

Fernanda Gaspar do Amaral

Perfil diário e os mecanismos de produção de melatonina pela glândula pineal de ratos diabéticos por estreptozotocina

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

São Paulo
2009

RESUMO

AMARAL, F. G. **Perfil diário e os mecanismos de produção de melatonina pela glândula pineal de ratos diabéticos por estreptozotocina.** 2009. 181 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A glândula pineal participa da sincronização do metabolismo do organismo às variações do fotoperíodo através da síntese circadiana e noturna de seu hormônio, a melatonina. Essa indolamina tem sua síntese controlada principalmente pela estimulação noradrenérgica e participa da regulação de funções fundamentais para homeostasia, dentre elas a regulação do metabolismo energético. Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico complexo que envolve carboidratos, lipídeos e proteínas. É caracterizado por hiperglicemia resultante da perda progressiva da secreção ou da ação da insulina. Trabalhos na literatura mostram o papel da melatonina na regulação da sensibilidade periférica à insulina e na regulação da produção e secreção desse hormônio. Em complementação, dados mostram que a insulina potencia a síntese de melatonina induzida por noradrenalina. Diante da possível existência de uma alça regulatória envolvendo ambos hormônios e da controvérsia existente na literatura sobre a síntese de melatonina em modelos experimentais de diabetes, esse trabalho teve como objetivo avaliar as alterações fisiológicas celulares e moleculares da glândula pineal mediante o quadro de diabetes induzido por STZ (60mg/kg, i.p.), 3 e 15 dias pós-indução. Ratos albinos Wistar (250 a 280 g), mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12h/12h, foram utilizados em todos os procedimentos experimentais que envolveram as técnicas de citometria de fluxo, microdiálise, HPLC, dosagem radiométrica de atividade enzimática, PCR em tempo real e western blot. Os resultados encontrados mostraram que o diabetes causa diminuição (50%) e perda do perfil mono/bifásico da síntese pineal de melatonina em ambos dias de estudo. Essa queda não é causada por necrose ou apoptose dos pinealócitos, e reflete um desarranjo no metabolismo pineal que se evidenciou mais claramente pela diminuição pronunciada na atividade da AANAT (55%), resultando diretamente no importante decréscimo observado na síntese do referido indol. Essa redução apresentou-se acompanhada de um desbalanço rítmico de fatores determinantes para o processo, como a expressão do receptor $\beta 1$ e a atividade e expressão das enzimas TPH1 e HIOMT. Além disso, podem ter contribuído de forma importante para o quadro observado tanto a queda da produção de leptina quanto de insulina, intrínsecas ao quadro do diabetes induzido pela estreptozotocina. A menor concentração de melatonina circulante pode ser um fator contribuinte e fundamental para o estabelecimento e desenvolvimento da doença, não só por diminuir a capacidade do organismo de combater o estresse oxidativo, mas também por provocar alterações na organização rítmica circadiana e prejudicar o importante papel exercido pela melatonina na potenciação da ação da insulina.

Palavras-chave: Melatonina. Pineal. Diabetes. Estreptozotocina. AANAT. Microdiálise.

