ do NPY que estimulam a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas.

6.2 Resultados

6.2.1 A IL-1 β estimula a libertação e a síntese de catecolaminas das células cromafins humanas

A IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml) estimulou a libertação de catecolaminas (NA e AD) das células cromafins humanas (Figura 6.1). Na concentração de 10 ng/ml, a IL-1 β induziu um aumento na libertação de NA e AD de 3,1 \pm 0,3 e 2,6 \pm 0,2 vezes, respectivamente, comparativamente com a libertação basal (Figura 6.1). O IL-1ra (1 μ g/ml) diminuiu significativamente a libertação de catecolaminas (Figura 6.1). O IL-1ra por si só não alterou a libertação basal de catecolaminas (Figura 6.1).

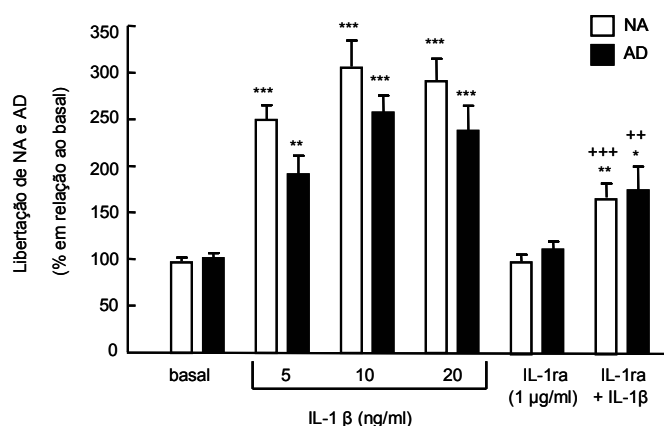


Figura 6.1 - O efeito da IL-1 β na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas.

As células foram incubadas durante 10 minutos com o tampão Krebs (libertação basal), ou com Tampão Krebs com IL-1 β (5, 10, 20 ng/ml). As células foram pré-incubadas durante 30 minutos com IL-1ra (1 μ g/ml) e durante 10 minutos na presença de IL-1 β (10 ng/ml). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3-6 de culturas de células cromafins humanas; cada condição foi realizada em triplicado. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 comparado com a libertação basal; ++ p <0,05, e +++ p <0,001 comparado com IL-1 β (10 ng/ml); ANOVA de duas vias, *post-hoc*

O efeito estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas foi inibido na presença de um inibidor da TH, alfa-metil-para-tirosina (AMPT, 1 μ M) (Figura 6.2 A).

A actividade da TH aumenta em resposta à fosforilação que ocorre nos resíduos específicos da TH localizados no terminal amina, nomeadamente ao nível do

resíduo Ser⁴⁰^[124, 270]. Avaliou-se a fosforilação do resíduo Ser⁴⁰ da TH, por experiências de Western Blot, nas células cromafins humanas com 2, 5 e 10 minutos de estimulação com IL-1 β . Após incubação da IL-1 β durante 2 minutos, observou-se um aumento no nível de fosforilação de $1,4 \pm 0,2$ vezes em relação ao controlo (Figura 6.2). Como controlo positivo, usamos a estimulação das células durante 4 minutos com forskolina $1 \mu\text{M}$ ^[124], onde se observou um aumento da fosforilação de $1,54 \pm 0,13$ vezes em relação a uma situação basal (resultados não apresentados).

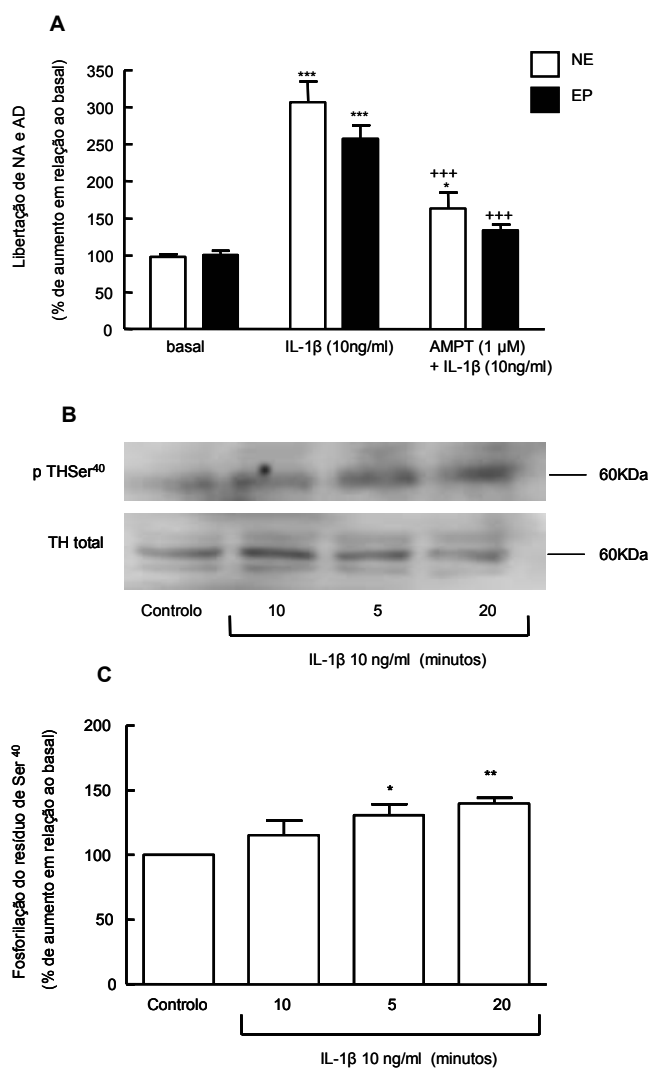


Figura 6.2 - Efeito da inibição da TH na libertação de catecolaminas estimulada pela IL-1 β ; o efeito da IL-1 β na fosforilação da TH.

A) As células foram incubadas durante 10 minutos com um inibidor da TH (AMPT, 1 μ M) na presença de IL-1 β (10 ng/ml). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3 de culturas de células cromafins humanas; cada condição foi realizada em triplicado. * p <0,05 e *** p <0,001 comparado com a libertação basal; +++ p <0,001 comparado com IL-1 β (10 ng/ml); ANOVA de duas vias, *post-hoc*. **B)** Imunoblot dos níveis de fosforilação da TH no resíduo Ser⁴⁰ em relação à proteína total numa situação controlo, forskolina (1 μ M) durante 4 minutos e IL-1 β (10 ng/ml) durante 2, 5 e 10 minutos. **C)** A quantidade de TH fosforilada foi avaliada usando o anticorpo anti-TH e anti-TH fosforilada no resíduo Ser⁴⁰. O nível de fosforilação da TH é expresso pela razão entre o nível de fosforilação no resíduo Ser⁴⁰ e a proteína total. Os resultados são expressos como a percentagem de fosforilação em relação à fosforilação de uma situação controlo (média \pm SEM), 3 - 5 culturas de células de cromafins humanas. * p <0,05 e ** p <0,01 em relação ao controlo.

6.2.2 O NPY endógeno regula a libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β em células cromafins humanas.

A IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml) aumenta a libertação de NPY (Figura 6.3). Na concentração de 10 ng/ml, a IL-1 β induziu um aumento de libertação de NPY de $5,6 \pm 1,4$ vezes comparativamente à libertação basal (Figura 6.3). O IL-1ra (1 μ g/ml) inibiu significativamente a libertação de NPY estimulada pela IL-1 β (10 ng/ml) (Figura 6.3). O IL-1ra não alterou a libertação basal de NPY (Figura 6.3).

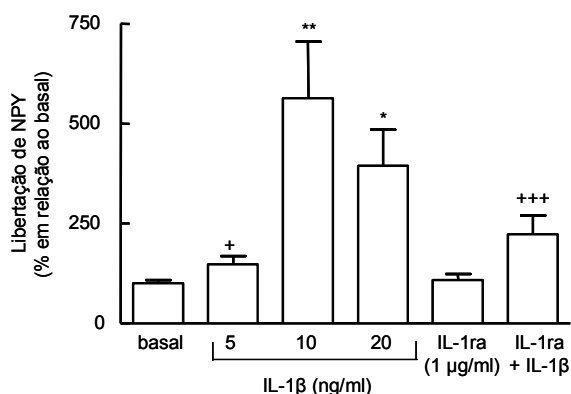


Figura 6.3 - O efeito da IL-1 β na libertação de NPY das células cromafins humanas estimuladas com IL-1 β na libertação de catecolaminas.

As células foram incubadas durante 10 minutos com Tampão Krebs (libertação basal) ou com Krebs com IL-1 β (5, 10 e 20 ng/ml). A libertação de NPY foi quantificada pela técnica de ELISA. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o basal. +++ $p < 0,001$ comparado com IL-1 β (10 ng/ml). ANOVA de uma via, teste de Bonferroni.

O papel do NPY endógeno na libertação de catecolaminas estimuladas por IL-1 β foi avaliado, incubando as células com o anticorpo monoclonal, anti-NPY (NPY05, 6 μ g/ml), que se liga ao terminal carboxílico do NPY que é necessário para a bioactividade do NPY na ligação aos receptores de NPY. A imunoneutralização do NPY diminuiu em $60,4 \pm 7,4$ % e $68,4 \pm 19,8$ % a libertação de NA e AD, respectivamente, estimulada pela IL-1 β (Figura 6.4). A inibição induzida pelo IL-1ra juntamente com o anticorpo anti-NPY não foi significativamente diferente da inibição produzida pelo IL-1ra e pelo anticorpo anti-NPY isoladamente (Figura 6.4).

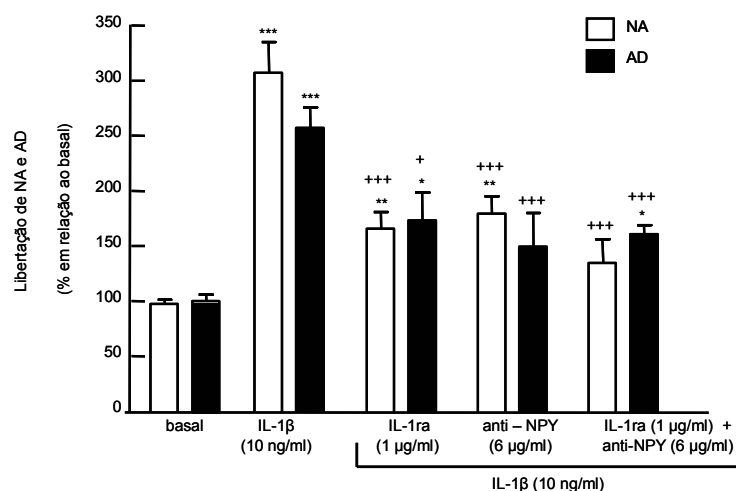


Figura 6.4 O efeito do NPY endógeno na liberação de catecolaminas pelas células cromafins humanas estimuladas por IL-1 β .

As células foram pré-incubadas com o anticorpo anti-NPY (6 μ g/ml) ou com o IL-1ra (1 μ g/ml) e durante 10 minutos com anti-NPY (6 μ g/ml) ou IL-1ra (1 μ g/ml) ou os dois conjuntamente na presença de IL-1 β (10 ng/ml). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de liberação em relação à liberação basal. Média \pm SEM, 3-6 de culturas de células cromafins humanas; cada condição foi realizada em triplicado. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 comparado com a liberação basal; + p <0,05, e +++ p <0,001 comparado com IL-1 β (10 ng/ml). ANOVA de duas vias, *post-hoc*.

6.2.3 O NO e a liberação de catecolaminas nas células cromafins humanas

6.2.3.1 Imunohistoquímica para a TH e nNOS nas células cromafins da medula supra-renal

Realizaram-se cortes de glândulas supra-renais humanas, que foram seccionadas e foram marcadas com o anticorpo anti-TH e com o anticorpo anti-nNOS. Verificou-se que as fatias das glândulas supra-renais apresentavam marcação para a TH na medula (Figura 6.5). Observou-se ainda marcação para nNOS nas células da medula da glândula supra-renal, indicando deste modo a presença de nNOS nas células cromafins humanas (Figura 6.5).

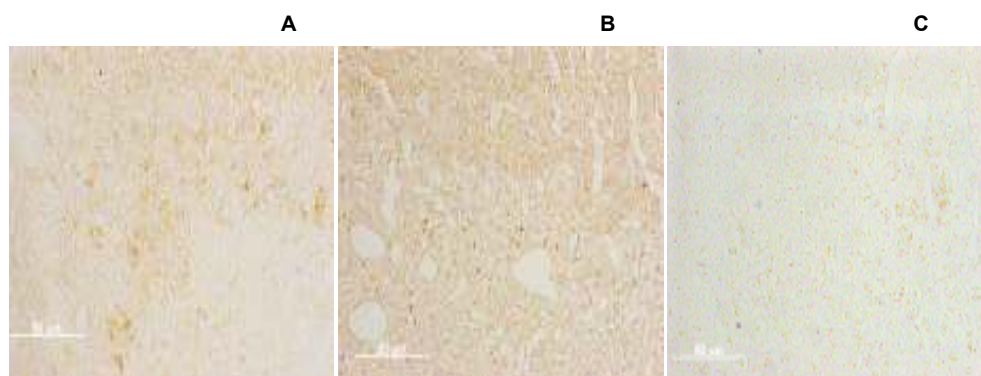


Figura 6.5 - Imunohistoquímica para secções de parafina marcadas para nNOS (A), TH (B) e o C representa o controlo negativo.

As fatias de espessura 3 μ m de espessura foram incubadas com a solução de anticorpo primário contra a TH (1:1000), ou contra a nNOS (1:100) em PBS 0,1 M com 0,5 % de Triton X -100 e NGS (soro normal de cabra) durante noite a 4 °C. Após três lavagens à temperatura ambiente com 0,1 M PBS com 2 % de NGS, as fatias foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com uma solução de imunoglobulinas contra coelho biotiniladas (1:200) e incubadas durante 1 hora com o substrato de peroxidase, DAB. Em seguida, as fatias foram coradas com o sistema de avidina-biotina-peroxidase.

6.2.3.2 Papel do NO na libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β .

O inibidor da NOS, L-NAME (500 μ M), inibiu o efeito estimulador da IL-1 β (Figura 6.6). O efeito do L-NAME por si só não alterou a libertação de catecolaminas (resultados não apresentados). O estereoisómero D-NAME (500 μ M) também não alterou a libertação de catecolaminas (resultados não apresentados). O inibidor selectivo da enzima guanilil-ciclase (GC, ODQ, 50 μ M), diminuiu a libertação de catecolaminas estimuladas por IL-1 β (Figura 6.6). O efeito do NO na libertação de catecolaminas das células cromafins humanas foi avaliado usando um dador externo de NO (NOC-18, 100 μ M). Este aumentou a libertação de NA e AD de 3,3 \pm 0,3 e 2,9 \pm 0,2 vezes (Figura 6.6).

O efeito estimulador do NOC-18 foi completamente inibido na presença de ODQ, sugerindo que a GC é um alvo do NO neste mecanismo intracelular de indução de libertação de catecolaminas das células cromafins humanas.

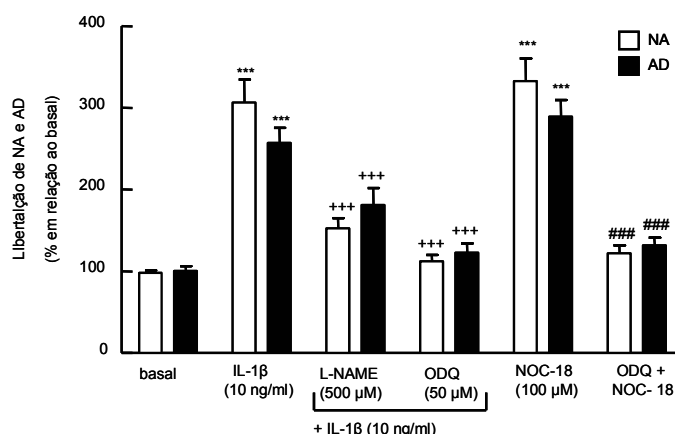


Figura 6.6 - O papel do NO na libertação de catecolaminas de células cromafins humanas.

As células foram incubadas com o inibidor da NOS (L-NAME, 500 μ M) ou com o inibidor da GC (ODQ, 50 μ M) na presença de IL-1 β (10 ng/ml). As células foram ainda incubadas com o dador externo de NO (NOC-18, 100 μ M), na presença ou ausência do inibidor da GC (ODQ, 50 μ M). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de libertação em relação à libertação basal. Média \pm SEM, 3 de culturas de células cromafins humanas; cada condição foi realizada em triplicado. *** $p < 0,001$ comparando com o basal; +++ $p < 0,001$ comparando com IL-1 β (10 ng/ml); ### $p < 0,001$ comparando com NOC-18 (100 μ M). ANOVA de duas vias, *post-hoc*.

6.2.4 Papel das cinases MAPK, PKA e PKC na libertação de catecolaminas estimuladas pela IL- β

Para avaliar o papel das cinases MAPK, PKA e PKC no efeito estimulador da IL-1 β , as células foram pré-incubadas durante 20 minutos com o inibidor das MAPK (PD 98059, 50 μ M), ou da PKA (H89, 1 μ M) ou da PKC (bisindolilmaleimida, 1 μ M), seguido de uma estimulação de 10 minutos com a IL-1 β (10 ng/ml). Na presença dos inibidores das MAPK e do inibidor da PKC, o efeito da IL-1 β foi inibido (Figura 6.7A). O inibidor da PKA não alterou o efeito da IL-1 β (Figura 6.7A). Por outro lado, o efeito estimulador do dador de NO, (NOC-18, 100 μ M), foi inibido apenas na presença do inibidor da PKC (Figura 6.7B). Quando a PKC foi directamente activada pelo éster de forbol (PMA, 200 nM) observou-se um aumento de 3,1 \pm 0,4 e 3,4 \pm 0,4 vezes na libertação de NA e AD, respectivamente, em relação à libertação basal (Figura 6.7 B). O efeito do PMA nas células cromafins humanas não foi

alterado na presença de L-NAME (Figura 6.7 B). Estes resultados sugerem que a PKC é activada pela produção de NO após um estímulo com IL-1 β .

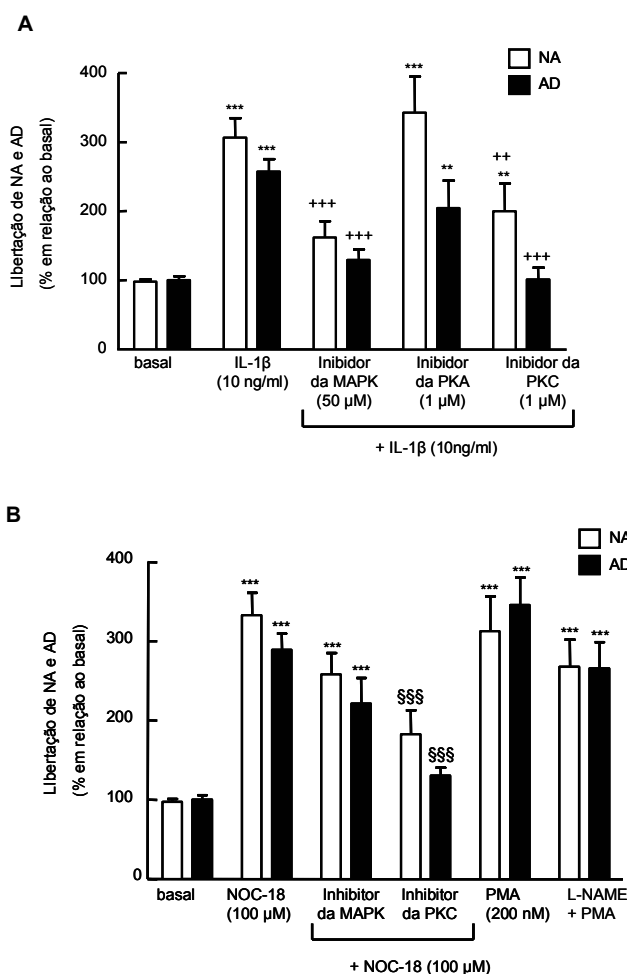


Figura 6.7 - Mecanismos intracelulares envolvidos na liberação de catecolaminas de células cromafins humanas estimuladas com IL-1 β (10 ng/ml).