ABSTRACT

AMARAL, F. G. **Pineal melatonin production in Streptozotocin-diabetic rats: mechanisms and microdialysis daily profile.** 2009. 181 p. Doctorate Thesis (Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Melatonin is mainly synthesized by the pineal gland in a strictly nocturnal pattern. The resulting increase in circulating melatonin provides a signal of night time and is used to optimally synchronize physiological functions, including the energy metabolism, to daily changes in the environment. Diabetes mellitus is a syndrome characterized by disordered metabolism and hyperglycemia resulting from either a progressive loss in insulin secretion and/or from abnormal resistance to insulin's effects. Evidences in the literature show that melatonin is involved in the regulation of insulin synthesis and secretion, as well as in the peripheral sensitivity to this hormone. On the other hand, insulin was shown to increase melatonin synthesis induced by norepinephrine. Considering the possibility of a crosstalk involving both hormones, the controversial available data on melatonin synthesis and diabetes, and the lack of information on the status of the molecular mechanisms involved in melatonin synthesis in diabetic rats, this study was designed to analyze the daily pineal melatonin production in streptozotocin-diabetic male Wistar rats (60mg/kg, i.p.), as well as the activity pattern and gene expression profiles of the enzymes involved in this process. The animals (240–280 g) were kept under a 12-hr light/12-hr dark cycle in a temperature-controlled room ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), with water and food ad libitum. Diabetes was determined by tail blood glucose measurement and the animals were sacrificed on day 3 and day 15 after induction. The techniques used here include flow cytometry, microdialysis, HPLC, enzyme activity assay, qPCR and Western blot. The results show that pineal melatonin production is decreased (50%) in streptozotocin-induced diabetic animals, both 3 and 15 days after induction, with an additional loss in the mono/biphasic circadian profile. These alterations were not due to necrosis or apoptosis in the pinealocytes, but to impairment in the pineal metabolism that involved the important decrease in the AANAT activity (55%), resulting in the observed indolamine synthesis reduction. In addition, other key factors involved in melatonin production presented an imbalance in the rhythmic profile, such as the $\beta 1$ -adrenergic receptor gene expression and the TPH1 and HIOMT genes expressions and activities. Besides that, the already known decrease in circulating insulin and leptin levels in diabetic animals may also have a role in the observed melatonin synthesis reduction. This decrease may contribute to the development of diabetes and its chronic effects by undermining the organism capability of overcoming the oxidative stress derived from the disease. Future studies should include melatonin rhythmically reposition to check if it would be able to diminish some of the symptoms, as well as insulin treatment to try to restore melatonin levels.

Key words: Melatonin. Pineal. Diabetes. Microdialysis. AANAT. Streptozotocin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândula Pineal

A identificação da pineal como um órgão distinto do cérebro remonta aos séculos III e IV AC, seu nome foi dado por Galeno de Pérgamo (130-200 DC) que também foi o primeiro a descrever sua localização. Várias foram as interpretações do seu papel funcional, que incluem desde um esfíncter controlador do fluxo do “espírito animal” até a interpretação cartesiana de “sede da alma” (ARENDDT, 1995).

O órgão pineal origina-se embriologicamente, assim como a retina, de uma evaginação da parede do III ventrículo constituindo, junto com os núcleos habenulares, a maior parte do epitálamo (EKSTRÖM e MEISSL, 2003).

Em humanos a glândula pineal localiza-se na margem posterior do teto do diencéfalo e acima dos colículos superiores, mantendo relação anatômica com o terceiro ventrículo através do recesso pineal e ligando-se ao cérebro pelo pedúnculo pineal. Seu formato assemelha-se ao de uma “pinha”, apresentando variações no seu peso (média de 129 mg) e tamanho (média de 12 mm) dependendo da idade considerada. Em ratos o complexo pineal consiste basicamente de 3 partes: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal propriamente dita ou pineal superficial. Esta mede aproximadamente 2 mm e pesa 1,5 mg, localizando-se sobre os colículos superiores, no espaço entre o cérebro e o cerebelo, mantendo relação anatômica com o diencéfalo e com o terceiro ventrículo através do pedúnculo e da pineal profunda (VOLLRATH, 1981).

A análise evolutiva da glândula mostra que de maneira geral (mas não incluindo todas as espécies) aves, répteis, anfíbios e peixes apresentam pineal diretamente fotossensível. Nota-se, ainda, que o tipo celular majoritário do corpo pineal, o pinealócito, teve uma evolução conjunta com a irradiação dos vertebrados, com uma perda gradual da função fotorreceptora e um aumento da função neuroendócrina presente em todos esses animais (COLLIN, 1969, 1971; OKSCHE, 1971; COLLIN e OKSCHE, 1981). Assim, nos mamíferos o órgão perde sua capacidade fotorreceptiva e passa a estar sob o controle do sistema nervoso central, notadamente do simpático cervical. Dessa forma, as influências do ciclo de iluminação ambiental passam a se dar de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas e destas para os neurônios pré-ganglionares que, através da inervação simpática periférica, atingem a glândula pineal (VOLLRATH, 1981; KORF, 2000).