A) As células foram pré-incubadas durante 30 minutos com o inibidor das MAPK (PD 98059, 50 μ M), ou da PKA (H89, 1 μ M) ou da PKC (bisindolilmaleimida, 1 μ M) e em seguida estimuladas durante 10 minutos com IL-1 β (10 ng/ml) na presença de cada um dos inibidores. **B)** Após pré-incubadas com os inibidores, as células foram incubadas durante 10 minutos com os inibidores das MAPK e da PKC na presença de NOC-18 (100 μ M). As células foram ainda incubadas com o éster de forbol, PMA (200 nM), na presença ou ausência de L-NAME (500 μ M). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de liberação em relação à liberação basal. Média \pm SEM, 3-6 de culturas de células cromafins humanas; cada condição foi realizada em triplicado. ** p <0,01 e *** p <0,001 comparado com o basal; ++ p <0,01 e +++ p <0,001 comparado com IL-1 β (10 ng/ml); §§§ p <0,001 comparado com NOC-18 (100 μ M).

6.2.5 A libertação de catecolaminas estimulada por NPY envolve a via das MAPK e a via PKA/NOS/PKC

Os resultados descritos na secção 6.2.2 mostram que o NPY libertado regula, por um mecanismo desconhecido, a libertação de catecolaminas estimulada por IL-1 β (Figura 6.4). Quando as células cromafins foram pré-incubadas com os inibidores das MAPK, de PKC ou de PKA ocorreu uma diminuição significativa na libertação de catecolaminas estimuladas pelo NPY 100 nM (Figura 6.8 A). Por outro lado, também se verificou que este efeito estimulador do NPY era inibido na presença de L-NAME e de ODQ. Estes dados sugerem que o NO também está envolvido no efeito estimulador do NPY na libertação de catecolaminas (Figura 6.8 A). Uma vez que o envolvimento do NO/PKC já foi descrito na secção anterior (6.2.4), o papel da PKA então também foi estudado. Assim, as células foram estimuladas com NOC-18 na presença de um inibidor da PKA (H89, 1 μ M) e noutra conjunto de experiências, as células foram estimuladas com um activador da PKA (forskolina, 1 μ M) na presença ou ausência de L-NAME. Como resultado final, observou-se que o inibidor da PKA não alterou o efeito do NOC-18 na libertação de catecolaminas, mas o efeito estimulador da forskolina foi inibido na presença de L-NAME, indicando que a activação da NOS é dependente da PKA quando esta é activada pelo NPY (Figura 6.8 B).

A IL-1 β aumenta a liberação de catecolaminas nas células cromafins humanas: papel do NPY e do NO

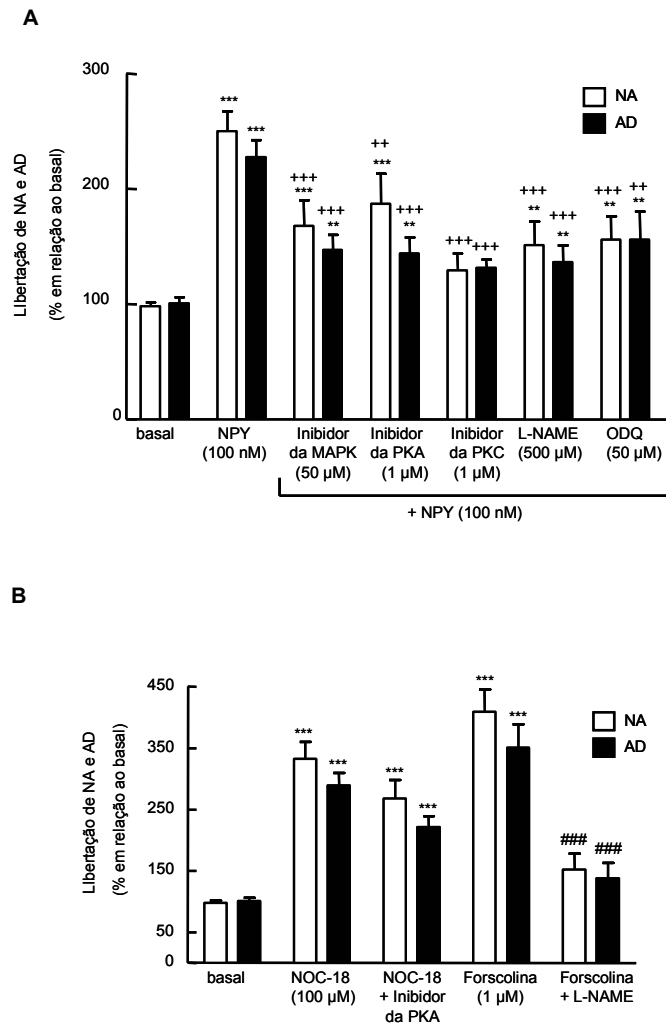


Figura 6.8 - Vias de transdução de sinal acopladas ao receptor do NPY Y_3 que estimula a liberação de catecolaminas das células cromafins humanas

A) As células foram pré-incubadas durante 30 minutos com um inibidor das MAPK (PD 98059, 50 μ M), da PKA (H89, 1 μ M), da PKC (bisindolilmaleimida, 1 μ M) ou inibidor da NOS, (L-NAME 500 μ M). ou da GC (ODQ, 50 μ M) e em seguida estimuladas durante 10 minutos com IL-1 β (10 ng/ml) na presença de cada um dos inibidores. **B)** Após a pré-incubação inibidores da PKA ou L-NAME as células foram incubadas durante 10 minutos com NOC-18 (100 μ M) ou forskolina (1 μ M), respectivamente. As células foram ainda incubadas com o éster de forbol, PMA (200 nM). As catecolaminas foram quantificadas por HPLC, como está descrito no capítulo de Material e Métodos. Os resultados são expressos como a percentagem de liberação em relação à liberação basal. Média \pm SEM, 3-6 de culturas de células cromafins humanas; cada condição foi realizada em triplicado. ** p <0,01 e *** p <0,001 comparado com o basal; ++ p <0,01 e +++ p <0,001 comparado com NPY (100 nM); ### p <0,001 comparado com forskolina (1 μ M).

6.3 Discussão

Neste capítulo foi possível observar que i) a IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas; ii) a IL- β regula a actividade da TH, induzindo a fosforilação do resíduo Ser⁴⁰ da TH; iii) o efeito estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas é dependente da activação da via das MAPK e ainda da produção de NO com a activação da PKC e da GC; iv) a IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas e de NPY que, por sua vez, induz um aumento adicional de catecolaminas activando as mesmas vias que a IL-1 β e através da via PKA-NO (Figura 6.9). Este trabalho, demonstra pela primeira vez, um importante papel regulador do NPY e do NO na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas estimuladas pela IL-1 β .

A IL-1 β aumenta a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas

Neste capítulo observou-se que a IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas (NA e AD) pelas células cromafins humanas e que o IL-1ra inibe este efeito estimulador da IL-1 β , o que demonstra que a IL-1 β se liga ao seu receptor IL-1RI, para exercer o efeito estimulador. O papel da IL-1 β na libertação de catecolaminas já tinha sido descrito em células cromafins não-humanas. Por exemplo, o efeito estimulador da IL-1 β exógena foi descrito em células cromafins bovinas ou de rato que foram previamente incubadas durante 24 h com IL-1 β ^[17, 189, 411, 471]. No capítulo 5, o efeito estimulador da IL-1 β nas células cromafins de murganho foi semelhante ao observado pelas células cromafins humanas. No entanto, outro estudo demonstrou que a IL-1 β inibe a libertação de catecolaminas das células cromafins bovinas por inibição do influxo do Ca²⁺ ^[104]. Nas nossas condições experimentais, o IL-1ra por si só não alterou a libertação não estimulada de catecolaminas, sugerindo que a quantidade de IL-1 β endogenamente produzida não é suficiente para induzir o processo de libertação de catecolaminas. No entanto, sabe-se que em situações de infecção, trauma, stresse ou hipertensão ocorre um aumento na circulação sanguínea de IL-1 β para níveis superiores a 100 ng/ml, mas apenas são necessárias baixas concentrações da IL-1 β (normalmente na ordem de pM) para que os seus receptores sejam activados e ocorra uma resposta^[5, 67, 68, 125, 355, 382, 516].

Assim, os nossos resultados e estas observações referidas sugerem que a IL-1 β regula os níveis plasmáticos de catecolaminas em condições patológicas.

A IL-1 β induz o aumento na síntese de catecolaminas pelas células cromafins humanas

A IL-1 β aumentou a fosforilação do resíduo Ser⁴⁰ após 2 minutos de estimulação com a IL-1 β . Contrariamente a Morita *et al.* (2004), que sugere que a IL-1 β não alterava a síntese de catecolaminas porque não observara qualquer alteração ao nível da razão NA/(NA+AD)^[326], neste capítulo verificou-se que IL-1 β aumentou a fosforilação no resíduo de Ser⁴⁰ da TH, que é um indicador da actividade da enzima de síntese das catecolaminas, a TH. O inibidor da TH, AMPT, inibe o efeito estimulador da IL-1 β . Ambos os resultados indicam que a IL-1 β modula a TH e, portanto, a síntese de catecolaminas. Vários estudos sugerem que em células cromafins a TH pode ser fosforilada envolvendo vários mecanismos como sendo o AMPc^[82, 93, 213], o Ca²⁺^[200, 348, 377], as proteínas cinases dependentes de GMPc^[394] e as MAPK^[462]. A fosforilação da TH aumenta a actividade da TH e, conseqüentemente, a síntese de catecolaminas que, por sua vez, poderá induzir uma libertação de catecolaminas. Ou seja, a homeostase intracelular de catecolaminas nas células cromafins humanas estimuladas com IL-1 β é regulada através de um equilíbrio entre a síntese e a libertação de catecolaminas.

O NO regula a libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β

Neste capítulo demonstrou-se a presença de nNOS nas células cromafins de medula supra-renal humana por imunohistoquímica. A presença de nNOS noutras células cromafins não-humanas já foi demonstrada anteriormente^[358, 359, 411, 482].

Tal como descrito nas células cromafins de murganho (Capítulo 5), neste capítulo observou-se que a libertação de catecolaminas estimulada pela IL-1 β é inibida na presença do inibidor da NOS (L-NAME), sugerindo que o NO regula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas. Os resultados que confirmam a função reguladora do NO na libertação de catecolaminas foi o aumento da libertação de catecolaminas quando estimuladas por um dador externo de NO, o NOC-18. O envolvimento da GC e da produção de GMPc na libertação de

catecolaminas é fortemente sugerido pelo facto do inibidor da GC (ODQ) inibir o efeito estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas. Para além disso, o L-NAME não alterou a libertação basal de catecolaminas. Os resultados sugerem que em condições basais, o NO não regula a libertação de catecolaminas, mas regula, por outro lado, a libertação de catecolaminas estimuladas por IL-1 β . Resultados contraditórios, aos aqui apresentados, estão descritos na literatura, em que diversos trabalhos referem que o NO, em células cromafins não-humanas, tem um efeito inibidor na libertação basal de catecolaminas^[72, 308, 414, 466, 481, 482], bem como um efeito inibidor na libertação de catecolaminas estimuladas por acetilcolina, nicotina ou KC^[308, 358, 359, 473]. Além do NO poder ser produzido pelas próprias células cromafins, o NO pode ser também produzido por outras células, como as células endoteliais e as fibras nervosas que estão em contacto com as células cromafins^[33, 53, 302, 451]. Assim, o NO actuando através de um mecanismo parácrino/autócrino regula a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas.

A IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas através da activação via das MAPK e através da via PKC-NO

Para além da função do NO como mensageiro intracelular, demonstrou-se também que a libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β ocorre pela a activação das vias das MAPK e da PKC. A activação das MAPK pela IL-1 β já foi anteriormente descrita em vários tipos de células (não-cromafins)^[146, 404, 474]. Por outro lado, as MAPK já foram descritas como vias de sinalização intracelulares envolvidas na libertação^[64, 97] e síntese de catecolaminas pelas células cromafins bovinas^[44, 64, 97, 462, 473]. Também se investigou as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito estimulador do NO na libertação de catecolaminas. A libertação de catecolaminas estimuladas por NO foi inibida na presença do inibidor das PKC, mas não pelo inibidor das MAPK. Estes resultados sugerem que a PKC, mas não as MAPK, está envolvida no processo de libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas estimuladas por NOC-18. Além disso, foi ainda observado que o efeito estimulador do activador da PKC, o PMA, não foi inibido na presença de L-NAME. Estes resultados sugerem que a produção de NO é um mecanismo que precede a activação da via da PKC (Figura 6.9). O envolvimento de PKC na libertação de

catecolaminas pelas células cromafins não-humanas já foi descrito anteriormente^[174, 294, 454, 457, 458]. Para além disso, e como também já foi demonstrado em células cromafins de murganho, a activação da PKC pelo NO já foi demonstrado noutros modelos^[375]. A inibição das MAPK induziu uma diminuição na libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β , mas o mesmo não foi observado quando as células cromafins humanas foram estimuladas por um dador de NO, NOC-18, o que poderá sugerir que, nas nossas condições experimentais a activação das MAPK é independente da produção de NO.

Resumindo, nas células cromafins humanas, a IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas através da activação das MAPK e ainda através da produção de NO que, por sua vez, activa a PKC e a GC.

É, ainda, importante referir que todas as vias de sinalização intracelular que foram demonstradas como sendo importantes na regulação da libertação de catecolaminas, estão igualmente relacionadas com o aumento da fosforilação da TH. Assim, está descrito que a pré-incubação das células cromafins com um inibidor das MAPK impede a fosforilação do resíduo Ser³¹ da TH estimuladas pela angiotensina II, acetilcolina, nicotina ou KCl^[44, 97, 179, 462]. Por outro lado, tanto o GMPc como a PKC fosforilam a TH no resíduo Ser⁴⁰^[9, 42, 62, 236, 394]. Deste modo, sugere-se que IL-1 β induz o aumento da libertação de catecolaminas por um mecanismo que também envolve a activação da TH através da via da GC e da PKC.

A IL-1 β estimula a libertação de NPY que, por sua vez, potencia o aumento da libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas

Neste capítulo, observou-se ainda que a IL-1 β estimula a libertação de NPY das células cromafins humanas e que a imunoneutralização do NPY inibiu a libertação de catecolaminas estimuladas pela IL-1 β . Por outro lado, a presença de IL-1ra e do anticorpo anti-NPY inibiram o efeito estimulador da IL-1 β de uma forma semelhante ao IL-1ra e ao anti-NPY separadamente. Assim, estes resultados sugerem que o NPY medeia parcialmente o efeito estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas. Trabalhos anteriores demonstraram que o NPY estimula a libertação de catecolaminas pelas células

cromafins humanas actuando nos receptores do NPY do tipo Y_3 ^[76]. Assim, os resultados aqui apresentados e descritos anteriormente, sugerem que o NPY libertado pela estimulação da IL-1 β actua de uma forma autócrina/paracrina nos receptores NPY Y_3 das células cromafins humanas, contribuindo para o *feedback* positivo, induzindo um aumento adicional de libertação de catecolaminas (Figura 6.9).

As vias de sinalização intracelular envolvidas na libertação de catecolaminas estimulada por NPY

Os inibidores das MAPK, da PKC, da PKA e da NOS diminuíram a libertação de catecolaminas estimulada pelo NPY, o que indica que estas três cinases bem como a produção de NO estão envolvidas na libertação de catecolaminas estimulada por NPY. O envolvimento do GMPc neste mecanismo foi sugerido pela inibição da libertação de catecolaminas na presença de um inibidor da GC, o que é corroborado por outros trabalhos que indicam que o principal alvo do NO é a GC^[293, 414, 482]. Por outro lado, o efeito estimulador do activador da PKA na libertação de catecolaminas foi inibido na presença de L-NAME, o que sugere que a activação da PKA está relacionada com a activação da NOS e, conseqüentemente, com a produção de NO. Assim, sugere-se que o NPY activa a PKA que, por sua vez, activa a NOS, produzindo NO que activa a PKC e a GC (Figura 6.9).

O envolvimento do NO como um regulador das vias de sinalização intracelulares do NPY já foi anteriormente sugerido no hipotálamo de rato^[41]. O papel da PKA como activador da NOS foi igualmente demonstrado noutros modelos celulares^[151, 317].

Conclusão

Em condições normais os níveis plasmáticos de IL-1 β são bastante baixos, no entanto, aumentam em determinadas condições patológicas, como no caso de infecção, trauma, stresse ou hipertensão^[67, 68, 125, 355, 382, 516]. Assim, os resultados deste capítulo sugerem que em condições que ocorra um aumento da concentração plasmática de IL-1 β há um maior aumento na libertação de catecolaminas das glândulas supra-renais. Além disso, nestas situações as células inflamatórias podem produzir um excesso de NO e este pode, igualmente, actuar nas células cromafins humanas activando os mecanismos intracelulares que induzem um

aumento na libertação de catecolaminas. Por outro lado, a IL-1 β estimula a libertação de catecolaminas e de NPY que contribui para um aumento adicional de catecolaminas (Figura 6.9). Este trabalho, sugere que em determinadas situações fisiopatológicas em que os níveis plasmáticos de IL-1 β aumentam, como em situações de stresse ou hipertensão, o NPY funciona como um elemento regulador entre o sistema imunitário e a glândula supra-renal

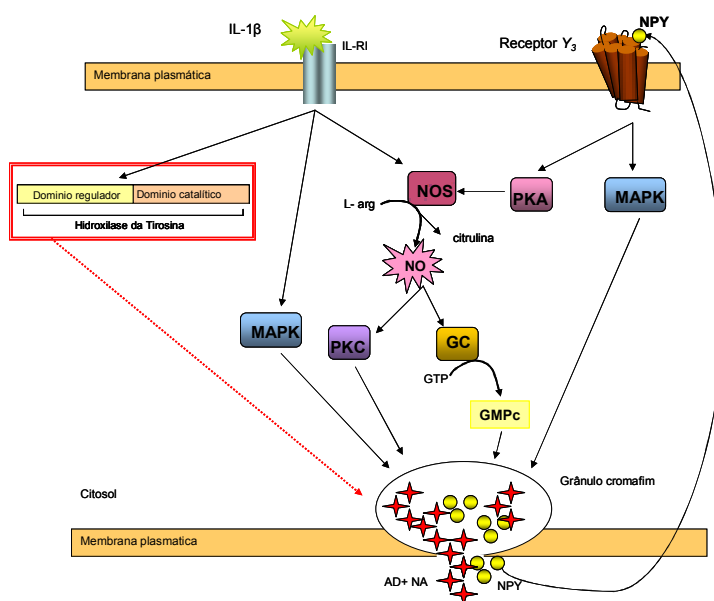


Figura 6.9 - Esquema modelo das vias de sinalização intracelular activadas pela IL-1 β que estimulam a libertação de catecolaminas das células cromafins humanas.

A IL-1 β induz o aumento da libertação de catecolaminas actuando ao nível da síntese de catecolaminas, induzindo a fosforilação da hidroxilase da tirosina, a enzima do passo limitante da síntese de catecolaminas. Por outro lado, a IL-1 β ao ligar-se ao IL-1RI vai activar a via das MAPK ou ainda a produção de NOS que, por sua vez, vai activar a guanidil-ciclase (GC) e a PKC. Estas vias contribuem para a libertação de catecolaminas pelas células cromafins humanas. A IL-1 β aumenta também a libertação de NPY que, ligando-se ao receptor Y₃ das células cromafins humanas, contribui para um aumento adicional de libertação de catecolaminas. A activação do receptor Y₃ activa as MAPK e ainda a PKA, responsável pela activação da NOS e, conseqüentemente, a produção de NO.