O controle da função hormonal da glândula é feito pelo ciclo dia-noite. Tal controle é bastante refinado, sendo o hormônio melatonina produzido durante a noite independentemente do ritmo de atividade da espécie considerada. Dessa forma, a melatonina circulante tem também seu perfil plasmático variável de acordo com as noites mais longas ou mais curtas típicas das diversas estações do ano (REITER, 1993). Fica claro assim a função fisiológica da glândula pineal: sinalizar para o meio interno pela presença e ausência diária da melatonina na circulação e nos diversos líquidos corpóreos, se é noite ou dia no meio exterior e, através da duração do seu perfil secretório noturno, qual é a estação do ano.

Outro papel importante que tem de ser considerado é que o perfil plasmático diário da melatonina apresenta uma variação característica ao longo do desenvolvimento ontogenético dos mamíferos, quais sejam: a sua produção e secreção são máximas na infância, apresentam uma pequena redução na puberdade, estabilizam-se na fase adulta, reduzindo consideravelmente em idosos. Essas características de produção e secreção da melatonina pela pineal fazem dela um importante marcador temporal ontogenético, promovendo processos adaptativos desde a infância até a velhice (CIPOLLA-NETO e AFECHE, 2008).

Em função desse papel de temporizador do meio interno, evidencia-se que a glândula pineal, através da secreção da melatonina, possa estar envolvida na regulação das mais diversas funções fundamentais para a sobrevivência do indivíduo e da espécie: regulação endócrina em geral e metabólica e reprodutiva em particular; regulação do ciclo atividade-reposo, em particular do sono e da vigília; regulação do sistema imunológico, regulação cardiovascular, entre outras.

Existem outros locais de síntese da melatonina, tais como retina e sistema gastrointestinal, entretanto acredita-se que a melatonina sintetizada nestas regiões tem maior importância na modulação de fenômenos locais (ARENDDT, 1995).

1.2 Melatonina

Lerner et al. (1958) isolaram algumas microgramas de uma substância que mostrou atividade biológica em melanócitos de sapos, denominando-a melatonina.

A melatonina (*N*-acetil 5-metoxitriptamina) é uma indolamina de peso molecular 232,3, sintetizada a partir do aminoácido essencial triptofano que é transformado em 5-hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase 1 (TPH1, EC 1.14.16.4), este passa por uma descarboxilação subsequente catalisada pela descarboxilase de l-aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28) que resulta na formação de serotonina. A serotonina é, por sua vez, acetilada pela

ação da arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87) e transformada em N-acetilserotonina, que tem o grupamento hidroxila trocado por metil pela ação da hidroxindoloxi-metiltransferase (HIOMT, EC 2.1.1.4), culminando na formação da melatonina (CIPOLLA-NETO et al., 1999) (Figura 1).

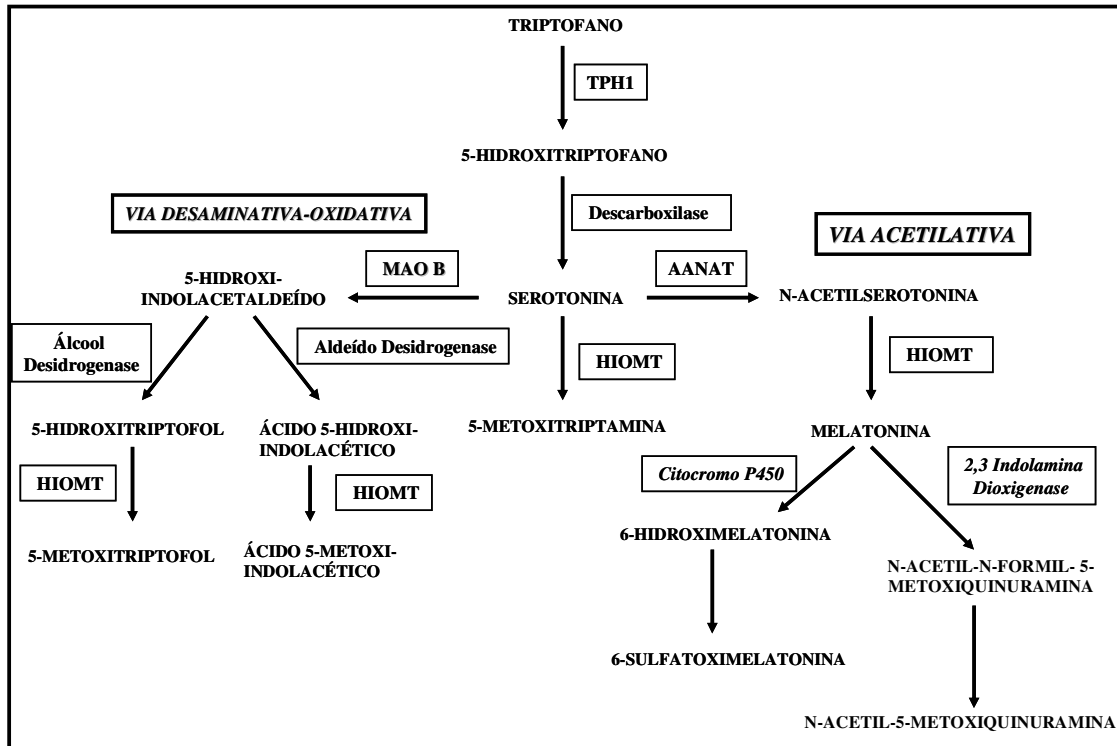


Figura 1. Vias metabólicas de síntese e degradação da melatonina e de outros indóis na glândula pineal (Adaptado de CIPOLLA-NETO e AFECHÉ, 2008).

O sistema neural que controla o metabolismo da glândula pineal origina-se no núcleo paraventricular do hipotálamo que se projeta para coluna intermédio-lateral da medula torácica alta, nos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático. Estes neurônios projetam-se então para os gânglios cervicais superiores, cujos neurônios pós-ganglionares se projetam para glândula pineal através dos ramos carotídeos internos e nervos conários. O ritmo diário de síntese de melatonina depende do sistema neural que controla a ritmicidade circadiana e que começa na retina e se projeta via trato retino-hipotalâmico, principalmente para o núcleo supraquiasmático que se conecta com o núcleo paraventricular hipotalâmico, controlando nas 24 horas a atividade da via neural descrita acima (CIPOLLA-NETO e AFECHÉ, 2008) (Figura 2).