Capítulo 7
Conclusões gerais

O trabalho apresentado nesta tese permite-nos tirar as seguintes conclusões:

1. A IL-1 β induz um aumento na libertação de catecolaminas e de NPY pelas células cromafins de murganho e humanas. Este NPY libertado regula, pelo menos em parte, o efeito estimulador da IL-1 β nas células cromafins de murganho e humanas.

2. Nas células cromafins de murganho, o NPY estimula a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y₁, de uma forma dependente de Ca²⁺, através da activação das MAPK e ainda através da produção do NO, que funciona como o mensageiro intracelular responsável pela activação da GC e da PKC. No entanto, nas células cromafins humanas o NPY estimula a libertação de catecolaminas através da activação do receptor Y₃ que activando a PKA regula a NOS que estimulando a produção de NO activa a PKC e a GC.

3. O NPY regula a homeostase intracelular de catecolaminas uma vez que, para além de aumentar a libertação de catecolaminas, regula o promotor da enzima de síntese das catecolaminas, a TH.

3. O efeito da IL-1 β na libertação de catecolaminas ocorre através da activação das MAPK e ainda através da produção de NO que por sua vez activa a PKC e a GC. O papel estimulador da IL-1 β na libertação de catecolaminas é contrabalançado pelo aumento da actividade da TH, contribuindo deste modo para a homeostase intracelular de catecolaminas.

Em condições fisiopatológicas, como o stresse ou a hipertensão em que ocorre um aumento da concentração plasmática de IL-1 β poderá ocorrer um aumento na libertação de catecolaminas e de NPY das glândulas supra-renais e este NPY poderá contribuir para um aumento adicional de catecolaminas no plasma. Além disso, quando as células inflamatórias produzem um excesso de NO este pode actuar nas células cromafins humanas activando os mecanismos intracelulares que induzem um aumento na libertação de catecolaminas, e portanto para o agravamento da situação patológica do indivíduo. O NPY e o NO constituem compostos que contribuem para a comunicação entre o sistema imunitário e as

Capítulo 6__

glândulas supra-renais, contribuindo para um aumento adicional de catecolaminas circulantes que poderá ser determinante para o agravamento das já referidas situações patológica

Referencias Bibliográficas

Referências Bibliográficas _____

1. Aakerlund, L., U. Gether, J. Fuhlendorff, T.W. Schwartz, and O. Thastrup, Y1 receptors for neuropeptide Y are coupled to mobilization of intracellular calcium and inhibition of adenylate cyclase. *FEBS Lett*, 1990. 260(1): p. 73-8.
2. Abbott, C.A., D.M. Yu, E. Woollatt, G.R. Sutherland, G.W. McCaughan, and M.D. Gorrell, Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem*, 2000. 267(20): p. 6140-50.
3. Adeghate, E., A.S. Ponery, D.J. Pallot, and J. Singh, Distribution of vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide-Y and substance P and their effects on insulin secretion from the in vitro pancreas of normal and diabetic rats. *Peptides*, 2001. 22(1): p. 99-107.
4. Ahmed, A., O. Johansson, and J. Folan-Curran, Distribution of PGP 9.5, TH, NPY, SP and CGRP immunoreactive nerves in the rat and guinea pig atrioventricular valves and chordae tendineae. *J Anat*, 1997. 191 (Pt 4): p. 547-60.
5. Ait-Ali, D., V. Turquier, L. Grumolato, L. Yon, M. Jourdain, D. Alexandre, L.E. Eiden, H. Vaudry, and Y. Anouar, The proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 stimulate neuropeptide gene transcription and secretion in adrenochromaffin cells via activation of extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 protein kinases, and activator protein-1 transcription factors. *Mol Endocrinol*, 2004. 18(7): p. 1721-39.
6. Ajami, K., C.A. Abbott, G.W. McCaughan, and M.D. Gorrell, Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIP-like peptidase activity. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1679(1): p. 18-28.
7. Akaike, T. and H. Maeda, Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, 2000. 101(3): p. 300-8.
8. Alaniz, R.C., S.A. Thomas, M. Perez-Melgosa, K. Mueller, A.G. Farr, R.D. Palmiter, and C.B. Wilson, Dopamine beta-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2274-8.
9. Albert, K.A., E. Helmer-Matyjek, A.C. Nairn, T.H. Muller, J.W. Haycock, L.A. Greene, M. Goldstein, and P. Greengard, Calcium/phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(24): p. 7713-7.
10. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 2001. 357(Pt 3): p. 593-615.
11. Alheim, K., C. Andersson, S. Tingsborg, M. Ziolkowska, M. Schultzberg, and T. Bartfai, Interleukin 1 expression is inducible by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(20): p. 9302-6.
12. Alioua, A., J.P. Huggins, and E. Rousseau, PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*, 1995. 268(6 Pt 1): p. L1057-63.
13. Álvaro AR, R.-S.J., Santiago AR, Aveleira C, Carvalho AL, Grouzmann E, Ambrósio AF, Cavadas C. , Neuropeptide Y is expressed in neuronal, macroglial, microglial and endothelial retinal cells. *Neurochemistry International*, 2007.
14. An, S. and D. Zenisek, Regulation of exocytosis in neurons and neuroendocrine cells. *Curr Opin Neurobiol*, 2004. 14(5): p. 522-30.
15. Andrei, C., C. Dazzi, L. Lotti, M.R. Torrisi, G. Chimini, and A. Rubartelli, The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(5): p. 1463-75.
16. Andrei, C., P. Margiocco, A. Poggi, L.V. Lotti, M.R. Torrisi, and A. Rubartelli, Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(26): p. 9745-50.
17. Andreis, P.G., G. Neri, A.S. Belloni, G. Mazzocchi, A. Kasprzak, and G.G. Nussdorfer, Interleukin-1 beta enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology*, 1991. 129(1): p. 53-7.
18. Anitha, M., B. Chandrasekharan, J.R. Salgado, E. Grouzmann, S. Mwangi, S.V. Sitaraman, and S. Srinivasan, Glial-derived neurotrophic factor modulates enteric neuronal survival and proliferation through neuropeptide Y. *Gastroenterology*, 2006. 131(4): p. 1164-78.

Referências Bibliográficas

19. Anouar, Y., C. Desmoucelles, L. Yon, J. Leprince, L. Breault, N. Gallo-Payet, and H. Vaudry, Identification of a novel secretogranin II-derived peptide (SgII(187-252)) in adult and fetal human adrenal glands using antibodies raised against the human recombinant peptide. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(8): p. 2944-51.
20. Anouar, Y., L. Yon, C. Desmoucelles, J. Leprince, L. Breault, N. Gallo-Payet, and H. Vaudry, Identification of a novel secretogranin II-derived peptide in the adult and fetal human adrenal gland. *Endocr Res*, 1998. 24(3-4): p. 731-6.
21. Archer, S.L., J.M. Huang, V. Hampl, D.P. Nelson, P.J. Shultz, and E.K. Weir, Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(16): p. 7583-7.
22. Arend, W.P., Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol*, 1993. 54: p. 167-227.
23. Arnold, W.P., C.K. Mittal, S. Katsuki, and F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(8): p. 3203-7.
24. Artalejo, C.R., M.E. Adams, and A.P. Fox, Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature*, 1994. 367(6458): p. 72-6.
25. Asano, T., K. Otsuguro, T. Ohta, T. Sugawara, S. Ito, and Y. Nakazato, Characteristics of ATP-induced catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells of the guinea-pig. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1995. 112(2): p. 101-8.
26. Aunis, D., Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol*, 1998. 181: p. 213-320.
27. Aunis, D., J.E. Hesketh, and G. Devilliers, Immunohistochemical and immunocytochemical localization of myosin, chromogranin A and dopamine-beta-hydroxylase in nerve cells in culture and in adrenal glands. *J Neurocytol*, 1980. 9(2): p. 255-74.
28. Aunis, D. and K. Langley, Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*, 1999. 167(2): p. 89-97.
29. Back, N., M. Ahonen, S. Soynila, E. Kivilaakso, and T. Kiviluoto, Catecholamine-synthesizing enzymes in the rat stomach. *Histochem Cell Biol*, 1995. 104(1): p. 63-7.
30. Badwey, J.A. and M.L. Karnovsky, Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu Rev Biochem*, 1980. 49: p. 695-726.
31. Baker, E.M., T.R. Cheek, and R.D. Burgoyne, Cyclic AMP inhibits secretion from bovine adrenal chromaffin cells evoked by carbamylcholine but not by high K⁺. *Biochim Biophys Acta*, 1985. 846(3): p. 388-93.
32. Baraban, S.C., Antiepileptic actions of neuropeptide Y in the mouse hippocampus require Y5 receptors. *Epilepsia*, 2002. 43 Suppl 5: p. 9-13.
33. Barnes, R.D., L.E. Ward, K.P. Frank, G.M. Tyce, L.W. Hunter, and D.K. Rorie, Nitric oxide modulates evoked catecholamine release from canine adrenal medulla. *Neuroscience*, 2001. 104(4): p. 1165-73.
34. Barrios, V.E., J. Sun, J. Douglass, and C.F. Toombs, Evidence of a specific pancreatic polypeptide receptor in rat arterial smooth muscle. *Peptides*, 1999. 20(9): p. 1107-13.
35. Bartfai, T., C. Andersson, J. Bristulf, M. Schultzberg, and S. Svenson, Interleukin-1 in the noradrenergic chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. 594: p. 207-13.
36. Bedoui, S., S. Lechner, T. Gebhardt, H. Nave, A.G. Beck-Sickinger, R.H. Straub, R. Pabst, and S. von Horsten, NPY modulates epinephrine-induced leukocytosis via Y-1 and Y-5 receptor activation in vivo: sympathetic co-transmission during leukocyte mobilization. *J Neuroimmunol*, 2002. 132(1-2): p. 25-33.
37. Berglund, M.M., P.A. Hipskind, and D.R. Gehlert, Recent developments in our understanding of the physiological role of PP-fold peptide receptor subtypes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. 228(3): p. 217-44.
38. Bevilacqua, L.R., M.E. Graham, P.R. Dunkley, E.I. von Nagy-Felsobuki, and P.W. Dickson, Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40). *J Biol Chem*, 2001. 276(44): p. 40411-6.

39. Bian, Z., Z.Q. Yan, G.K. Hansson, P. Thoren, and S. Normark, Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J Infect Dis*, 2001. 183(4): p. 612-9.
40. Bierhaus, A., J. Wolf, M. Andrassy, N. Rohleder, P.M. Humpert, D. Petrov, R. Ferstl, M. von Eynatten, T. Wendt, G. Rudofsky, M. Joswig, M. Morcos, M. Schwaninger, B. McEwen, C. Kirschbaum, and P.P. Nawroth, A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(4): p. 1920-5.
41. Bitran, M., W. Tapia, E. Eugenin, P. Orio, and M.P. Boric, Neuropeptide Y induced inhibition of noradrenaline release in rat hypothalamus: role of receptor subtype and nitric oxide. *Brain Res*, 1999. 851(1-2): p. 87-93.
42. Bobrovskaya, L., T.B. Cheah, S.J. Bunn, and P.R. Dunkley, Tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells: angiotensin II-stimulated activity and phosphorylation of Ser19, Ser31, and Ser40. *J Neurochem*, 1998. 70(6): p. 2565-73.
43. Bobrovskaya, L., P.R. Dunkley, and P.W. Dickson, Phosphorylation of Ser19 increases both Ser40 phosphorylation and enzyme activity of tyrosine hydroxylase in intact cells. *J Neurochem*, 2004. 90(4): p. 857-64.
44. Bobrovskaya, L., A. Odell, R.B. Leal, and P.R. Dunkley, Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *J Neurochem*, 2001. 78(3): p. 490-8.
45. Bochner, B.S., F.W. Luscinskas, M.A. Gimbrone, Jr., W. Newman, S.A. Sterbinsky, C.P. Derse-Anthony, D. Klunk, and R.P. Schleimer, Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med*, 1991. 173(6): p. 1553-7.
46. Bornstein, S.R., M. Ehrhart-Bornstein, J. Gonzalez-Hernandez, S. Schroder, and W.A. Scherbaum, Expression of interleukin-1 in human pheochromocytoma. *J Endocrinol Invest*, 1996. 19(10): p. 693-8.
47. Bornstein, S.R., M. Ehrhart-Bornstein, W.A. Scherbaum, E.F. Pfeiffer, and J.J. Holst, Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology*, 1990. 127(2): p. 900-6.
48. Bornstein, S.R., J.A. Gonzalez-Hernandez, M. Ehrhart-Bornstein, G. Adler, and W.A. Scherbaum, Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. 78(1): p. 225-32.
49. Bornstein, S.R. and H. Rutkowski, The adrenal hormone metabolism in the immune/inflammatory reaction. *Endocr Res*, 2002. 28(4): p. 719-28.
50. Bornstein, S.R., H. Tian, A. Haidan, A. Bottner, N. Hiroi, G. Eisenhofer, S.M. McCann, G.P. Chrousos, and S. Roffler-Tarlov, Deletion of tyrosine hydroxylase gene reveals functional interdependence of adrenocortical and chromaffin cell system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(26): p. 14742-7.
51. Bravo, E.L., Physiology of the adrenal cortex. *Urologic Clinics of North America*, 1989. 16: p. 433-437.
52. Bredt, D.S., P.M. Hwang, C.E. Glatt, C. Lowenstein, R.R. Reed, and S.H. Snyder, Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991. 351(6329): p. 714-8.
53. Bredt, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder, Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 1990. 347(6295): p. 768-70.
54. Briand, R., N. Yamaguchi, J. Gagne, T. Kimura, L. Farley, S. Foucart, R. Nadeau, and J. de Champlain, Corelease of neuropeptide Y like immunoreactivity with catecholamines from the adrenal gland during splanchnic nerve stimulation in anesthetized dogs. *Can J Physiol Pharmacol*, 1990. 68(3): p. 363-9.
55. Bromeo, T., P. Sjodin, R. Fredriksson, T. Boswell, T.A. Larsson, E. Salaneck, R. Zorob, N. Mohell, and D. Larhammar, Neuropeptide Y-family receptors Y6 and Y7 in chicken. Cloning, pharmacological characterization, tissue distribution and conserved synteny with human chromosome region. *FEBS J*, 2006. 273(9): p. 2048-63.

Referências Bibliográficas

56. Brownfield, M.S., B.C. Poff, and M.A. Holzwarth, Ultrastructural immunocytochemical co-localization of serotonin and PNMT in adrenal medullary vesicles. *Histochemistry*, 1985. 83(1): p. 41-6.
57. Brune, B. and E.G. Lapetina, Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 181(2): p. 921-6.
58. Brydon, L., S. Edwards, H. Jia, V. Mohamed-Ali, I. Zachary, J.F. Martin, and A. Steptoe, Psychological stress activates interleukin-1beta gene expression in human mononuclear cells. *Brain Behav Immun*, 2005. 19(6): p. 540-6.
59. Burgoyne, R.D. and A. Morgan, Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev*, 2003. 83(2): p. 581-632.
60. Butcher, C., A. Steinkasserer, S. Tejura, and A.C. Lennard, Comparison of two promoters controlling expression of secreted or intracellular IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*, 1994. 153(2): p. 701-11.
61. Cabrele, C., M. Langer, R. Bader, H.A. Wieland, H.N. Doods, O. Zerbe, and A.G. Beck-Sickingler, The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J Biol Chem*, 2000. 275(46): p. 36043-8.
62. Cahill, A.L., J. Horwitz, and R.L. Perlman, Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in protein kinase C-deficient PC12 cells. *Neuroscience*, 1989. 30(3): p. 811-8.
63. Camacho, M., M.S. Montesinos, J.D. Machado, and R. Borges, [Exocytosis as the mechanism for neural communication. A view from chromaffin cells]. *Rev Neurol*, 2003. 36(4): p. 355-60.
64. Cammarota, M., L.R. Bevilacqua, J.A. Rostas, and P.R. Dunkley, Histamine activates tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells through a pathway that involves ERK1/2 but not p38 or JNK. *J Neurochem*, 2003. 84(3): p. 453-8.
65. Campbell, R.E., K.L. Grove, and M.S. Smith, Distribution of corticotropin releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res*, 2003. 973(2): p. 223-32.
66. Campbell, R.E., M.S. Smith, S.E. Allen, B.E. Grayson, J.M. French-Mullen, and K.L. Grove, Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J Neurosci*, 2003. 23(4): p. 1487-97.
67. Cannon, J.G., J.S. Friedberg, J.A. Gelfand, R.G. Tompkins, J.F. Burke, and C.A. Dinarello, Circulating interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentrations after burn injury in humans. *Crit Care Med*, 1992. 20(10): p. 1414-9.
68. Cannon, J.G., R.G. Tompkins, J.A. Gelfand, H.R. Michie, G.G. Stanford, J.W. van der Meer, S. Endres, G. Lonnemann, J. Corsetti, B. Chernow, and et al., Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis*, 1990. 161(1): p. 79-84.
69. Cao, Z., W.J. Henzel, and X. Gao, IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, 1996. 271(5252): p. 1128-31.
70. Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, and D.V. Goeddel, TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, 1996. 383(6599): p. 443-6.
71. Capurro, D. and J.P. Huidobro-Toro, The involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIBO 3304. *Eur J Pharmacol*, 1999. 376(3): p. 251-5.
72. Carabelli, V., M. D'Ascenzo, E. Carbone, and C. Grassi, Nitric oxide inhibits neuroendocrine Ca(V)1 L-channel gating via cGMP-dependent protein kinase in cell-attached patches of bovine chromaffin cells. *J Physiol*, 2002. 541(Pt 2): p. 351-66.
73. Cavadas, C., D. Cefai, J. Rosmaninho-Salgado, M.A. Vieira-Coelho, E. Moura, N. Busso, T. Pedrazzini, D. Grand, S. Rotman, B. Waeber, J.F. Aubert, and E. Grouzmann, Deletion of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene reveals a regulatory role of NPY on catecholamine synthesis and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(27): p. 10497-502.
74. Cavadas, C., D. Grand, F. Mosimann, M.D. Cotrim, C.A. Fontes Ribeiro, H.R. Brunner, and E. Grouzmann, Angiotensin II mediates catecholamine and neuropeptide Y secretion in human adrenal chromaffin cells through the AT1 receptor. *Regul Pept*, 2003. 111(1-3): p. 61-5.

75. Cavadas, C., A.P. Silva, M.D. Cotrim, C.A. Ribeiro, H.R. Brunner, and E. Grouzmann, Differential secretion of catecholamine and neuropeptide Y in response to KCl from mice chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 971: p. 335-7.
76. Cavadas, C., A.P. Silva, F. Mosimann, M.D. Cotrim, C.A. Ribeiro, H.R. Brunner, and E. Grouzmann, NPY regulates catecholamine secretion from human adrenal chromaffin cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(12): p. 5956-63.
77. Cavallini, L., M. Coassin, A. Borean, and A. Alexandre, Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5545-51.
78. Caviedes-Bucheli, J., N. Lombana, M.M. Azuero-Holguin, and H.R. Munoz, Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*, 2006. 39(5): p. 394-400.
79. Chan-Palay, V., Y.S. Allen, W. Lang, U. Haesler, and J.M. Polak, Cytology and distribution in normal human cerebral cortex of neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y. *J Comp Neurol*, 1985. 238(4): p. 382-9.
80. Chan-Palay, V., C. Kohler, U. Haesler, W. Lang, and G. Yasargil, Distribution of neurons and axons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y in the normal human hippocampus. *J Comp Neurol*, 1986. 248(3): p. 360-75.
81. Chan, A.S., W.W. Yeung, and Y.H. Wong, Integration of G protein signals by extracellular signal-regulated protein kinases in SK-N-MC neuroepithelioma cells. *J Neurochem*, 2005. 94(5): p. 1457-70.
82. Cheah, T.B., L. Bobrovskaya, C.A. Goncalves, A. Hall, R. Elliot, I. Lengyel, S.J. Bunn, P.D. Marley, and P.R. Dunkley, Simultaneous measurement of tyrosine hydroxylase activity and phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods*, 1999. 87(2): p. 167-74.
83. Cheek, T.R., Calcium signalling and the triggering of secretion in adrenal chromaffin cells. *Pharmacol Ther*, 1991. 52(2): p. 173-89.
84. Cheek, T.R. and R.D. Burgoyne, Cyclic AMP inhibits both nicotine-induced actin disassembly and catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, 1987. 262(24): p. 11663-6.
85. Chen, S.H. and R.T. Cheung, Neuropeptide Y and its receptor analogs differentially modulate the immunoreactivity for neuronal or endothelial nitric oxide synthase in the rat brain following focal ischemia with reperfusion. *J Biomed Sci*, 2005. 12(2): p. 267-78.
86. Chen, S.H., P.C. Fung, and R.T. Cheung, Neuropeptide Y-Y1 receptor modulates nitric oxide level during stroke in the rat. *Free Radic Biol Med*, 2002. 32(8): p. 776-84.
87. Cheneval, D., P. Ramage, T. Kastelic, T. Szelestenyi, H. Niggli, R. Hemmig, M. Bachmann, and A. MacKenzie, Increased mature interleukin-1beta (IL-1beta) secretion from THP-1 cells induced by nigericin is a result of activation of p45 IL-1beta-converting enzyme processing. *J Biol Chem*, 1998. 273(28): p. 17846-51.
88. Chi, D.S., S.M. Fitzgerald, S. Pitts, K. Cantor, E. King, S.A. Lee, S.K. Huang, and G. Krishnaswamy, MAPK-dependent regulation of IL-1- and beta-adrenoreceptor-induced inflammatory cytokine production from mast cells: implications for the stress response. *BMC Immunol*, 2004. 5: p. 22.
89. Choi, A.Y., A.L. Cahill, B.D. Perry, and R.L. Perlman, Histamine evokes greater increases in phosphatidylinositol metabolism and catecholamine secretion in epinephrine-containing than in norepinephrine-containing chromaffin cells. *J Neurochem*, 1993. 61(2): p. 541-9.
90. Chomarat, P., E. Vannier, J. Dechanet, M.C. Rissoan, J. Banchereau, C.A. Dinarello, and P. Miossec, Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 beta in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J Immunol*, 1995. 154(3): p. 1432-9.
91. Cleary, S., F.M. Brouwers, G. Eisenhofer, K. Pacak, D.L. Christie, J. Lipski, A.R. McNeil, and J.K. Phillips, Expression of the noradrenaline transporter and phenylethanolamine N-methyltransferase in normal human adrenal gland and pheochromocytoma. *Cell Tissue Res*, 2005. 322(3): p. 443-53.

Referências Bibliográficas

92. Conconi, M.T., R. Spinazzi, and G.G. Nussdorfer, Endogenous ligands of PACAP/VIP receptors in the autocrine-paracrine regulation of the adrenal gland. *Int Rev Cytol*, 2006. 249: p. 1-51.
93. Corbitt, J., J. Vivekananda, S.S. Wang, and R. Strong, Transcriptional and posttranscriptional control of tyrosine hydroxylase gene expression during persistent stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors on PC12 cells: regulation by protein kinase A-dependent and protein kinase A-independent pathways. *J Neurochem*, 1998. 71(2): p. 478-86.
94. Corp, E.S., J. McQuade, S. Krasnicki, and D.B. Conze, Feeding after fourth ventricular administration of neuropeptide Y receptor agonists in rats. *Peptides*, 2001. 22(3): p. 493-9.
95. Cox, H.M. and I.R. Tough, Neuropeptide Y, Y1, Y2 and Y4 receptors mediate Y agonist responses in isolated human colon mucosa. *Br J Pharmacol*, 2002. 135(6): p. 1505-12.
96. Cox, M.E., C.M. Ely, A.D. Catling, M.J. Weber, and S.J. Parsons, Tyrosine kinases are required for catecholamine secretion and mitogen-activated protein kinase activation in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, 1996. 66(3): p. 1103-12.
97. Cox, M.E. and S.J. Parsons, Roles for protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in nicotine-induced secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, 1997. 69(3): p. 1119-30.
98. Crivellato, E., A. Belloni, B. Nico, G.G. Nussdorfer, and D. Ribatti, Chromaffin granules in the rat adrenal medulla release their secretory content in a particulate fashion. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004. 277(1): p. 204-8.
99. Crivellato, E., N. Finato, D. Ribatti, and C.A. Beltrami, Piecemeal degranulation in human tumour pheochromocytomas. *J Anat*, 2005. 206(1): p. 47-53.
100. Crivellato, E., B. Nico, F. Mallardi, C.A. Beltrami, and D. Ribatti, Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003. 274(1): p. 778-84.
101. Crivellato, E., B. Nico, L. Perissin, and D. Ribatti, Ultrastructural morphology of adrenal chromaffin cells indicative of a process of piecemeal degranulation. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003. 270(2): p. 103-8.
102. Crivellato, E., B. Nico, D. Ribatti, and G.G. Nussdorfer, Catecholamine release by chromaffin cells: a lesson from mast cells. *Gen Comp Endocrinol*, 2006. 146(2): p. 69-73.
103. Croston, G.E., Z. Cao, and D.V. Goeddel, NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J Biol Chem*, 1995. 270(28): p. 16514-7.
104. Currie, K.P., Z. Zhou, and A.P. Fox, Evidence for paracrine signaling between macrophages and bovine adrenal chromaffin cell Ca(2+) channels. *J Neurophysiol*, 2000. 83(1): p. 280-7.
105. D'Angelo, I. and N.C. Brecha, Y2 receptor expression and inhibition of voltage-dependent Ca2+ influx into rod bipolar cell terminals. *Neuroscience*, 2004. 125(4): p. 1039-49.
106. Daniels, A.J., E.R. Lazarowski, J.E. Matthews, and E.G. Lapetina, Neuropeptide Y mobilizes intracellular Ca2+ and increases inositol phosphate production in human erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 165(3): p. 1138-44.
107. Daniels, A.J., J.E. Matthews, O. Humberto Viveros, and E.R. Lazarowski, Characterization of the neuropeptide Y-induced intracellular calcium release in human erythroleukemic cells. *Mol Pharmacol*, 1992. 41(4): p. 767-71.
108. Danis, V.A., M. Millington, V.J. Hyland, and D. Grennan, Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*, 1995. 99(2): p. 303-10.
109. Dawson, V.L. and T.M. Dawson, Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res*, 1998. 118: p. 215-29.
110. De la Fuente, M., I. Bernaez, M. Del Rio, and A. Hernanz, Stimulation of murine peritoneal macrophage functions by neuropeptide Y and peptide YY. Involvement of protein kinase C. *Immunology*, 1993. 80(2): p. 259-65.
111. de Quidt, M.E. and P.C. Emson, Neuropeptide Y in the adrenal gland: characterization, distribution and drug effects. *Neuroscience*, 1986. 19(3): p. 1011-22.

112. Deak, M., A.D. Clifton, L.M. Lucocq, and D.R. Alessi, Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J*, 1998. 17(15): p. 4426-41.
113. DiMaggio, D.A., J.M. Farah, Jr., and T.C. Westfall, Effects of differentiation on neuropeptide-Y receptors and responses in rat pheochromocytoma cells. *Endocrinology*, 1994. 134(2): p. 719-27.
114. Dimitrijevic, M., S. Stanojevic, S. Mivic, V. Vujic, V. Kovacevic-Jovanovic, K. Mitic, S. von Horsten, and D. Kosec, Neuropeptide Y (NPY) modulates oxidative burst and nitric oxide production in carrageenan-elicited granulocytes from rat air pouch. *Peptides*, 2006. 27(12): p. 3208-15.
115. Dinarello, C.A., Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991. 77(8): p. 1627-52.
116. Dinarello, C.A., Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996. 87(6): p. 2095-147.
117. Dinarello, C.A., Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*, 2005. 201(9): p. 1355-9.
118. Dohi, T., K. Morita, and A. Tsujimoto, Effect of sodium azide on catecholamine release from isolated adrenal gland and on guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 1983. 94(3-4): p. 331-5.
119. Dotsch, J., K.D. Nusken, I. Knerr, M. Kirschbaum, R. Repp, and W. Rascher, Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(8): p. 2755-8.
120. Douglas, W.W., Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*, 1968. 34(3): p. 453-74.
121. Dower, S.K., S.R. Kronheim, T.P. Hopp, M. Cantrell, M. Deeley, S. Gillis, C.S. Henney, and D.L. Urdal, The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature*, 1986. 324(6094): p. 266-8.
122. Dumont, Y., A. Cadieux, L.H. Pheng, A. Fournier, S. St-Pierre, and R. Quirion, Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y1 and Y2 agonists devoided of activity for the Y3 receptor sub-type. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994. 26(1-2): p. 320-4.
123. Dunker, N., A double-label analysis demonstrating the partial coexistence of tyrosine hydroxylase and GABA in retinal neurons of *ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia; gymnophiona). *Cell Tissue Res*, 1998. 294(2): p. 387-90.
124. Dunkley, P.R., L. Bobrovskaya, M.E. Graham, E.I. von Nagy-Felsobuki, and P.W. Dickson, Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem*, 2004. 91(5): p. 1025-43.
125. Eastgate, J.A., J.A. Symons, N.C. Wood, F.M. Grinlinton, F.S. di Giovine, and G.W. Duff, Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1988. 2(8613): p. 706-9.
126. Ebara, S., K. Kumamoto, and T. Matsuura, [Peptidergic innervation in the sinus hair follicles of several mammalian species]. *Kaibogaku Zasshi*, 1992. 67(5): p. 623-33.
127. Eberhard, D.A. and R.W. Holz, Cholinergic stimulation of inositol phosphate formation in bovine adrenal chromaffin cells: distinct nicotinic and muscarinic mechanisms. *J Neurochem*, 1987. 49(5): p. 1634-43.
128. Eisenberg, S.P., M.T. Brewer, E. Verderber, P. Heimdal, B.J. Brandhuber, and R.C. Thompson, Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(12): p. 5232-6.
129. Eisenhofer, G., A. Aneman, D. Hooper, C. Holmes, D.S. Goldstein, and P. Friberg, Production and metabolism of dopamine and norepinephrine in mesenteric organs and liver of swine. *Am J Physiol*, 1995. 268(4 Pt 1): p. G641-9.
130. Eisenhofer, G., I.J. Kopin, and D.S. Goldstein, Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*, 2004. 56(3): p. 331-49.
131. Eisenhofer, G., I.J. Kopin, and D.S. Goldstein, Leaky catecholamine stores: undue waste or a stress response coping mechanism? *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1018: p. 224-30.
132. Eisenhofer, G., W. Pecorella, K. Pacak, D. Hooper, I.J. Kopin, and D.S. Goldstein, The neuronal and extraneuronal origins of plasma 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in rats. *J Auton Nerv Syst*, 1994. 50(1): p. 93-107.

Referências Bibliográficas

133. Eisenhofer, G., B. Rundquist, A. Aneman, P. Friberg, N. Dakak, I.J. Kopin, M.C. Jacobs, and J.W. Lenders, Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(10): p. 3009-17.
134. Eissa, N.T., J.W. Yuan, C.M. Haggerty, E.K. Choo, C.D. Palmer, and J. Moss, Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: a domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(13): p. 7625-30.
135. Ekstrand, A.J., R. Cao, M. Bjorndahl, S. Nystrom, A.C. Jonsson-Rylander, H. Hassani, B. Hallberg, M. Nordlander, and Y. Cao, Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(10): p. 6033-8.
136. Ekstrom, J., R. Ekman, A. Luts, F. Sundler, and G. Tobin, Neuropeptide Y in salivary glands of the rat: origin, release and secretory effects. *Regul Pept*, 1996. 61(2): p. 125-34.
137. El Karim, I.A., P.J. Lamey, G.J. Linden, L.A. Awawdeh, and F.T. Lundy, Caries-induced changes in the expression of pulpal neuropeptide Y. *Eur J Oral Sci*, 2006. 114(2): p. 133-7.
138. Elenkov, I.J., R.L. Wilder, G.P. Chrousos, and E.S. Vizi, The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(4): p. 595-638.
139. Ellingson, T., S. Duddempudi, B.D. Greenberg, D. Hooper, and G. Eisenhofer, Determination of differential activities of soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase in tissues and erythrocytes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999. 729(1-2): p. 347-53.
140. Ely, J.A., L. Hunyady, A.J. Baukal, and K.J. Catt, Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate stimulates calcium release from bovine adrenal microsomes by a mechanism independent of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J*, 1990. 268(2): p. 333-8.
141. Erdem, S.R., C.S. Broxson, A. Erdem, D.S. Spar, R.T. Williams, and N. Tumer, The age-related discrepancy in the effect of neuropeptide Y on select catecholamine biosynthetic enzymes in the adrenal medulla and hypothalamus in rats. *Neuropharmacology*, 2002. 43(8): p. 1280-8.
142. Esch, T. and G. Stefano, Proinflammation: a common denominator or initiator of different pathophysiological disease processes. *Med Sci Monit*, 2002. 8(5): p. HY1-9.
143. Eskay, R.L. and L.E. Eiden, Interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha differentially regulate enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, and substance P biosynthesis in chromaffin cells. *Endocrinology*, 1992. 130(4): p. 2252-8.
144. Esteban, F.J., A. Jimenez, A.P. Fernandez, M.L. del Moral, A.M. Sanchez-Lopez, R. Hernandez, M. Garrosa, J.A. Pedrosa, J. Rodrigo, and M.A. Peinado, Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the guinea-pig liver: distribution and colocalization with neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide. *Liver*, 2001. 21(6): p. 374-9.
145. Eva, C., K. Keinanen, H. Monyer, P. Seeburg, and R. Sprengel, Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Lett*, 1990. 271(1-2): p. 81-4.
146. Fabian, J.R., D.K. Morrison, and I.O. Daar, Requirement for Raf and MAP kinase function during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol*, 1993. 122(3): p. 645-52.
147. Fabry, M., M. Langer, B. Rothen-Rutishauser, H. Wunderli-Allenspach, H. Hocker, and A.G. Beck-Sickingler, Monitoring of the internalization of neuropeptide Y on neuroblastoma cell line SK-N-MC. *Eur J Biochem*, 2000. 267(17): p. 5631-7.
148. Feletou, M., M. Rodriguez, P. Beauverger, M. Germain, J. Imbert, S. Dromaint, C. Macia, A. Bourrienne, J.M. Henlin, J.P. Nicolas, J.A. Boutin, J.P. Galizzi, J.L. Fauchere, E. Canet, and J. Duhault, NPY receptor subtypes involved in the contraction of the proximal colon of the rat. *Regul Pept*, 1998. 75-76: p. 221-9.
149. Fernandez-Chacon, R., O.H. Shin, A. Konigstorfer, M.F. Matos, A.C. Meyer, J. Garcia, S.H. Gerber, J. Rizo, T.C. Sudhof, and C. Rosenmund, Structure/function analysis of Ca²⁺ binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J Neurosci*, 2002. 22(19): p. 8438-46.
150. Fernandez-Vivero, J., F. Rodriguez-Sanchez, C. Verastegui, F. Cordoba Moriano, A. Romero, and J.M. de Castro, Immunocytochemical distribution of serotonin and neuropeptide Y (NPY) in mouse adrenal gland. *Histol Histopathol*, 1993. 8(3): p. 509-20.

151. Ferrer, M., M. Sanchez, C. Martin Mdel, I. Marquez-Rodas, M.J. Alonso, M. Salaires, and G. Balfagon, Protein kinase A increases electrical stimulation-induced neuronal nitric oxide release in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*, 2004. 487(1-3): p. 167-73.
152. Fitzpatrick, P.F., Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem*, 1999. 68: p. 355-81.
153. Foucart, S., D. Bleakman, V.P. Bindokas, and R.J. Miller, Neuropeptide Y and pancreatic polypeptide reduce calcium currents in acutely dissociated neurons from adult rat superior cervical ganglia. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993. 265(2): p. 903-9.
154. Franchi, A., O. Gallo, M. Paglierani, I. Sardi, L. Magnelli, E. Masini, and M. Santucci, Inducible nitric oxide synthase expression in laryngeal neoplasia: correlation with angiogenesis. *Head Neck*, 2002. 24(1): p. 16-23.
155. Francis, S.E., N.J. Camp, R.M. Dewberry, J. Gunn, P. Syrris, N.D. Carter, S. Jeffery, J.C. Kaski, D.C. Cumberland, G.W. Duff, and D.C. Crossman, Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*, 1999. 99(7): p. 861-6.
156. Fredriksson, R., E.T. Larson, Y.L. Yan, J.H. Postlethwait, and D. Larhammar, Novel neuropeptide Y Y2-like receptor subtype in zebrafish and frogs supports early vertebrate chromosome duplications. *J Mol Evol*, 2004. 58(1): p. 106-14.
157. Frossard, P.M., A. Gupta, V. Pravica, C. Perrey, I.V. Hutchinson, and M.L. Lukic, A study of five human cytokine genes in human essential hypertension. *Mol Immunol*, 2002. 38(12-13): p. 969-76.
158. Fujita T., K.T., Kobayashi S., The paraneuron. *Springer-Verlag*, 1988.
159. Fukumura, D., S. Kashiwagi, and R.K. Jain, The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(7): p. 521-34.
160. Gadiant, R.A., A. Lachmund, K. Unsicker, and U. Otten, Expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNAs in rat adrenal medulla. *Neurosci Lett*, 1995. 194(1-2): p. 17-20.
161. Gandia, L., M.L. Vitale, M. Villarroya, C. Ramirez-Lavergne, A.G. Garcia, and J.M. Trifaro, Differential effects of forskolin and 1,9-dideoxy-forskolin on nicotinic receptor- and K+-induced responses in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol*, 1997. 329(2-3): p. 189-99.
162. Garcia, A.G., A.M. Garcia-De-Diego, L. Gandia, R. Borges, and J. Garcia-Sancho, Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, 2006. 86(4): p. 1093-131.
163. Garthwaite, J. and C.L. Boulton, Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 1995. 57: p. 683-706.
164. Geller, D.A., C.J. Lowenstein, R.A. Shapiro, A.K. Nussler, M. Di Silvio, S.C. Wang, D.K. Nakayama, R.L. Simmons, S.H. Snyder, and T.R. Billiar, Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(8): p. 3491-5.
165. Gerald, C., M.W. Walker, L. Criscione, E.L. Gustafson, C. Batzl-Hartmann, K.E. Smith, P. Vaysse, M.M. Durkin, T.M. Laz, D.L. Linemeyer, A.O. Schaffhauser, S. Whitebread, K.G. Hofbauer, R.I. Taber, T.A. Branchek, and R.L. Weinshank, A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*, 1996. 382(6587): p. 168-71.
166. Gicquiaux, H., S. Lecat, M. Gaire, A. Dieterlen, Y. Mely, K. Takeda, B. Bucher, and J.L. Galzi, Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor. *J Biol Chem*, 2002. 277(8): p. 6645-55.
167. Glaum, S.R., R.J. Miller, H. Rhim, D. Maclean, L.M. Georgic, R.G. MacKenzie, and L. Grundemar, Characterization of Y3 receptor-mediated synaptic inhibition by chimeric neuropeptide Y-peptide YY peptides in the rat brainstem. *Br J Pharmacol*, 1997. 120(3): p. 481-7.
168. Goc, A. and M.K. Stachowiak, Bovine tyrosine hydroxylase gene-promoter regions involved in basal and angiotensin II-stimulated expression in nontransformed adrenal medullary cells. *J Neurochem*, 1994. 62(3): p. 834-43.
169. Goncalves, C.A., A. Hall, A.T. Sim, S.J. Bunn, P.D. Marley, T.B. Cheah, and P.R. Dunkley, Tyrosine hydroxylase phosphorylation in digitonin-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells: the effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on Ser19 and Ser40 phosphorylation. *J Neurochem*, 1997. 69(6): p. 2387-96.