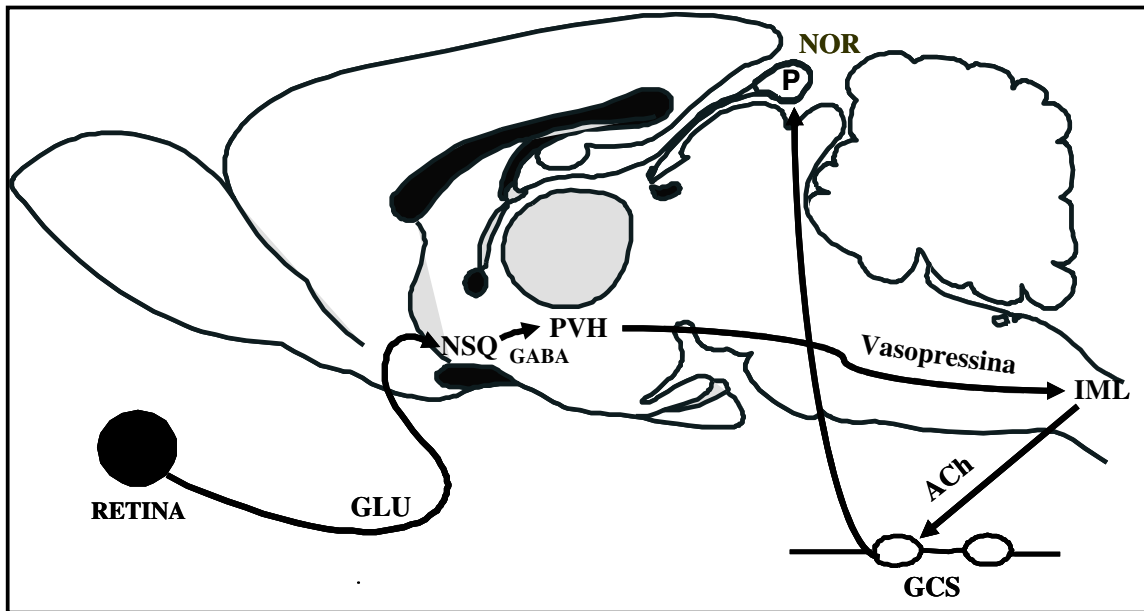


Figura 2. Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina pineal e os principais neurotransmissores envolvidos. GLU: glutamato; NSQ: núcleo supraquiasmático; GABA: ácido gama-aminobutírico; PVH: núcleo paraventricular hipotalâmico; IML: coluna intermédio-lateral da medula espinhal; Ach: acetilcolina; GCS: gânglio simpático cervical superior; P: pineal; NOR: noradrenalina (Adaptado de CIPOLLA-NETO e AFECHÉ, 2008).

A ativação noturna da via neural de projeção periférica para a glândula pineal induz a liberação de noradrenalina nas proximidades dos pinealócitos, os quais apresentam receptores α e β -adrenérgicos. Da interação com os receptores β (subtipo β_1) há a indução do aumento do AMPc intracelular através da ativação de proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilato ciclase. A ativação dos receptores α (subtipo α_{1B}) ativa a proteína Gq ligada à estimulação da fosfolipase C, gerando IP_3 e diacilglicerol. O IP_3 , atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação do cálcio desses estoques, tendo como consequência um aumento do cálcio intracitoplasmático (KLEIN, 1985; VANECEK et al., 1985).

O aumento do cálcio induzido por noradrenalina caracteriza-se por um pico seguido de um platô. A rápida elevação do cálcio deve-se à liberação do retículo (SCHAAD et al., 1995) e o platô que se segue parece dever-se à entrada de cálcio pelos canais da membrana plasmática responsáveis pela reposição dos estoques intracelulares (GOMPERTS et al., 2002).

O cálcio e o diacilglicerol ativam a proteína quinase C (PKC) que potencia o aumento do AMPc já induzido pela estimulação β -adrenérgica. Este efeito pode ocorrer pela fosforilação da adenilato ciclase ou da proteína Gs (KLEIN et al., 1983; SUGDEN, 1989; SUGDEN et al., 1985, 1986, 1987). O cálcio tem um papel potenciador da síntese do AMPc intracelular também por atuar através do complexo cálcio/calmodulina na ativação da

adenilato ciclase, que na glândula pineal foi caracterizada como do tipo 1 (ANHOLT, 1994; TZAVARA et al., 1996).

A enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) é responsável pela transformação de triptofano em 5-hidroxitriptofano e é a enzima passo-limitante na síntese da serotonina. A concentração de triptofano na pineal é maior do que em qualquer parte do sistema nervoso central. O transporte de triptofano no sistema nervoso central se dá através de um sistema de transporte de aminoácidos neutros, e um sistema semelhante a esse poderia estar carregando o triptofano para dentro dos pinealócitos (SUGDEN et al., 1989). A enzima não parece estar saturada com relação ao seu substrato uma vez que a administração de triptofano produz um aumento dos níveis de serotonina na pineal (YOUNG e ANDERSON, 1982).