Referências Bibliográficas

170. Gonzalez-Hernandez, J.A., S.R. Bornstein, M. Ehrhart-Bornstein, J.E. Gschwend, A. Gwosdow, G. Jirikowski, and W.A. Scherbaum, IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol*, 1995. 99(1): p. 137-41.
171. Gonzalez-Hernandez, J.A., M. Ehrhart-Bornstein, E. Spath-Schwalbe, W.A. Scherbaum, and S.R. Bornstein, Human adrenal cells express tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. 81(2): p. 807-13.
172. Gopalakrishna, R. and W.B. Anderson, Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(17): p. 6758-62.
173. Graf, A.H., W. Hutter, G.W. Hacker, H. Steiner, V. Anderson, A. Staudach, and O. Dietze, Localization and distribution of vasoactive neuropeptides in the human placenta. *Placenta*, 1996. 17(7): p. 413-21.
174. Graham, M.E., R.J. Fisher, and R.D. Burgoyne, Measurement of exocytosis by amperometry in adrenal chromaffin cells: effects of clostridial neurotoxins and activation of protein kinase C on fusion pore kinetics. *Biochimie*, 2000. 82(5): p. 469-79.
175. Gray, T., P. Nettesheim, C. Loftin, J.S. Koo, J. Bonner, S. Peddada, and R. Langenbach, Interleukin-1beta-induced mucin production in human airway epithelium is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 receptors, and cyclic AMP-protein kinase A signaling. *Mol Pharmacol*, 2004. 66(2): p. 337-46.
176. Greenfeder, S.A., P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R.A. Chizzonite, and G. Ju, Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem*, 1995. 270(23): p. 13757-65.
177. Gregor, P., Y. Feng, L.B. DeCarr, L.J. Cornfield, and M.L. McCaleb, Molecular characterization of a second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *J Biol Chem*, 1996. 271(44): p. 27776-81.
178. Gregor, P., M.L. Millham, Y. Feng, L.B. DeCarr, M.L. McCaleb, and L.J. Cornfield, Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Lett*, 1996. 381(1-2): p. 58-62.
179. Griffiths, J. and P.D. Marley, Ca²⁺-dependent activation of tyrosine hydroxylase involves MEK1. *Neuroreport*, 2001. 12(12): p. 2679-83.
180. Grima, B., A. Lamouroux, C. Boni, J.F. Julien, F. Javoy-Agid, and J. Mallet, A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature*, 1987. 326(6114): p. 707-11.
181. Grouzmann, E., E. Comoy, P. Walker, M. Burnier, C. Bohuon, B. Waeber, and H. Brunner, Production and characterization of four anti-neuropeptide Y monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 1992. 11(4): p. 409-24.
182. Grundemar, L. and R. Hakanson, Multiple neuropeptide Y receptors are involved in cardiovascular regulation. Peripheral and central mechanisms. *Gen Pharmacol*, 1993. 24(4): p. 785-96.
183. Grundemar, L., J.L. Krstenansky, and R. Hakanson, Activation of neuropeptide Y1 and neuropeptide Y2 receptors by substituted and truncated neuropeptide Y analogs: identification of signal epitopes. *Eur J Pharmacol*, 1993. 232(2-3): p. 271-8.
184. Grunditz, T., R. Hakanson, C. Rerup, F. Sundler, and R. Uddman, Neuropeptide Y in the thyroid gland: neuronal localization and enhancement of stimulated thyroid hormone secretion. *Endocrinology*, 1984. 115(4): p. 1537-42.
185. Gudipaty, L., B.D. Humphreys, G. Buell, and G.R. Dubyak, Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 280(4): p. C943-53.
186. Gulbenkian, S., J. Wharton, G.W. Hacker, I.M. Vardell, S.R. Bloom, and J.M. Polak, Co-localization of neuropeptide tyrosine (NPY) and its C-terminal flanking peptide (C-PON). *Peptides*, 1985. 6(6): p. 1237-43.
187. Guo, Q.X., S.Z. Yang, C.L. Liang, D. Tsang, and L.S. Jen, Tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in retinal transplants in the rat. *Biol Signals*, 1992. 1(1): p. 46-56.

188. Gwosdow, A.R., Mechanisms of interleukin-1-induced hormone secretion from the rat adrenal gland. *Endocr Res*, 1995. 21(1-2): p. 25-37.
189. Gwosdow, A.R., N.A. O'Connell, J.A. Spencer, M.S. Kumar, R.K. Agarwal, H.H. Bode, and A.B. Abou-Samra, Interleukin-1-induced corticosterone release occurs by an adrenergic mechanism from rat adrenal gland. *Am J Physiol*, 1992. 263(3 Pt 1): p. E461-6.
190. Haavik, J., K.K. Andersson, L. Petersson, and T. Flatmark, Soluble tyrosine hydroxylase (tyrosine 3-monooxygenase) from bovine adrenal medulla: large-scale purification and physicochemical properties. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 953(2): p. 142-56.
191. Hagerty, T., E. Fernandez, K. Lynch, S.S. Wang, W.W. Morgan, and R. Strong, Interaction of a glucocorticoid-responsive element with regulatory sequences in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem*, 2001. 78(6): p. 1379-88.
192. Hansel, D.E., B.A. Eipper, and G.V. Ronnett, Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*, 2001. 410(6831): p. 940-4.
193. Hansen, J.T., M.F. Notter, S.H. Okawara, and D.M. Gash, Organization, fine structure, and viability of the human adrenal medulla: considerations for neural transplantation. *Ann Neurol*, 1988. 24(5): p. 599-609.
194. Happola, O., S. Soynila, H. Paivarinta, T.H. Joh, and P. Panula, Histamine-immunoreactive endocrine cells in the adrenal medulla of the rat. *Brain Res*, 1985. 339(2): p. 393-6.
195. Haskill, S., G. Martin, L. Van Le, J. Morris, A. Peace, C.F. Bigler, G.J. Jaffe, C. Hammerberg, S.A. Sporn, S. Fong, and et al., cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(9): p. 3681-5.
196. Hayashi, Y., M. Nishio, Y. Naito, H. Yokokura, Y. Nimura, H. Hidaka, and Y. Watanabe, Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem*, 1999. 274(29): p. 20597-602.
197. Haycock, J.W., Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *J Biol Chem*, 1990. 265(20): p. 11682-91.
198. Haycock, J.W., Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31, and Ser40. *Neurochem Res*, 1993. 18(1): p. 15-26.
199. Haycock, J.W. and A.R. Wakade, Activation and multiple-site phosphorylation of tyrosine hydroxylase in perfused rat adrenal glands. *J Neurochem*, 1992. 58(1): p. 57-64.
200. Haycock, J.W. and J.C. Waymire, Activating antibodies to tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem*, 1982. 257(16): p. 9416-23.
201. Hemingway, H. and M. Marmot, Evidence based cardiology: psychosocial factors in the aetiology and prognosis of coronary heart disease. Systematic review of prospective cohort studies. *Bmj*, 1999. 318(7196): p. 1460-7.
202. Heredia Mdel, P., C. Delgado, L. Pereira, R. Perrier, S. Richard, G. Vassort, J.P. Benitah, and A.M. Gomez, Neuropeptide Y rapidly enhances [Ca²⁺]_i transients and Ca²⁺ sparks in adult rat ventricular myocytes through Y1 receptor and PLC activation. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. 38(1): p. 205-12.
203. Herzog, H., Y.J. Hort, H.J. Ball, G. Hayes, J. Shine, and L.A. Selbie, Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(13): p. 5794-8.
204. Hess, S.M., R.H. Connamacher, M. Ozaki, and S. Udenfriend, The effects of alpha-methyl-DOPA and alpha-methyl-metatyrosine on the metabolism of norepinephrine and serotonin in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 1961. 134: p. 129-38.
205. Hexum, T.D. and L.R. Russett, Stimulation of cholinergic receptor mediated secretion from the bovine adrenal medulla by neuropeptide Y. *Neuropeptides*, 1989. 13(1): p. 35-41.
206. Heym, C., M. Colombo-Benckmann, and B. Mayer, Immunohistochemical demonstration of the synthesis enzyme for nitric oxide and of comediators in neurons and chromaffin cells of the human adrenal medulla. *Ann Anat*, 1994. 176(1): p. 11-6.
207. Higuchi, H., E. Costa, and H.Y. Yang, Neuropeptide Y inhibits the nicotine-mediated release of catecholamines from bovine adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988. 244(2): p. 468-74.

Referências Bibliográficas

208. Higuchi, H., H.Y. Yang, and S.L. Sabol, Rat neuropeptide Y precursor gene expression. mRNA structure, tissue distribution, and regulation by glucocorticoids, cyclic AMP, and phorbol ester. *J Biol Chem*, 1988. 263(13): p. 6288-95.
209. Hirooka, K., D.E. Kourennyi, and S. Barnes, Calcium channel activation facilitated by nitric oxide in retinal ganglion cells. *J Neurophysiol*, 2000. 83(1): p. 198-206.
210. Holliday, N.D. and H.M. Cox, Control of signalling efficacy by palmitoylation of the rat Y1 receptor. *Br J Pharmacol*, 2003. 139(3): p. 501-12.
211. Holzwarth, M.A., L.A. Cunningham, and N. Kleitman, The role of adrenal nerves in the regulation of adrenocortical functions. *Ann N Y Acad Sci*, 1987. 512: p. 449-64.
212. Hong, M., S. Li, A. Fournier, S. St-Pierre, and G. Pelletier, Role of neuropeptide Y in the regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in rat adrenal glands. *Neuroendocrinology*, 1995. 61(1): p. 85-8.
213. Houchi, H., S. Hamano, Y. Masuda, Y. Ishimura, M. Azuma, T. Ohuchi, and M. Oka, Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine synthesis in cultured bovine adrenal chromaffin cells: involvements of tyrosine hydroxylase phosphorylation caused by Ca²⁺ influx and cAMP. *Jpn J Pharmacol*, 1994. 66(3): p. 323-30.
214. Hwa, J.J., M.B. Witten, P. Williams, L. Ghibaudi, J. Gao, B.G. Salisbury, D. Mullins, F. Hamud, C.D. Strader, and E.M. Parker, Activation of the NPY Y5 receptor regulates both feeding and energy expenditure. *Am J Physiol*, 1999. 277(5 Pt 2): p. R1428-34.
215. Icard-Liepkalns, C., N.F. Biguet, S. Vyas, J.J. Robert, P. Sassone-Corsi, and J. Mallet, AP-1 complex and c-fos transcription are involved in TPA provoked and trans-synaptic inductions of the tyrosine hydroxylase gene: insights into long-term regulatory mechanisms. *J Neurosci Res*, 1992. 32(2): p. 290-8.
216. Idriss, S.D., T. Gudi, D.E. Casteel, V.G. Kharitonov, R.B. Pilz, and G.R. Boss, Nitric oxide regulation of gene transcription via soluble guanylate cyclase and type I cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1999. 274(14): p. 9489-93.
217. Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chaudhuri, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(24): p. 9265-9.
218. Ishihara, A., A. Kanatani, S. Mashiko, T. Tanaka, M. Hidaka, A. Gomori, H. Iwaasa, N. Murai, S. Egashira, T. Murai, Y. Mitobe, H. Matsushita, O. Okamoto, N. Sato, M. Jitsuoka, T. Fukuroda, T. Ohe, X. Guan, D.J. MacNeil, L.H. Van der Ploeg, M. Nishikibe, Y. Ishii, M. Ihara, and T. Fukami, A neuropeptide Y Y5 antagonist selectively ameliorates body weight gain and associated parameters in diet-induced obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(18): p. 7154-8.
219. Ishii, N., K.P. Patel, P.H. Lane, T. Taylor, K. Bian, F. Murad, J.S. Pollock, and P.K. Carmines, Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol*, 2001. 12(8): p. 1630-9.
220. Itagaki, C., T. Isobe, M. Taoka, T. Natsume, N. Nomura, T. Horigome, S. Omata, H. Ichinose, T. Nagatsu, L.A. Greene, and T. Ichimura, Stimulus-coupled interaction of tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins. *Biochemistry*, 1999. 38(47): p. 15673-80.
221. Jackerott, M. and L.I. Larsson, Immunocytochemical localization of the NPY/PYY Y1 receptor in enteric neurons, endothelial cells, and endocrine-like cells of the rat intestinal tract. *J Histochem Cytochem*, 1997. 45(12): p. 1643-50.
222. Jacques, D., S. Sader, C. Perreault, A. Fournier, G. Pelletier, A.G. Beck-Sickingler, and M. Descorbeth, Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. 81(3): p. 288-300.
223. Jain, M.R., S. Pu, P.S. Kalra, and S.P. Kalra, Evidence that stimulation of two modalities of pituitary luteinizing hormone release in ovarian steroid-primed ovariectomized rats may involve neuropeptide Y Y1 and Y4 receptors. *Endocrinology*, 1999. 140(11): p. 5171-7.
224. Janssens, S.P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D.B. Bloch, and K.D. Bloch, Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1992. 267(21): p. 14519-22.

225. Jessop, D., S. Biswas, L. D'Souza, H. Chowdrey, and S. Lightman, Neuropeptide Y immunoreactivity in the spleen and thymus of normal rats and following adjuvant-induced arthritis. *Neuropeptides*, 1992. 23(4): p. 203-7.
226. Johannesen, J., A. Pie, F. Pociot, O.P. Kristiansen, A.E. Karlsen, and J. Nerup, Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(6): p. 2792-6.
227. Johnston, J.P., Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol*, 1968. 17(7): p. 1285-97.
228. Jones, P.M., M.A. Ghatei, J. Steel, D. O'Halloran, G. Gon, S. Legon, J.M. Burrin, U. Leonhardt, J.M. Polak, and S.R. Bloom, Evidence for neuropeptide Y synthesis in the rat anterior pituitary and the influence of thyroid hormone status: comparison with vasoactive intestinal peptide, substance P, and neurotensin. *Endocrinology*, 1989. 125(1): p. 334-41.
229. Jorgensen, J.C., Neuropeptide Y in mammalian genital tract: localization and biological action. *Dan Med Bull*, 1994. 41(3): p. 294-305.
230. Jorgensen, J.C., A. Giwercman, and B. Ottesen, Neuropeptide Y in the human prenatal and mature gonads. *Neuropeptides*, 1996. 30(3): p. 293-301.
231. Joseph, A., A. Kumar, N.A. O'Connell, R.K. Agarwal, and A.R. Gwosdow, Interleukin-1 alpha stimulates dopamine release by activating type II protein kinase A in PC-12 cells. *Am J Physiol*, 1995. 269(6 Pt 1): p. E1083-8.
232. Kaneda, N., K. Kobayashi, H. Ichinose, F. Kishi, A. Nakazawa, Y. Kurosawa, K. Fujita, and T. Nagatsu, Isolation of a novel cDNA clone for human tyrosine hydroxylase: alternative RNA splicing produces four kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 146(3): p. 971-5.
233. Keffel, S., M. Schmidt, A. Bischoff, and M.C. Michel, Neuropeptide-Y stimulation of extracellular signal-regulated kinases in human erythroleukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 291(3): p. 1172-8.
234. Kelley, S.P., M.A. Nannini, A.M. Bratt, and C.W. Hodge, Neuropeptide-Y in the paraventricular nucleus increases ethanol self-administration. *Peptides*, 2001. 22(3): p. 515-22.
235. Kent, C. and R.E. Coupland, On the uptake of exogenous catecholamines by adrenal chromaffin cells and nerve endings. *Cell Tissue Res*, 1981. 221(2): p. 371-83.
236. Kim, D., H.J. Choi, S.W. Kim, S.W. Cho, and O. Hwang, Upregulation of catecholamine biosynthetic enzymes by nitric oxide. *J Neurosci Res*, 2003. 72(1): p. 98-104.
237. Kim, Y.D., J.Y. Jeon, H.J. Woo, J.C. Lee, J.H. Chung, S.Y. Song, S.K. Yoon, and S.H. Baek, Interleukin-1beta induces MUC2 gene expression and mucin secretion via activation of PKC-MEK/ERK, and PI3K in human airway epithelial cells. *J Korean Med Sci*, 2002. 17(6): p. 765-71.
238. Kimura, S., R.V. Lewis, A.S. Stern, J. Rossier, S. Stein, and S. Udenfriend, Probable precursors of [Leu]enkephalin and [Met]enkephalin in adrenal medulla: peptides of 3-5 kilodaltons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(3): p. 1681-5.
239. King, P.R., A.L. Gundlach, and W.J. Louis, Identification of imidazoline-receptor binding sites in cortex and medulla of the bovine adrenal gland. Colocalization with MAO-A and MAO-B. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. 881: p. 161-70.
240. Kirch, W., M. Horneber, and E.R. Tamm, Characterization of Meibomian gland innervation in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Anat Embryol (Berl)*, 1996. 193(4): p. 365-75.
241. Kirchmair, R., R. Hogue-Angeletti, J. Gutierrez, R. Fischer-Colbrie, and H. Winkler, Secretoneurin--a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other endocrine tissues by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience*, 1993. 53(2): p. 359-65.
242. Kitamura, K., K. Kangawa, M. Kawamoto, Y. Ichiki, S. Nakamura, H. Matsuo, and T. Eto, Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 192(2): p. 553-60.
243. Kitamura, K., J. Sakata, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, and T. Eto, Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 194(2): p. 720-5.

Referências Bibliográficas

244. Knipping, S., H.J. Holzhausen, A. Riederer, and A. Berghaus, [NPY in human nasal mucosa -- an immunocytochemical and immunoelectron microscopical study]. *Laryngorhinootologie*, 2003. 82(2): p. 109-13.
245. Knowles, R.G. and S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 1994. 298 (Pt 2): p. 249-58.
246. Kobayashi, H., T. Yanagita, H. Yokoo, and A. Wada, Pathophysiological function of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal peptides in adrenal chromaffin cells. *Hypertens Res*, 2003. 26 Suppl: p. S71-8.
247. Kolo, L.L., T.C. Westfall, and H. Macarthur, Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(1): p. H296-303.
248. Komer, M., B. Waser, and J.C. Reubi, High expression of neuropeptide y receptors in tumors of the human adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(24): p. 8426-33.
249. Kranz, A., M.D. Kendall, and B. von Gaudecker, Studies on rat and human thymus to demonstrate immunoreactivity of calcitonin gene-related peptide, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. *J Anat*, 1997. 191 (Pt 3): p. 441-50.
250. Krause, J., C. Eva, P.H. Seeburg, and R. Sprengel, Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor. *Mol Pharmacol*, 1992. 41(5): p. 817-21.
251. Kribben, A., S. Herget-Rosenthal, B. Lange, W. Erdbrugger, T. Philipp, and M.C. Michel, Alpha2-adrenoceptors in opossum kidney cells couple to stimulation of mitogen-activated protein kinase independently of adenylyl cyclase inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1997. 356(2): p. 225-32.
252. Krieglstein, K. and K. Unsicker, Bovine chromaffin cells release a transforming growth factor-beta-like molecule contained within chromaffin granules. *J Neurochem*, 1995. 65(3): p. 1423-6.
253. Krupinski, J., F. Coussen, H.A. Bakalyar, W.J. Tang, P.G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R.R. Reed, and A.G. Gilman, Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science*, 1989. 244(4912): p. 1558-64.
254. Kuczenski, R.T. and A.J. Mandell, Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem*, 1972. 247(10): p. 3114-22.
255. Kuhn, D.M., R. Arthur, Jr., H. Yoon, and K. Sankaran, Tyrosine hydroxylase in secretory granules from bovine adrenal medulla. Evidence for an integral membrane form. *J Biol Chem*, 1990. 265(10): p. 5780-6.
256. Kumai, T., M. Tanaka, T. Tateishi, M. Asoh, and S. Kobayashi, Effects of sodium nitroprusside on the catecholamine synthetic pathway in the adrenal medulla of rats. *Jpn J Pharmacol*, 1998. 77(3): p. 205-10.
257. Kumakura, K., N. Sasakawa, N. Murayama, and M. Ohara-Imaizumi, Spatio-temporal regulation of neurotransmitter release by PKC; studies in adrenal chromaffin cells. *Crit Rev Neurobiol*, 2004. 16(1-2): p. 173-9.
258. Kumer, S.C. and K.E. Vrana, Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem*, 1996. 67(2): p. 443-62.
259. Kuramoto, H., H. Kondo, and T. Fujita, Substance P-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intra-adrenal nerve fibers of rats. *Histochemistry*, 1985. 82(6): p. 507-12.
260. Kuramoto, H., H. Kondo, and T. Fujita, Neuropeptide tyrosine (NPY)-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intraadrenal nerve fibers of rats. *Anat Rec*, 1986. 214(3): p. 321-8.
261. Kuramoto, H., H. Kondo, and T. Fujita, Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. *Cell Tissue Res*, 1987. 247(2): p. 309-15.
262. Kuwashima, H., C. Matsumura, and T. Kimura, Differential secretion of adrenaline and noradrenaline in response to various secretagogues from bovine chromaffin cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000. 27(7): p. 494-9.
263. Lambert, R.W., K. Campton, W. Ding, H. Ozawa, and R.D. Granstein, Langerhans cell expression of neuropeptide Y and peptide YY. *Neuropeptides*, 2002. 36(4): p. 246-51.

264. Larhammar, D., A.G. Blomqvist, F. Yee, E. Jazin, H. Yoo, and C. Wahlested, Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J Biol Chem*, 1992. 267(16): p. 10935-8.
265. Larhammar, D. and E. Salaneck, Molecular evolution of NPY receptor subtypes. *Neuropeptides*, 2004. 38(4): p. 141-51.
266. Lecklin, A., I. Lundell, L. Paananen, J.E. Wikberg, P.T. Mannisto, and D. Larhammar, Receptor subtypes Y1 and Y5 mediate neuropeptide Y induced feeding in the guinea-pig. *Br J Pharmacol*, 2002. 135(8): p. 2029-37.
267. Lecklin, A., I. Lundell, S. Salmela, P.T. Mannisto, A.G. Beck-Sickinger, and D. Larhammar, Agonists for neuropeptide Y receptors Y1 and Y5 stimulate different phases of feeding in guinea pigs. *Br J Pharmacol*, 2003. 139(8): p. 1433-40.
268. Ledo, A., R.M. Barbosa, G.A. Gerhardt, E. Cadenas, and J. Laranjinha, Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(48): p. 17483-8.
269. Lee, E.W., D.S. Grant, S. Movafagh, and Z. Zukowska, Impaired angiogenesis in neuropeptide Y (NPY)-Y2 receptor knockout mice. *Peptides*, 2003. 24(1): p. 99-106.
270. Lehmann, I.T., L. Bobrovskaya, S.L. Gordon, P.R. Dunkley, and P.W. Dickson, Differential regulation of the human tyrosine hydroxylase isoforms via hierarchical phosphorylation. *J Biol Chem*, 2006. 281(26): p. 17644-51.
271. Lemarie, C.A., B. Esposito, A. Tedgui, and S. Lehoux, Pressure-induced vascular activation of nuclear factor-kappaB: role in cell survival. *Circ Res*, 2003. 93(3): p. 207-12.
272. Levitt, M., S. Spector, A. Sjoerdsma, and S. Udenfriend, Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 1965. 148: p. 1-8.
273. Lewis-Tuffin, L.J., P.G. Quinn, and D.M. Chikaraishi, Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. *Mol Cell Neurosci*, 2004. 25(3): p. 536-47.
274. Lewis, E.J., C.A. Harrington, and D.M. Chikaraishi, Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(11): p. 3550-4.
275. Li, Q.Z., Q. Deng, J.Q. Li, G.H. Yi, and S.P. Zhao, Valsartan reduces interleukin-1beta secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Clin Chim Acta*, 2005. 355(1-2): p. 131-6.
276. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
277. Lim, J., C. Yang, S.J. Hong, and K.S. Kim, Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by the cAMP-signaling pathway: involvement of multiple transcription factors. *Mol Cell Biochem*, 2000. 212(1-2): p. 51-60.
278. Lincoln, T.M., N. Dey, and H. Sellak, Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*, 2001. 91(3): p. 1421-30.
279. Lindstrom, L.M. and E. Ekblad, Origins and projections of nerve fibres in rat pyloric sphincter. *Auton Neurosci*, 2002. 97(2): p. 73-82.
280. Litwack, A.W.N.e.G., *Hormones*. 2^o Ed. Academic Press. 1997, S.Diego, USA.
281. Liu, H., B.C. McPherson, X. Zhu, M.L. Da Costa, V. Jeevanandam, and Z. Yao, Role of nitric oxide and protein kinase C in ACh-induced cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 281(1): p. H191-7.
282. Liu, J.S., M.L. Zhao, C.F. Brosnan, and S.C. Lee, Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 2057-66.
283. Livett, B.G. and P.D. Marley, Effects of opioid peptides and morphine on histamine-induced catecholamine secretion from cultured, bovine adrenal chromaffin cells. *Br J Pharmacol*, 1986. 89(2): p. 327-34.

Referências Bibliográficas

284. Lopez-Real, A., J. Rodriguez-Pallares, M.J. Guerra, and J.L. Labandeira-Garcia, Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. *Brain Res*, 2003. 969(1-2): p. 135-46.
285. Lorang, D., S.G. Amara, and R.B. Simerly, Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J Neurosci*, 1994. 14(8): p. 4903-14.
286. Lucas, K.A., G.M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K.P. Chepenik, and S.A. Waldman, Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(3): p. 375-414.
287. Lundberg, J.M., G. Fried, J. Pernow, and E. Theodorsson-Norheim, Co-release of neuropeptide Y and catecholamines upon adrenal activation in the cat. *Acta Physiol Scand*, 1986. 126(2): p. 231-8.
288. Lundberg, J.M., T. Hokfelt, A. Hemsén, E. Theodorsson-Norheim, J. Pernow, B. Hamberger, and M. Goldstein, Neuropeptide Y-like immunoreactivity in adrenaline cells of adrenal medulla and in tumors and plasma of pheochromocytoma patients. *Regul Pept*, 1986. 13(2): p. 169-82.
289. Lundell, I., A.G. Blomqvist, M.M. Berglund, D.A. Schober, D. Johnson, M.A. Statnick, R.A. Gadski, D.R. Gehlert, and D. Larhammar, Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J Biol Chem*, 1995. 270(49): p. 29123-8.
290. Lundell, I., M.A. Statnick, D. Johnson, D.A. Schober, P. Starback, D.R. Gehlert, and D. Larhammar, The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(10): p. 5111-5.
291. Ma, L., P.A. Tataranni, R.L. Hanson, A.M. Infante, S. Kobes, C. Bogardus, and L.J. Baier, Variations in peptide YY and Y2 receptor genes are associated with severe obesity in Pima Indian men. *Diabetes*, 2005. 54(5): p. 1598-602.
292. Machado, J.D., A. Morales, J.F. Gomez, and R. Borges, cAmp modulates exocytotic kinetics and increases quantal size in chromaffin cells. *Mol Pharmacol*, 2001. 60(3): p. 514-20.
293. Machado, J.D., F. Segura, M.A. Brioso, and R. Borges, Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *J Biol Chem*, 2000. 275(27): p. 20274-9.
294. Mahata, S.K., M. Mahata, C.V. Livsey Taylor, L. Taupenot, R.J. Parmer, and D.T. O'Connor, The novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A344-364). Properties and function. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 482: p. 263-77.
295. Majane, E.A., H. Alho, Y. Kataoka, C.H. Lee, and H.Y. Yang, Neuropeptide Y in bovine adrenal glands: distribution and characterization. *Endocrinology*, 1985. 117(3): p. 1162-8.
296. Malhotra, R.K., T.D. Wakade, and A.R. Wakade, Cross-communication between acetylcholine and VIP in controlling catecholamine secretion by affecting cAMP, inositol triphosphate, protein kinase C, and calcium in rat adrenal medulla. *J Neurosci*, 1989. 9(12): p. 4150-7.
297. Malyak, M., J.M. Guthridge, K.R. Hance, S.K. Dower, J.H. Freed, and W.P. Arend, Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*, 1998. 161(4): p. 1997-2003.
298. Mamidipudi, V., C. Lin, M.L. Seibenhener, and M.W. Wooten, Regulation of interleukin receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation and signaling by iota protein kinase C. *J Biol Chem*, 2004. 279(6): p. 4161-5.
299. Mannon, P.J. and J.M. Mele, Peptide YY Y1 receptor activates mitogen-activated protein kinase and proliferation in gut epithelial cells via the epidermal growth factor receptor. *Biochem J*, 2000. 350 Pt 3: p. 655-61.
300. Mannon, P.J. and J.R. Raymond, The neuropeptide Y/peptide YY Y1 receptor is coupled to MAP kinase via PKC and Ras in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 246(1): p. 91-4.
301. Marley, P.D., C.Y. Cheung, K.A. Thomson, and R. Murphy, Activation of tyrosine hydroxylase by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-27) in bovine adrenal chromaffin cells. *J Auton Nerv Syst*, 1996. 60(3): p. 141-6.
302. Marley, P.D., J. McLeod, C. Anderson, and K.A. Thomson, Nerves containing nitric oxide synthase and their possible function in the control of catecholamine secretion in the bovine adrenal medulla. *J Auton Nerv Syst*, 1995. 54(3): p. 184-94.

303. Marley, P.D. and R. Robotis, Activation of tyrosine hydroxylase by histamine in bovine chromaffin cells. *J Auton Nerv Syst*, 1998. 70(1-2): p. 1-9.
304. Matsumoto, M., T. Nomura, K. Momose, Y. Ikeda, Y. Kondou, H. Akiho, J. Togami, Y. Kimura, M. Okada, and T. Yamaguchi, Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J Biol Chem*, 1996. 271(44): p. 27217-20.
305. Matsumoto, S., K. Tanaka, A. Yamamoto, H. Nakada, M. Uchida, and Y. Tashiro, Immunoelectron microscopic localization of dopamine beta-hydroxylase and chromogranin A in adrenomedullary chromaffin cells. *Cell Struct Funct*, 1987. 12(5): p. 483-96.
306. McCullough, L.A. and T.C. Westfall, Mechanism of catecholamine synthesis inhibition by neuropeptide Y: role of Ca²⁺ channels and protein kinases. *J Neurochem*, 1996. 67(3): p. 1090-9.
307. McMahan, C.J., J.L. Slack, B. Mosley, D. Cosman, S.D. Lupton, L.L. Brunton, C.E. Grubin, J.M. Wignall, N.A. Jenkins, C.I. Brannan, and et al., A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J*, 1991. 10(10): p. 2821-32.
308. McNeill, B. and S.F. Perry, Nitric oxide and the control of catecholamine secretion in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Exp Biol*, 2005. 208(Pt 12): p. 2421-31.
309. McNeill, B. and S.F. Perry, The interactive effects of hypoxia and nitric oxide on catecholamine secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol*, 2006. 209(Pt 21): p. 4214-23.
310. Medeiros, M.D. and A.J. Turner, Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. *Endocrinology*, 1994. 134(5): p. 2088-94.
311. Medeiros Mdos, S. and A.J. Turner, Metabolism and functions of neuropeptide Y. *Neurochem Res*, 1996. 21(9): p. 1125-32.
312. Mentlein, R., P. Dahms, D. Grandt, and R. Kruger, Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. *Regul Pept*, 1993. 49(2): p. 133-44.
313. Michel, M.C., Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. 12(10): p. 389-94.
314. Michel, M.C., A. Beck-Sickinger, H. Cox, H.N. Doods, H. Herzog, D. Larhammar, R. Quirion, T. Schwartz, and T. Westfall, XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol Rev*, 1998. 50(1): p. 143-50.
315. Michel, M.C., F. Feth, M. Stieneker, and W. Rascher, NPY and carbachol raise Ca²⁺ in SK-N-MC cells by three different mechanisms. Evidence for inositol phosphate-independent Ca²⁺ mobilization by NPY. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1992. 345(4): p. 370-4.
316. Michel, M.C., E. Schlicker, K. Fink, J.H. Boublik, M. Gothert, R.N. Willette, R.N. Daly, J.P. Hieble, J.E. Rivier, and H.J. Motulsky, Distinction of NPY receptors in vitro and in vivo. I. NPY-(18-36) discriminates NPY receptor subtypes in vitro. *Am J Physiol*, 1990. 259(1 Pt 1): p. E131-9.
317. Michell, B.J., Z. Chen, T. Tiganis, D. Stapleton, F. Katsis, D.A. Power, A.T. Sim, and B.E. Kemp, Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2001. 276(21): p. 17625-8.
318. Mihara, S., Y. Shigeri, and M. Fujimoto, Neuropeptide Y-induced intracellular Ca²⁺ increases in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1989. 259(1): p. 79-82.
319. Milenkovic, I., M. Weick, P. Wiedemann, A. Reichenbach, and A. Bringmann, Neuropeptide Y-evoked proliferation of retinal glial (Muller) cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2004. 242(11): p. 944-50.
320. Minth, C.D., S.R. Bloom, J.M. Polak, and J.E. Dixon, Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(14): p. 4577-81.
321. Misra, S., K.S. Murthy, H. Zhou, and J.R. Grider, Coexpression of Y1, Y2, and Y4 receptors in smooth muscle coupled to distinct signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004. 311(3): p. 1154-62.

Referências Bibliográficas

322. Moldoveanu, A.I., R.J. Shephard, and P.N. Shek, Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol*, 2000. 89(4): p. 1499-504.
323. Moller, K. and F. Sundler, Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Regul Pept*, 1996. 63(2-3): p. 129-39.
324. Moniri, N.H. and R.G. Booth, Role of PKA and PKC in histamine H1 receptor-mediated activation of catecholamine neurotransmitter synthesis. *Neurosci Lett*, 2006. 407(3): p. 249-53.
325. Morita, K., T. Dohi, S. Kitayama, Y. Koyama, and A. Tsujimoto, Stimulation-evoked Ca²⁺ fluxes in cultured bovine adrenal chromaffin cells are enhanced by forskolin. *J Neurochem*, 1987. 48(1): p. 248-52.
326. Morita, K., T. Miyasako, S. Kitayama, and T. Dohi, Interleukin-1 inhibits voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channel associated with the inhibition of the rise of intracellular free Ca²⁺ concentration and catecholamine release in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1673(3): p. 160-9.
327. Morita, K., K. Teraoka, and M. Oka, Interaction of cytoplasmic tyrosine hydroxylase with chromaffin granule. In vitro studies on association of soluble enzyme with granule membranes and alteration in enzyme activity. *J Biol Chem*, 1987. 262(12): p. 5654-8.
328. Movafagh, S., J.P. Hobson, S. Spiegel, H.K. Kleinman, and Z. Zukowska, Neuropeptide Y induces migration, proliferation, and tube formation of endothelial cells bimodally via Y1, Y2, and Y5 receptors. *Faseb J*, 2006. 20(11): p. 1924-6.
329. Murthy, K.S., C. Severi, J.R. Grider, and G.M. Makhlof, Inhibition of IP3 and IP3-dependent Ca²⁺ mobilization by cyclic nucleotides in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol*, 1993. 264(5 Pt 1): p. G967-74.
330. Muzio, M., N. Polentarutti, M. Sironi, G. Poli, L. De Gioia, M. Introna, A. Mantovani, and F. Colotta, Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. *J Exp Med*, 1995. 182(2): p. 623-8.
331. Nagamoto-Combs, K., K.M. Piech, J.A. Best, B. Sun, and A.W. Tank, Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J Biol Chem*, 1997. 272(9): p. 6051-8.
332. Nagatsu, I., N. Karasawa, K. Yamada, M. Sakai, T. Fujii, T. Takeuchi, R. Arai, K. Kobayashi, and T. Nagatsu, Expression of human tyrosine hydroxylase-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) fusion gene in the brains of transgenic mice as examined by CAT immunocytochemistry. *J Neural Transm Gen Sect*, 1994. 96(2): p. 85-104.
333. Nagatsu, T., Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem*, 1995. 30: p. 15-35.
334. Najimi, M., J.J. Robert, J. Mallet, W. Rostene, and P. Forgez, Neurotensin induces tyrosine hydroxylase gene activation through nitric oxide and protein kinase C signaling pathways. *Mol Pharmacol*, 2002. 62(3): p. 647-53.
335. Nakane, M., J. Mitchell, U. Forstmann, and F. Murad, Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 180(3): p. 1396-402.
336. Nanmoku, T., K. Takekoshi, T. Fukuda, K. Isobe, S. Shibuya, and Y. Kawakami, Urocortin stimulates tyrosine hydroxylase activity via the cAMP/protein kinase a pathway in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci Lett*, 2005. 382(1-2): p. 124-7.
337. Nanobashvili, A., D.P. Woldbye, H. Husum, T.G. Bolwig, and M. Kokaia, Neuropeptide Y Y5 receptors suppress in vitro spontaneous epileptiform bursting in the rat hippocampus. *Neuroreport*, 2004. 15(2): p. 339-43.
338. Nathan, C., Nitric oxide and biopterin: a study in Chiaroscuro. *J Clin Invest*, 1994. 93(5): p. 1875-6.
339. Nava, E., G. Noll, and T.F. Luscher, Nitric oxide in cardiovascular diseases. *Ann Med*, 1995. 27(3): p. 343-51.
340. Nie, M. and L.A. Selbie, Neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase activity. *Regul Pept*, 1998. 75-76: p. 207-13.

341. Nilsson, T., H. Lind, J. Brunkvall, and L. Edvinsson, Vasodilation in human subcutaneous arteries induced by neuropeptide Y is mediated by neuropeptide Y Y1 receptors and is nitric oxide dependent. *Can J Physiol Pharmacol*, 2000. 78(3): p. 251-5.
342. Nishizuka, Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992. 258(5082): p. 607-14.
343. Norenberg, W., M. Bek, N. Limberger, K. Takeda, and P. Illes, Inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells by Y3-type neuropeptide Y receptors via the adenylate cyclase/protein kinase A system. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1995. 351(4): p. 337-47.
344. Nunokawa, Y., N. Ishida, and S. Tanaka, Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 191(1): p. 89-94.
345. Nussdorfer, G.G. and G. Mazzocchi, Immune-endocrine interactions in the mammalian adrenal gland: facts and hypotheses. *Int Rev Cytol*, 1998. 183: p. 143-84.
346. O'Connor, D.T., Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum. *Regul Pept*, 1983. 6(3): p. 263-80.
347. O'Farrell, M. and P.D. Marley, Different contributions of voltage-sensitive Ca²⁺ channels to histamine-induced catecholamine release and tyrosine hydroxylase activation in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 1999. 25(3): p. 209-17.
348. O'Farrell, M. and P.D. Marley, Differential control of tyrosine hydroxylase activation and catecholamine secretion by voltage-operated Ca²⁺ channels in bovine chromaffin cells. *J Neurochem*, 2000. 74(3): p. 1271-8.
349. O'Malley, K.L., M.J. Anhalt, B.M. Martin, J.R. Kelsoe, S.L. Winfield, and E.I. Ginns, Isolation and characterization of the human tyrosine hydroxylase gene: identification of 5' alternative splice sites responsible for multiple mRNAs. *Biochemistry*, 1987. 26(22): p. 6910-4.
350. O'Neill, L.A. and C.A. Dinarello, The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*, 2000. 21(5): p. 206-9.
351. O'Neill, L.A. and C. Greene, Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol*, 1998. 63(6): p. 650-7.
352. O'Sullivan, A.J. and R.D. Burgoyne, A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci Rep*, 1989. 9(2): p. 243-52.
353. O'Sullivan, A.J. and R.D. Burgoyne, Cyclic GMP regulates nicotine-induced secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells: effects of 8-bromo-cyclic GMP, atrial natriuretic peptide, and nitroprusside (nitric oxide). *J Neurochem*, 1990. 54(5): p. 1805-8.
354. Oh, S.J., I. D'Angelo, E.J. Lee, M.H. Chun, and N.C. Brecha, Distribution and synaptic connectivity of neuropeptide Y-immunoreactive amacrine cells in the rat retina. *J Comp Neurol*, 2002. 446(3): p. 219-34.
355. Ohlsson, K., P. Bjork, M. Bergenfeldt, R. Hageman, and R.C. Thompson, Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*, 1990. 348(6301): p. 550-2.
356. Onuoha Phillips, G.N., A. Ritchie, and D.P. Nicholls, Distribution of calcitonin gene-related peptide, atrial natriuretic peptide and neuropeptide Y in the rat heart. *Cardiology*, 1998. 90(2): p. 95-100.
357. Osamura, R.Y., Y. Tsutsumi, N. Yanaihara, H. Imura, and K. Watanabe, Immunohistochemical studies for multiple peptide-immunoreactivities and co-localization of Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8, neuropeptide Y and somatostatin in human adrenal medulla and pheochromocytomas. *Peptides*, 1987. 8(1): p. 77-87.
358. Oset-Gasque, M.J., M. Parramon, S. Hortelano, L. Bosca, and M.P. Gonzalez, Nitric oxide implication in the control of neurosecretion by chromaffin cells. *J Neurochem*, 1994. 63(5): p. 1693-700.
359. Oset-Gasque, M.J., S. Vicente, M.P. Gonzalez, L.M. Rosario, and E. Castro, Segregation of nitric oxide synthase expression and calcium response to nitric oxide in adrenergic and noradrenergic bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 1998. 83(1): p. 271-80.