Na glândula pineal do rato, a enzima TPH1 apresenta um ritmo circadiano de atividade com valores mais elevados no período noturno. Esse aumento da atividade de cerca de 2 vezes durante à noite deve-se tanto à sua síntese aumentada, pela indução de transcrição gênica e síntese protéica, como à ativação da enzima por fosforilação (BESANÇON et al., 1996; SITARAM e LEES, 1978; SHIBUYA et al., 1978). Tanto o ritmo do RNAm da TPH1, como o ritmo de atividade da enzima são induzidos por estimulação noradrenérgica, via AMPc e proteína quinase A (PKA). A PKA, por mecanismo independente do CREB, promove a transcrição da referida enzima (BOADLE-BIBER, 1980; EHRET et al., 1991; SHEIN e WURTMAN, 1971; SITARAM e LEES, 1984). A fosforilação da TPH1 pode ser feita pela PKA, pela quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK) e pela PKC (EHRET et al., 1989, 1991; JOHANSEN et al., 1995, 1996; KUHN et al., 1978).

A regulação da atividade da TPH1 também é feita através de sua associação com a proteína 14-3-3. A TPH1 fosforilada pela CaMK, PKC ou pela PKA liga-se à proteína 14-3-3, aumentando a sua atividade e impedindo a sua desfosforilação (ICHIMURA et al., 1987; BANIK et al., 1997; KLEIN et al., 2003). Baltatu et al. (2000) demonstraram que a expressão da TPH1 também é influenciada pela ação da Angiotensina II em receptores do tipo AT₁.

A atividade da enzima TPH1 é dependente de oxigênio e requer a pteridina reduzida como co-fator (FRAZER e HENSLER, 1994). Ainda, a sua atividade pode ser estimulada por Fe²⁺ e ditiotreitól, e pelos fosfolípídeos de membrana através da indução de sua associação à membrana plasmática (HAMON et al., 1978; IMAI et al., 1989; KUHN et al., 1978).

A concentração de serotonina na glândula pineal é mais alta do que em qualquer outro tecido, apresentando variação circadiana, com altas concentrações durante o período claro e baixas concentrações no período escuro (KLEIN et al., 1992; MEFFORD et al., 1983). A enzima conversora do 5-hidroxitriptofano em serotonina, a descarboxilase de L-aminoácidos

aromáticos, parece ser a mesma que atua na descarboxilação da L-DOPA produzindo dopamina (FRAZER e HENSLER, 1994).

Durante o dia o metabolismo da serotonina é desviado para a via desaminativa-oxidativa onde sofre a ação da MAO (EC 1.4.3.4.; monoamina: O₂ oxidoreductase), sendo transformada em 5-hidroxi-indolaldeído, que sob a ação da aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3) transforma-se em ácido 5-hidroxi-indolacético ou sob ação da álcool desidrogenase (EC 1.1.1.2) transforma-se em 5-hidroxitriptofol. Estes dois produtos podem ser O-metilados sob a ação da HIOMT, produzindo respectivamente o ácido 5-metoxi-indolacético e 5-metoxitriptofol (KLEIN et al., 1981) (Figura 1).

A enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) é responsável pela conversão de serotonina em N-acetilserotonina, sendo considerada a enzima mais importante na via de síntese da melatonina por apresentar pronunciado ritmo circadiano de atividade dependente da estimulação noradrenérgica (KLEIN e WELLER, 1972, KLEIN et al., 1992).

Como já mencionado, no rato o AMPc, resultante da estimulação do receptor β_1 adrenérgico, ativa a proteína quinase A do tipo II (PKA) (MARONDE et al., 1999), que fosforila o fator de transcrição CREB, promovendo a ativação das transcrição e tradução de vários genes importantes no metabolismo pineal, dentre eles o da AANAT. A ativação da AANAT é resultado de sua fosforilação pela PKA em dois sítios específicos localizados no N-terminal e no C-terminal e subsequente ligação com a proteína 14-3-3, formando o complexo AANAT/14-3-3 que além de ativar a enzima, a protege da proteólise proteassomal (GANGULY et al., 2001; KLEIN et al., 1996; KOCH et al., 2003; ROSEBOOM e KLEIN, 1995; TAMOTSU et al., 1995).