Referências Bibliográficas

360. Otori, Y., F.A. Cagampang, S. Yamazaki, S.T. Inouye, T. Mano, and Y. Tano, Circadian rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the iris-ciliary body of the rat. *Curr Eye Res*, 1993. 12(9): p. 803-7.
361. Paczkowski, F.A., L.J. Bryan-Lluka, P. Porzgen, M. Bruss, and H. Bonisch, Comparison of the pharmacological properties of cloned rat, human, and bovine norepinephrine transporters. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 290(2): p. 761-7.
362. Palacios, M., R.G. Knowles, R.M. Palmer, and S. Moncada, Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. 165(2): p. 802-9.
363. Palfrey, H.C. and C.R. Artalejo, Secretion: kiss and run caught on film. *Curr Biol*, 2003. 13(10): p. R397-9.
364. Panula, P., M. Kaartinen, M. Macklin, and E. Costa, Histamine-containing peripheral neuronal and endocrine systems. *J Histochem Cytochem*, 1985. 33(9): p. 933-41.
365. Parker, S.L., M.S. Parker, I. Lundell, A. Balasubramaniam, A. Buschauer, J.K. Kane, A. Yalcin, and M.M. Berglund, Agonist internalization by cloned Y1 neuropeptide Y (NPY) receptor in Chinese hamster ovary cells shows strong preference for NPY, endosome-linked entry and fast receptor recycling. *Regul Pept*, 2002. 107(1-3): p. 49-62.
366. Parker, S.L., M.S. Parker, T. Sweatman, and W.R. Crowley, Characterization of G protein and phospholipase C-coupled agonist binding to the Y1 neuropeptide Y receptor in rat brain: sensitivity to G protein activators and inhibitors and to inhibitors of phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. 286(1): p. 382-91.
367. Parker, T.L., W.K. Kesse, A.A. Mohamed, and M. Afework, The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat*, 1993. 183 (Pt 2): p. 265-76.
368. Peeters, A.C., M.G. Netea, M.C. Janssen, B.J. Kullberg, J.W. Van der Meer, and T. Thien, Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur J Clin Invest*, 2001. 31(1): p. 31-6.
369. Pelto-Huikko, M., Immunocytochemical localization of neuropeptides in the adrenal medulla. *J Electron Microsc Tech*, 1989. 12(4): p. 364-79.
370. Perregaux, D.G., P. McNiff, R. Laliberte, M. Conklyn, and C.A. Gabel, ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol*, 2000. 165(8): p. 4615-23.
371. Perrin, D., A. Gernsheusen, H.D. Soling, W. Wuttke, and H. Jarry, Enhanced cAMP production mediates the stimulatory action of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on in vitro catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995. 103(2): p. 81-7.
372. Pevsner, J., S.C. Hsu, J.E. Braun, N. Calakos, A.E. Ting, M.K. Bennett, and R.H. Scheller, Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron*, 1994. 13(2): p. 353-61.
373. Phillips, J.K., R. Dubey, E. Sesiashvilvi, M. Takeda, D.L. Christie, and J. Lipski, Differential expression of the noradrenaline transporter in adrenergic chromaffin cells, ganglion cells and nerve fibres of the rat adrenal medulla. *J Chem Neuroanat*, 2001. 21(1): p. 95-104.
374. Piech-Dumas, K.M., J.A. Best, Y. Chen, K. Nagamoto-Combs, C.A. Osterhout, and A.W. Tank, The cAMP responsive element and CREB partially mediate the response of the tyrosine hydroxylase gene to phorbol ester. *J Neurochem*, 2001. 76(5): p. 1376-85.
375. Ping, P., H. Takano, J. Zhang, X.L. Tang, Y. Qiu, R.C. Li, S. Banerjee, B. Dawn, Z. Balafonova, and R. Bolli, Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res*, 1999. 84(5): p. 587-604.
376. Plevin, R. and M.R. Boarder, Stimulation of formation of inositol phosphates in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells by angiotensin II, histamine, bradykinin, and carbachol. *J Neurochem*, 1988. 51(2): p. 634-41.
377. Pocotte, S.L., R.W. Holz, and T. Ueda, Cholinergic receptor-mediated phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, 1986. 46(2): p. 610-22.

378. Ponerly, A.S. and E. Adeghate, Distribution of NPY and SP and their effects on glucagon secretion from the in vitro normal and diabetic pancreatic tissues. *Peptides*, 2000. 21(10): p. 1503-9.
379. Pousset, F., R. Dantzer, K.W. Kelley, and P. Parnet, Interleukin-1 signaling in mouse astrocytes involves Akt: a study with interleukin-4 and IL-10. *Eur Cytokine Netw*, 2000. 11(3): p. 427-34.
380. Prieto, D., C. Buus, M.J. Mulvany, and H. Nilsson, Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries: role of membrane potential. *J Physiol*, 1997. 502 (Pt 2): p. 281-92.
381. Prieto, D., M. Hernandez, L. Rivera, A. Garcia-Sacristan, and U. Simonsen, Distribution and functional effects of neuropeptide Y on equine ureteral smooth muscle and resistance arteries. *Regul Pept*, 1997. 69(3): p. 155-65.
382. Prieto, I., F. Jimenez, M.A. Aller, M.P. Nava, E. Vara, C. Garcia, and J. Arias, Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide: induction of liver megamitochondria in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Surg*, 2005. 29(7): p. 903-8.
383. Pruss, R.M., E. Mezey, D.S. Forman, L.E. Eiden, A.J. Hotchkiss, D.A. DiMaggio, and T.L. O'Donohue, Enkephalin and neuropeptide Y: two colocalized neuropeptides are independently regulated in primary cultures of bovine chromaffin cells. *Neuropeptides*, 1986. 7(4): p. 315-27.
384. Ramonet, D., M. Rodriguez, J. Saura, J.M. Lizcano, M. Romera, M. Unzeta, C. Finch, E. Billett, and N. Mahy, Localization of monoamine oxidase A and B and semicarbazide-sensitive amine oxidase in human peripheral tissues. *Inflammopharmacology*, 2003. 11(2): p. 111-7.
385. Ramsey, A.J. and P.F. Fitzpatrick, Effects of phosphorylation on binding of catecholamines to tyrosine hydroxylase: specificity and thermodynamics. *Biochemistry*, 2000. 39(4): p. 773-8.
386. Raposinho, P.D., P. Broqua, A. Hayward, K. Akinsanya, R. Galyean, C. Schteingart, J. Junien, and M.L. Aubert, Stimulation of the gonadotropic axis by the neuropeptide Y receptor Y1 antagonist/Y4 agonist 1229U91 in the male rat. *Neuroendocrinology*, 2000. 71(1): p. 2-7.
387. Raposinho, P.D., P. Broqua, D.D. Pierroz, A. Hayward, Y. Dumont, R. Quirion, J.L. Junien, and M.L. Aubert, Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype. *Endocrinology*, 1999. 140(9): p. 4046-55.
388. Redrobe, J.P., Y. Dumont, A. Fournier, and R. Quirion, The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 2002. 26(5): p. 615-24.
389. Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao, and M. Rothe, Identification and characterization of an IkkappaB kinase. *Cell*, 1997. 90(2): p. 373-83.
390. Renshaw, D., L.M. Thomson, M. Carroll, S. Kapas, and J.P. Hinson, Actions of neuropeptide Y on the rat adrenal cortex. *Endocrinology*, 2000. 141(1): p. 169-73.
391. Rettenbacher, M. and J.C. Reubi, Localization and characterization of neuropeptide receptors in human colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2001. 364(4): p. 291-304.
392. Reubi, J.C., M. Gugger, B. Waser, and J.C. Schaer, Y(1)-mediated effect of neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets. *Cancer Res*, 2001. 61(11): p. 4636-41.
393. Richards, J.P., H.P. Bachinger, R.H. Goodman, and R.G. Brennan, Analysis of the structural properties of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and phosphorylated CREB. *J Biol Chem*, 1996. 271(23): p. 13716-23.
394. Rodriguez-Pascual, F., R. Ferrero, M.T. Miras-Portugal, and M. Torres, Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cGMP-dependent protein kinase in intact bovine chromaffin cells. *Arch Biochem Biophys*, 1999. 366(2): p. 207-14.
395. Rodriguez-Pascual, F., M.T. Miras-Portugal, and M. Torres, Cyclic GMP-dependent protein kinase activation mediates inhibition of catecholamines secretion and Ca²⁺ influx in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 1995. 67(1): p. 149-57.
396. Rodriguez-Pascual, F., M.T. Miras-Portugal, and M. Torres, Effect of cyclic GMP-increasing agents nitric oxide and C-type natriuretic peptide on bovine chromaffin cell function: inhibitory role mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol*, 1996. 49(6): p. 1058-70.

Referências Bibliográficas

397. Rodriguez, M.J., J. Saura, E. Billett, C. Finch, and N. Mahy, MAO-A and MAO-B localisation in human lung and spleen. *Neurobiology (Bp)*, 2000. 8(3-4): p. 243-8.
398. Rodriguez, M.J., J. Saura, E.E. Billett, C.C. Finch, and N. Mahy, Cellular localization of monoamine oxidase A and B in human tissues outside of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 2001. 304(2): p. 215-20.
399. Rodriguez, M.J., J. Saura, C.C. Finch, N. Mahy, and E.E. Billett, Localization of monoamine oxidase A and B in human pancreas, thyroid, and adrenal glands. *J Histochem Cytochem*, 2000. 48(1): p. 147-51.
400. Roth, J.A., Membrane-bound catechol-O-methyltransferase: a reevaluation of its role in the O-methylation of the catecholamine neurotransmitters. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1992. 120: p. 1-29.
401. Rozanski, A., J.A. Blumenthal, and J. Kaplan, Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*, 1999. 99(16): p. 2192-217.
402. Rubbo, H., V. Darley-Usmar, and B.A. Freeman, Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol*, 1996. 9(5): p. 809-20.
403. Sajdyk, T.J., M.G. Vandergriff, and D.R. Gehlert, Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. *Eur J Pharmacol*, 1999. 368(2-3): p. 143-7.
404. Saklatvala, J., L.M. Rawlinson, C.J. Marshall, and M. Kracht, Interleukin 1 and tumour necrosis factor activate the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase in cultured cells. *FEBS Lett*, 1993. 334(2): p. 189-92.
405. Salvatore, M.F., J.C. Waymire, and J.W. Haycock, Depolarization-stimulated catecholamine biosynthesis: involvement of protein kinases and tyrosine hydroxylase phosphorylation sites in situ. *J Neurochem*, 2001. 79(2): p. 349-60.
406. Satoh, F., K. Takahashi, O. Murakami, K. Totsune, M. Ohneda, Y. Mizuno, M. Sone, Y. Miura, S. Takase, Y. Hayashi, H. Sasano, and T. Mouri, Cerebellin and cerebellin mRNA in the human brain, adrenal glands and the tumour tissues of adrenal tumour, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *J Endocrinol*, 1997. 154(1): p. 27-34.
407. Schalling, M., A. Dagerlind, S. Brene, H. Hallman, M. Djurfeldt, H. Persson, L. Terenius, M. Goldstein, D. Schlesinger, and T. Hokfelt, Coexistence and gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptide tyrosine in the rat and bovine adrenal gland: effects of reserpine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(21): p. 8306-10.
408. Schalling, M., K. Seroogy, T. Hokfelt, S.Y. Chai, H. Hallman, H. Persson, D. Larhammar, A. Ericsson, L. Terenius, J. Graffi, and et al., Neuropeptide tyrosine in the rat adrenal gland--immunohistochemical and in situ hybridization studies. *Neuroscience*, 1988. 24(1): p. 337-49.
409. Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G.X. Wang, H.D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, and P. Ruth, Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*, 2000. 404(6774): p. 197-201.
410. Schmidt, H.H., J.S. Pollock, M. Nakane, U. Forstermann, and F. Murad, Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium*, 1992. 13(6-7): p. 427-34.
411. Schultzberg, M., C. Andersson, A. Unden, M. Troye-Blomberg, S.B. Svenson, and T. Bartfai, Interleukin-1 in adrenal chromaffin cells. *Neuroscience*, 1989. 30(3): p. 805-10.
412. Schultzberg, M., S. Tingsborg, S. Nobel, J. Lundkvist, S. Svenson, A. Simoncsits, and T. Bartfai, Interleukin-1 receptor antagonist protein and mRNA in the rat adrenal gland. *J Interferon Cytokine Res*, 1995. 15(8): p. 721-9.
413. Schwartz, T.W., J. Fuhlendorff, L.L. Kjems, M.S. Kristensen, M. Vervelde, M. O'Hare, J.L. Krstenansky, and B. Bjornholm, Signal epitopes in the three-dimensional structure of neuropeptide Y. Interaction with Y1, Y2, and pancreatic polypeptide receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. 611: p. 35-47.
414. Schwarz, P.M., F. Rodriguez-Pascual, D. Koesling, M. Torres, and U. Forstermann, Functional coupling of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in controlling catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 1998. 82(1): p. 255-65.

415. Seifert, P., S. Stuppi, M. Spitznas, and E. Weihe, Differential distribution of neuronal markers and neuropeptides in the human lacrimal gland. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1996. 234(4): p. 232-40.
416. Selbie, L.A., K. Darby, C. Schmitz-Peiffer, C.L. Browne, H. Herzog, J. Shine, and T.J. Biden, Synergistic interaction of Y1-neuropeptide Y and alpha 1b-adrenergic receptors in the regulation of phospholipase C, protein kinase C, and arachidonic acid production. *J Biol Chem*, 1995. 270(20): p. 11789-96.
417. Sena, C.M., A.R. Tome, R.M. Santos, and L.M. Rosario, Protein kinase C activator inhibits voltage-sensitive Ca²⁺ channels and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*, 1995. 359(2-3): p. 137-41.
418. Shah, P., B.B. Nankova, S. Parab, and E.F. La Gamma, Short chain fatty acids induce TH gene expression via ERK-dependent phosphorylation of CREB protein. *Brain Res*, 2006. 1107(1): p. 13-23.
419. Sheng, M., G. McFadden, and M.E. Greenberg, Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*, 1990. 4(4): p. 571-82.
420. Shepherd, S.P. and M.A. Holzwarth, Chromaffin-adrenocortical cell interactions: effects of chromaffin cell activation in adrenal cell cocultures. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 280(1): p. C61-71.
421. Sheriff, S., F.Q. A, T.C. W, J.W. Kasckow, and A. Balasubramaniam, Predominant role by CaM kinase in NPY Y(1) receptor signaling: involvement of CREB [corrected]. *Peptides*, 2002. 23(1): p. 87-96.
422. Sheriff, S., R. Dayal, J. Kasckow, A. Regmi, W. Chance, J. Fischer, and A. Balasubramaniam, NPY upregulates genes containing cyclic AMP response element in human neuroblastoma cell lines bearing Y1 and Y2 receptors: involvement of CREB. *Regul Pept*, 1998. 75-76: p. 309-18.
423. Shigeri, Y. and M. Fujimoto, Two different signal transductions of neuropeptide Y1 receptor in SK-N-MC cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 187(3): p. 1565-71.
424. Shimoda, K., G.H. Shen, R.F. Pfeiffer, R.D. McComb, and H.Y. Yang, Antiserum against neuropeptide Y enhances the nicotine-mediated release of catecholamines from cultured rat adrenal chromaffin cells. *Neurochem Int*, 1993. 23(1): p. 71-7.
425. Shoji-Kasai, Y., M. Itakura, M. Kataoka, S. Yamamori, and M. Takahashi, Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *Eur J Neurosci*, 2002. 15(8): p. 1390-4.
426. Shono, M., H. Houchi, M. Oka, and Y. Nakaya, Effects of nitroprusside and nicorandil on catecholamine secretion and calcium mobilization in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997. 30(4): p. 419-23.
427. Siddiq, A., M. Gueorguiev, C. Samson, S. Hercberg, B. Heude, C. Levy-Marchal, B. Jouret, J. Weill, D. Meyre, A. Walley, and P. Froguel, Single nucleotide polymorphisms in the neuropeptide Y2 receptor (NPY2R) gene and association with severe obesity in French white subjects. *Diabetologia*, 2007.
428. Silva, A.P., A.P. Carvalho, C.M. Carvalho, and J.O. Malva, Functional interaction between neuropeptide Y receptors and modulation of calcium channels in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 2003. 44(2): p. 282-92.
429. Silva, A.P., J.E. Kaufmann, C. Vivancos, S. Fakan, C. Cavadas, P. Shaw, H.R. Brunner, U. Vischer, and E. Grouzmann, Neuropeptide Y expression, localization and cellular transducing effects in HUVEC. *Biol Cell*, 2005. 97(6): p. 457-67.
430. Silva, A.P., S. Xapelli, E. Grouzmann, and C. Cavadas, The putative neuroprotective role of neuropeptide Y in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005. 4(4): p. 331-47.
431. Sinclair, J.R. and S. Nirenberg, Characterization of neuropeptide Y-expressing cells in the mouse retina using immunohistochemical and transgenic techniques. *J Comp Neurol*, 2001. 432(3): p. 296-306.
432. Sivasubramaniam, S.D., C.C. Finch, M.J. Rodriguez, N. Mahy, and E.E. Billett, A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B mRNA and protein in non-CNS human tissues. *Cell Tissue Res*, 2003. 313(3): p. 291-300.

Referências Bibliográficas

433. Smith, C., T. Moser, T. Xu, and E. Neher, Cytosolic Ca²⁺ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron*, 1998. 20(6): p. 1243-53.
434. Solle, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths, and C.A. Gabel, Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*, 2001. 276(1): p. 125-32.
435. Sollner, T., M.K. Bennett, S.W. Whiteheart, R.H. Scheller, and J.E. Rothman, A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 1993. 75(3): p. 409-18.
436. Sollner, T., S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman, SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 1993. 362(6418): p. 318-24.
437. Stansfeld, S.A., R. Fuhrer, M.J. Shipley, and M.G. Marmot, Psychological distress as a risk factor for coronary heart disease in the Whitehall II Study. *Int J Epidemiol*, 2002. 31(1): p. 248-55.
438. Steiner, H.J., K.W. Schmid, R. Fischer-Colbrie, G. Sperk, and H. Winkler, Co-localization of chromogranin A and B, secretogranin II and neuropeptide Y in chromaffin granules of rat adrenal medulla studied by electron microscopic immunocytochemistry. *Histochemistry*, 1989. 91(6): p. 473-7.
439. Stern, A.S., R.V. Lewis, S. Kimura, J. Rossier, L.D. Gerber, L. Brink, S. Stein, and S. Udenfriend, Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin [Arg6,Phe7] from bovine adrenal medullary granules and striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(12): p. 6680-3.
440. Sternberg, E.M., Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest*, 1997. 100(11): p. 2641-7.
441. Strand, I., *Neuropeptides: regulators of Physiological processes*. MIT Press. 1999, England. 43-64.
442. Strub, J.M., P. Garcia-Sablone, K. Lonning, L. Taupenot, P. Hubert, A. Van Dorselaer, D. Aunis, and M.H. Metz-Boutigue, Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity. *Eur J Biochem*, 1995. 229(2): p. 356-68.
443. Sutton, R.B., D. Fasshauer, R. Jahn, and A.T. Brunger, Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1998. 395(6700): p. 347-53.
444. Suzuki, T., H. Kurahashi, and H. Ichinose, Ras/MEK pathway is required for NGF-induced expression of tyrosine hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(2): p. 389-96.
445. T. Fujita, T.K., S. Kobayahi S, *The paraneuron*. Springer-Verlag. 1988, Tokio.
446. Tabarin, A., D. Chen, R. Hakanson, and F. Sundler, Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the adrenal gland of mammals: distribution, characterization and responses to drugs. *Neuroendocrinology*, 1994. 59(2): p. 113-9.
447. Takekoshi, K., K. Ishii, Y. Kawakami, K. Isobe, T. Nanmoku, and T. Nakai, Ca(2+) mobilization, tyrosine hydroxylase activity, and signaling mechanisms in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells: effects of leptin. *Endocrinology*, 2001. 142(1): p. 290-8.
448. Takekoshi, K., K. Ishii, T. Nanmoku, S. Shibuya, Y. Kawakami, K. Isobe, and T. Nakai, Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology*, 2001. 142(11): p. 4861-71.
449. Takiyyuddin, M.A., M.R. Brown, T.Q. Dinh, J.H. Cervenka, S.D. Braun, R.J. Parmer, B. Kennedy, and D.T. O'Connor, Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J Auton Pharmacol*, 1994. 14(3): p. 187-200.
450. Tan, K.S., A.G. Nackley, K. Satterfield, W. Maixner, L. Diatchenko, and P.M. Flood, beta(2) adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal*, 2007. 19(2): p. 251-60.
451. Tanaka, K. and T. Chiba, Ultrastructural localization of nerve terminals containing nitric oxide synthase in rat adrenal gland. *Neurosci Lett*, 1996. 204(3): p. 153-6.
452. Tanaka, K., I. Shibuya, T. Nagamoto, H. Yamashita, and T. Kanno, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide causes rapid Ca²⁺ release from intracellular stores and long lasting Ca²⁺ influx

- mediated by Na⁺ influx-dependent membrane depolarization in bovine adrenal chromaffin cells. *Endocrinology*, 1996. 137(3): p. 956-66.
453. Tatemoto, K., M. Carlquist, and V. Mutt, Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 1982. 296(5858): p. 659-60.
454. Taylor, S.C., K.N. Green, E. Carpenter, and C. Peers, Protein kinase C evokes quantal catecholamine release from PC12 cells via activation of L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, 2000. 275(35): p. 26786-91.
455. Terado, M., M. Nomura, K. Mineta, N. Fujimoto, and T. Matsumoto, Expression of Neuropeptide Y gene in mouse testes during testicular development. *Asian J Androl*, 2006. 8(4): p. 443-9.
456. Teraoka, H., T. Sugawara, and Y. Nakazato, Difference in the effectiveness of Ca²⁺ to evoke catecholamine secretion between adrenaline- and noradrenaline-containing cells of bovine adrenal medulla. *J Neurochem*, 1993. 60(5): p. 1936-40.
457. TerBush, D.R. and R.W. Holz, Effects of phorbol esters, diglyceride, and cholinergic agonists on the subcellular distribution of protein kinase C in intact or digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*, 1986. 261(36): p. 17099-106.
458. TerBush, D.R. and R.W. Holz, Activation of protein kinase C is not required for exocytosis from bovine adrenal chromaffin cells. The effects of protein kinase C(19-31), Ca/CaM kinase II(291-317), and staurosporine. *J Biol Chem*, 1990. 265(34): p. 21179-84.
459. Terenghi, G., J.M. Polak, I.M. Vamdell, Y.C. Lee, J. Wharton, and S.R. Bloom, Neurotensin-like immunoreactivity in a subpopulation of noradrenaline-containing cells of the cat adrenal gland. *Endocrinology*, 1983. 112(1): p. 226-33.
460. Teschemacher, A.G. and E.P. Seward, Bidirectional modulation of exocytosis by angiotensin II involves multiple G-protein-regulated transduction pathways in chromaffin cells. *J Neurosci*, 2000. 20(13): p. 4776-85.
461. Thiele, T.E., M.T. Koh, and T. Pedrazzini, Voluntary alcohol consumption is controlled via the neuropeptide Y Y1 receptor. *J Neurosci*, 2002. 22(3): p. RC208.
462. Thomas, G., J. Haavik, and P. Cohen, Participation of a stress-activated protein kinase cascade in the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells. *Eur J Biochem*, 1997. 247(3): p. 1180-9.
463. Thorpe, D.S. and D.L. Garbers, The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J Biol Chem*, 1989. 264(11): p. 6545-9.
464. Tischler, A.S., Y.C. Lee, R.L. Perlman, D. Costopoulos, V.W. Slayton, and S.R. Bloom, Production of "ectopic" vasoactive intestinal peptide-like and neurotensin-like immunoreactivity in human pheochromocytoma cell cultures. *J Neurosci*, 1984. 4(5): p. 1398-404.
465. Torekov, S.S., L.H. Larsen, G. Andersen, A. Albrechtsen, C. Glumer, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, T. Hansen, and O. Pedersen, Variants in the 5' region of the neuropeptide Y receptor Y2 gene (NPY2R) are associated with obesity in 5,971 white subjects. *Diabetologia*, 2006. 49(11): p. 2653-8.
466. Torres, M., G. Ceballos, and R. Rubio, Possible role of nitric oxide in catecholamine secretion by chromaffin cells in the presence and absence of cultured endothelial cells. *J Neurochem*, 1994. 63(3): p. 988-96.
467. Toska, K., R. Kleppe, C.G. Armstrong, N.A. Morrice, P. Cohen, and J. Haavik, Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *J Neurochem*, 2002. 83(4): p. 775-83.
468. Treiman, M., W. Weber, and M. Gratzl, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate- and Ca²⁺-calmodulin-dependent endogenous protein phosphorylation activity in membranes of the bovine chromaffin secretory vesicles: identification of two phosphorylated components as tyrosine hydroxylase and protein kinase regulatory subunit type II. *J Neurochem*, 1983. 40(3): p. 661-9.
469. Trifaro, J.M. and M.L. Vitale, Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci*, 1993. 16(11): p. 466-72.
470. Tschopp, J., F. Martinon, and K. Burns, NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(2): p. 95-104.

Referências Bibliográficas

471. Tsutsui, M., N. Yanagihara, E. Miyamoto, A. Kuroiwa, and F. Izumi, Correlation of activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with catecholamine secretion and tyrosine hydroxylase activation in cultured bovine adrenal medullary cells. *Mol Pharmacol*, 1994. 46(6): p. 1041-7.
472. Turquier, V., H. Vaudry, L. Yon, C.M. Hsu, D. Ait-Ali, L. Grumolato, L.E. Eiden, and Y. Anouar, Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1alpha stimulate neuropeptide gene expression in adrenochromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 971: p. 45-8.
473. Uchiyama, Y., K. Morita, S. Kitayama, T. Suemitsu, N. Minami, T. Miyasako, and T. Dohi, Possible involvement of nitric oxide in acetylcholine-induced increase of intracellular Ca²⁺ concentration and catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *Jpn J Pharmacol*, 1994. 65(1): p. 73-7.
474. Uciechowski, P., J. Saklatvala, J. von der Ohe, K. Resch, M. Szamel, and M. Kracht, Interleukin 1 activates jun N-terminal kinases JNK1 and JNK2 but not extracellular regulated MAP kinase (ERK) in human glomerular mesangial cells. *FEBS Lett*, 1996. 394(3): p. 273-8.
475. van Biesen, T., L.M. Luttrell, B.E. Hawes, and R.J. Lefkowitz, Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 1996. 17(6): p. 698-714.
476. Vanderheyden, P.M., I. Van Liefde, J.P. de Backer, and G. Vauquelin, [3H]-BIBP3226 and [3H]-NPY binding to intact SK-N-MC cells and CHO cells expressing the human Y1 receptor. *J Recept Signal Transduct Res*, 1998. 18(4-6): p. 363-85.
477. Vanderheyden, P.M., I. Van Liefde, J.P. DeBacker, G. Ebinger, and G. Vauquelin, Effect of BIBP3226 on inositol phosphate accumulation and cytosolic calcium level in control and NPY Y1 receptor expressing CHO-K1 cells. *Regul Pept*, 1998. 75-76: p. 191-9.
478. Vanhoof, G., F. Goossens, M.A. Juliano, L. Juliano, D. Hendriks, K. Schatteman, A.H. Lin, and S. Scharpe, Isolation and sequence analysis of a human cDNA clone (XPNPEPL) homologous to X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P). *Cytogenet Cell Genet*, 1997. 78(3-4): p. 275-80.
479. Vardell, I.M., J.M. Polak, J.M. Allen, G. Terenghi, and S.R. Bloom, Neuropeptide tyrosine (NPY) immunoreactivity in norepinephrine-containing cells and nerves of the mammalian adrenal gland. *Endocrinology*, 1984. 114(4): p. 1460-2.
480. Venema, R.C., H. Ju, R. Zou, V.J. Venema, and J.W. Ryan, Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1354(1): p. 45-8.
481. Vicente, S., S. Figueroa, R. Perez-Rodriguez, M.P. Gonzalez, and M.J. Oset-Gasque, Nitric oxide donors induce calcium-mobilisation from internal stores but do not stimulate catecholamine secretion by bovine chromaffin cells in resting conditions. *Cell Calcium*, 2005. 37(2): p. 163-72.
482. Vicente, S., M.P. Gonzalez, and M.J. Oset-Gasque, Neuronal nitric oxide synthase modulates basal catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. *J Neurosci Res*, 2002. 69(3): p. 327-40.
483. Vigers, G.P., L.J. Anderson, P. Caffes, and B.J. Brandhuber, Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature*, 1997. 386(6621): p. 190-4.
484. Vincent, S.R., C.H. McIntosh, P.B. Reiner, and J.C. Brown, Somatostatin immunoreactivity in the cat adrenal medulla. Localization and characterization. *Histochemistry*, 1987. 87(5): p. 483-6.
485. Volpe, F., J. Clatworthy, A. Kaptein, B. Maschera, A.M. Griffin, and K. Ray, The IL1 receptor accessory protein is responsible for the recruitment of the interleukin-1 receptor associated kinase to the IL1/IL1 receptor I complex. *FEBS Lett*, 1997. 419(1): p. 41-4.
486. Vyas, S., N. Faucon Biguet, and J. Mallet, Transcriptional and post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase gene by protein kinase C. *Embo J*, 1990. 9(11): p. 3707-12.
487. Waeber, G., J. Hurlimann, P. Nicod, and E. Grouzmann, Immunolocalization of neuropeptide Y in human pancreatic endocrine tumors. *Peptides*, 1995. 16(5): p. 921-6.
488. Wahlestedt, C., L. Grundemar, R. Hakanson, M. Heilig, G.H. Shen, Z. Zukowska-Grojec, and D.J. Reis, Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. 611: p. 7-26.
489. Wahlestedt, C., S. Regunathan, and D.J. Reis, Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci*, 1992. 50(4): p. PL7-12.
490. Wahlestedt, C. and D.J. Reis, Neuropeptide Y-related peptides and their receptors--are the receptors potential therapeutic drug targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1993. 33: p. 309-52.

491. Wakade, A.R., R.K. Malhotra, and T.D. Wakade, Phorbol ester facilitates ^{45}Ca accumulation and catecholamine secretion by nicotine and excess K^+ but not by muscarine in rat adrenal medulla. *Nature*, 1986. 321(6071): p. 698-700.
492. Wang, X., Y. Cui, Z. Chen, and Q. Pan, [Expression of neuropeptide Y in rat testes and its significance]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2004. 10(5): p. 334-6, 339.
493. Warashina, A., Involvement of protein kinase C in homologous desensitization of histamine-evoked secretory responses in rat chromaffin cells. *Brain Res*, 1997. 762(1-2): p. 40-6.
494. Wasowicz, K., Changes in the expression of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine beta-hydroxylase (DBH), galanin (GAL), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and substance P (SP) in the uterine cervix-projecting neurons located in the lumbar paravertebral ganglia of the pig. *Folia Morphol (Warsz)*, 2003. 62(3): p. 219-21.
495. Waymire, J.C., J.P. Johnston, K. Hummer-Lickteig, A. Lloyd, A. Vigny, and G.L. Craviso, Phosphorylation of bovine adrenal chromaffin cell tyrosine hydroxylase. Temporal correlation of acetylcholine's effect on site phosphorylation, enzyme activation, and catecholamine synthesis. *J Biol Chem*, 1988. 263(25): p. 12439-47.
496. Weinberg, D.H., D.J. Sirinathsinghji, C.P. Tan, L.L. Shiao, N. Morin, M.R. Rigby, R.H. Heavens, D.R. Rapoport, M.L. Bayne, M.A. Cascieri, C.D. Strader, D.L. Linemeyer, and D.J. MacNeil, Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16435-8.
497. Weinshenker, D., S.S. White, M.A. Javors, R.D. Palmiter, and P. Szot, Regulation of norepinephrine transporter abundance by catecholamines and desipramine in vivo. *Brain Res*, 2002. 946(2): p. 239-46.
498. Wiest, R., L. Jurzik, L. Moleda, M. Froh, B. Schnabl, S. von Horsten, J. Scholmerich, and R.H. Straub, Enhanced Y1-receptor-mediated vasoconstrictive action of neuropeptide Y (NPY) in superior mesenteric arteries in portal hypertension. *J Hepatol*, 2006. 44(3): p. 512-9.
499. Wink, D.A. and J.B. Mitchell, Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 1998. 25(4-5): p. 434-56.
500. Woldbye, D.P., A. Nanobashvili, A.T. Sorensen, H. Husum, T.G. Bolwig, G. Sorensen, P. Ernfors, and M. Kokaia, Differential suppression of seizures via Y2 and Y5 neuropeptide Y receptors. *Neurobiol Dis*, 2005. 20(3): p. 760-72.
501. Woronicz, J.D., X. Gao, Z. Cao, M. Rothe, and D.V. Goeddel, I κ B kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with I κ B kinase-alpha and NIK. *Science*, 1997. 278(5339): p. 866-9.
502. Worrall, B.B., S. Azhar, P.A. Nyquist, R.H. Ackerman, T.L. Hamm, and T.J. DeGraba, Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2003. 34(3): p. 790-3.
503. Wulle, I. and J. Schnitzer, Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Brain Res Dev Brain Res*, 1989. 48(1): p. 59-72.
504. Xing, J., J.M. Kornhauser, Z. Xia, E.A. Thiele, and M.E. Greenberg, Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(4): p. 1946-55.
505. Xu, Z.Q., J.Y. Lew, K. Harada, K. Aman, M. Goldstein, A. Deutch, J.W. Haycock, and T. Hokfelt, Immunohistochemical studies on phosphorylation of tyrosine hydroxylase in central catecholamine neurons using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Neuroscience*, 1998. 82(3): p. 727-38.
506. Yamamoto, Y., O. Katsumata, S. Furuyama, and H. Sugiyama, Ca^{2+} , calmodulin and phospholipids regulate nitric oxide synthase activity in the rabbit submandibular gland. *J Comp Physiol [B]*, 2004. 174(8): p. 593-9.
507. Yanagihara, N., K. Minami, F. Shirakawa, Y. Uezono, H. Kobayashi, S. Eto, and F. Izumi, Stimulatory effect of IL-1 beta on catecholamine secretion from cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 198(1): p. 81-7.
508. Yanagihara, N., M. Okazaki, T. Terao, Y. Uezono, A. Wada, and F. Izumi, Stimulatory effects of brain natriuretic peptide on cyclic GMP accumulation and tyrosine hydroxylase activity in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1991. 343(3): p. 289-95.

Referências Bibliográficas

509. Yanagihara, N., Y. Uezono, Y. Koda, A. Wada, and F. Izumi, Activation of tyrosine hydroxylase by micromolar concentrations of calcium in digitonin-permeabilized adrenal medullary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 146(2): p. 530-6.
510. Yaron, A. and D. Mlynar, Aminopeptidase-P. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968. 32(4): p. 658-63.
511. Yilmaz, E. and N. Arikan, Changes in neuropeptide y tissue concentration in the wall of the rat urinary bladder after acute distension. *Urol Res*, 2005. 33(1): p. 57-60.
512. Yoshida, K., Y. Mizukami, and M. Kitakaze, Nitric oxide mediates protein kinase C isoform translocation in rat heart during postischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1453(2): p. 230-8.
513. Zhang, P., J. Zheng, R.L. Vorce, and T.D. Hexum, Identification of an NPY-Y1 receptor subtype in bovine chromaffin cells. *Regul Pept*, 2000. 87(1-3): p. 9-13.
514. Zhao, C., Z. Tao, J. Xiao, S. Zhao, and J. Qiao, Histochemical and immunohistochemical studies of distribution of acetylcholinesterase-positive fibers and peptidergic terminals in the nasal mucosa of rats. *Chin Med J (Engl)*, 1998. 111(7): p. 644-7.
515. Zhao, F.L., T. Shen, N. Kaya, S.G. Lu, Y. Cao, and S. Herness, Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(31): p. 11100-5.
516. Zhao, Q., M. Ishibashi, K. Hiasa, C. Tan, A. Takeshita, and K. Egashira, Essential role of vascular endothelial growth factor in angiotensin II-induced vascular inflammation and remodeling. *Hypertension*, 2004. 44(3): p. 264-70.
517. Zhao, S., Q. Li, L. Liu, Z. Xu, and J. Xiao, Simvastatin reduces interleukin-1beta secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Clin Chim Acta*, 2004. 344(1-2): p. 195-200.
518. Zheng, J., P. Zhang, and T.D. Hexum, Neuropeptide Y inhibits chromaffin cell nicotinic receptor-stimulated tyrosine hydroxylase activity through a receptor-linked G protein-mediated process. *Mol Pharmacol*, 1997. 52(6): p. 1027-33.
519. Zheng, J., G. Zhou, and T.D. Hexum, Neuropeptide Y secretion from bovine chromaffin cells inhibits cyclic AMP accumulation. *Life Sci*, 2000. 67(6): p. 617-25.
520. Zhu, J., W. Li, M.L. Toews, and T.D. Hexum, Neuropeptide Y inhibits forskolin-stimulated adenylate cyclase in bovine adrenal chromaffin cells via a pertussis toxin-sensitive process. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992. 263(3): p. 1479-86.
521. Zigmund, R.E., M.A. Schwarzschild, and A.R. Rittenhouse, Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci*, 1989. 12: p. 415-61.
522. Zukowska-Grojec, Z., E. Karwatowska-Prokopczuk, W. Rose, J. Rone, S. Movafagh, H. Ji, Y. Yeh, W.T. Chen, H.K. Kleinman, E. Grouzmann, and D.S. Grant, Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res*, 1998. 83(2): p. 187-95.