Quando a estimulação adrenérgica cessa, ou quando se administram antagonistas adrenérgicos ou se submete o animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AANAT cai com uma meia vida de aproximadamente 3 min (CIPOLLA-NETO e AFECHÉ, 2008; DEGUCHI e AXELROD, 1972; KLEIN e WELLER, 1972; KLEIN et al., 1978; PARFITT et al., 1976).

Em algumas espécies de mamíferos, como ovinos e primatas, o principal mecanismo de ativação da AANAT se dá pela inibição da proteólise proteassomal à noite, sendo muito pequena a variação diária do RNAm da enzima (GARIDOU et al., 2001; GASTEL et al., 1998).

A estimulação adrenérgica induz também a síntese de fatores de transcrição negativos na glândula pineal, sendo um dos mais importantes o ICER (“inducible cAMP early repressor”), que tem um papel inibitório da transcrição do gene da AANAT. O RNAm do

ICER exibe um ritmo circadiano na pineal do rato, com um pico na segunda metade da noite que precede o declínio da síntese de melatonina. Além do ICER, o AMPc estimula a síntese de outros fatores de transcrição negativos como o Fra-2 (“Fos-related antigen-2”) e JunB que também poderiam estar promovendo a queda circadiana da atividade da AANAT (BALER e KLEIN, 1995; SPESSER et al., 2000).

O passo final da produção consiste na transformação de N-acetilserotonina (NAS) em melatonina catalisada pela enzima hidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT) (CIPOLLANETO e AFECHE, 2008).

A HIOMT, enzima pertencente à família das metiltransferases, catalisa a reação de transferência de um grupamento metil, proveniente do cofator S-adenosil-L-metionina (SAM), para seu substrato indólico. Essa metilação se dá não só tendo como substrato a N-acetilserotonina (afinidade de 50-80%), mas também é realizada tendo como substratos outros indóis presentes na pineal, tais como: 5-hidroxitriptofano (afinidade menor que 5%), 5-hidroxitriptamina (serotonina, 10% de afinidade), ácido 5-hidroxiindolacético (afinidade menor que 5%) e 5-hidroxitriptofol (15-30% de afinidade) (AXELROD e WEISSBACH, 1961).

A atividade da HIOMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes (RIBELAYGA et al., 1999; SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003).

Os mecanismos envolvidos na regulação desta enzima são complexos e não estão totalmente elucidados. Por um lado o ritmo circadiano do RNAm da HIOMT é dependente da estimulação adrenérgica, da ativação do receptor β -adrenérgico e do aumento na concentração de AMPc. Já a regulação do ritmo de atividade da referida enzima parece ser dependente de eventos pós-transcripcionais, induzidos por neurotransmissores que aumentam o cálcio (SIMONNEAUX et al., 1999).

O NPY tem efeito estimulatório sobre a atividade da HIOMT, potenciando a síntese de melatonina (RIBELAYGA et al., 1997). Estudos *in vivo* demonstraram que a atividade da HIOMT é significativamente correlacionada com a concentração do NPY, que tem um ritmo diário e sazonal. Verificou-se também que o aumento noturno do RNAm da HIOMT não tem relação direta com o aumento da atividade da mesma (SIMONNEAUX et al., 1999).

A regulação adrenérgica da atividade da HIOMT parece ocorrer em longo prazo, pois trabalhos com animais expostos à luz constante ou que tiveram removidos os seus gânglios cervicais superiores mostraram que houve uma redução na atividade da HIOMT, mas os níveis basais do RNAm da enzima não estavam alterados (SUGDEN et al., 1989).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

