SABRINA HELOÍSA JOSÉ DOS SANTOS MORICONI

**PAPEL DA INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE ASTRÓCITOS E
PINEALÓCITOS NA MEDIAÇÃO DO EFEITO POTENCIADOR
DA ANGIOTENSINA II SOBRE A SÍNTESE DE MELATONINA
INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA NA
GLÂNDULA PINEAL DE RATOS**

**Tese apresentada ao Programa de
Fisiologia Humana do Instituto de
Ciência Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.**

São Paulo

2008

SABRINA HELOÍSA JOSÉ DOS SANTOS MORICONI

**PAPEL DA INTERAÇÃO PARÁCRINA ENTRE ASTRÓCITOS E
PINEALÓCITOS NA MEDIAÇÃO DO EFEITO POTENCIADOR
DA ANGIOTENSINA II SOBRE A SÍNTESE DE MELATONINA
INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA NA
GLÂNDULA PINEAL DE RATOS**

**Tese apresentada ao Programa de
Fisiologia Humana do Instituto de
Ciência Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Moriconi, Sabrina Heloísa José dos Santos.

Papel da interação parácrina entre astrócitos e pinealócitos na mediação do efeito potenciador da angiotensina II sobre a síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica na glândula pineal de ratos / Sabrina Heloísa José dos Santos Moriconi. -- São Paulo, 2007.

Orientador: José Cipolla Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Estudos fisiológicos celulares da glândula pineal de ratos.

Versão do título para o inglês: Paracrine interaction between glial cells and pinealocytes determines the potentiating effects of Angiotensin II on noradrenaline-stimulated melatonin synthesis on the rat pineal gland.

Descritores: 1. Glândula pineal 2. Melatonina 3. Angiotensina II 4. Astrócitos 5. Pinealócitos 6. Interação parácrina I. Cipolla Neto, José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB022/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sabrina Heloísa José dos Santos Moriconi.

Título da Tese: Papel da interação parácrina entre astrócitos e pinealócitos na mediação do efeito potenciador da Angiotensina II sobre a síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica na glândula pineal de ratos.

Orientador(a): José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a15...../.....04...../.....08....., considerou

☒ Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:Eliom Martins Junior.....
Instituição:Univ. Mackenzie - Universidade Mackenzie.....

Examinador(a): Assinatura:Ana Carolina Franco Ferreira.....
Nome:Ana Carolina Franco Ferreira.....
Instituição:ICB-USP.....

Examinador(a): Assinatura:Melissa Moura Zanquetta.....
Nome:Melissa Moura Zanquetta.....
Instituição:ICB-USP.....

Examinador(a): Assinatura:Sérgio Castro Jr.....
Nome:Sérgio Castro Jr.....
Instituição:Instituto Butantan.....

Presidente: Assinatura:José Cipolla Neto.....
Nome:José Cipolla Neto.....
Instituição:ICB-USP.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 79 nas fls. 09 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Prof. Dr. José Cipolla Neto, Coordenador da Linha de Pesquisa "***O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: pineal, obesidade, diabetes e envelhecimento***" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Sabrina Heloísa José dos Santos, Rodrigo Peliciari, Fernanda Gaspar do Amaral, Ana Lúcia Skorupa, Lillian C. Souza, Maria Isabel Cardoso Alonso-Vale, Cristina das Neves Borges Silva, Julie Takada, Sidney Barnabé Peres, Paula Mukai, Ronaldo Meira de Mello, Cecília Picinato, Thaís Martins de Lima.** Pesquisadores: **Fabio Bessa Lima, Silvana A Bordin da Silva, Carla Roberta O Carvalho, Ângela Rafael Carpinelli, Rui Curi, Antonio Carlos Cassola e Solange Castro Afeche** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **16.12.2004**.

São Paulo, 16 de dezembro de 2004.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

AGRADECIMENTOS

À minha saudosa mãe pelos ensinamentos deixados e por toda dedicação.

À minha família pelo apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. José Cipolla Neto, professor admirável, pela contribuição intelectual e formação científica.

À Prof. Dra. Solange de Castro Afeche, professora exemplar, pela orientação e dedicação.

À Prof. Dra. Carla R. O. Carvalho e a todos do seu laboratório pelos ensinamentos e cooperação.

À Julieta H. Scialfa pela grande amizade e apoio técnico.

Aos funcionários das secretarias e da biblioteca, em especial Zé Maria Itamar pela eficiência e dedicação.

À Daniella, Rodrigo, Simone, Ana Carolina, Diego, Darine, enfim todos que participaram direta ou indiretamente para conclusão desse trabalho.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

MORICONI, S.H.J.S. **Papel da interação parácrina entre astrócitos e pinealócitos na mediação do efeito potenciador da Angiotensina II sobre a síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica na glândula pineal de ratos.** 91 f. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estudos anteriores de literatura indicavam que o sistema renina-angiotensina II local pineal era de fundamental importância para a expressão plena da capacidade de síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica pelos pinealócitos. Essa relação funcional estava na dependência de uma interação parácrina entre pinealócitos e astrócitos onde os astrócitos seriam os responsáveis pela síntese de angiotensina II que, liberada pela ação da noradrenalina, agiria em receptores do tipo AT₁ existentes na membrana dos pinealócitos. O objetivo desse trabalho foi o de, uma vez estabelecida a metodologia de dissociação e cultivo dos tipos celulares, estudar a hipótese acima, além das possíveis vias de transdução intrapinealocitárias que levassem ao efeito potenciador da angiotensina II sobre a estimulação noradrenérgica no processo de síntese de melatonina. Os resultados mostraram que, diferentemente do que acontece com glândulas intactas ou com co- cultura (cultura contendo astrócitos e pinealócitos), a estimulação noradrenérgica de pinealócitos isolados não é passível de bloqueio por Losartan, uma droga bloqueadora de receptores AT₁. Por outro lado, nas mesmas condições experimentais, a síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica é passível de potenciação pela adição de angiotensina II, efeito esse, que é bloqueado pelo Losartan. Demonstrou-se, ainda, que a estimulação noradrenérgica de astrócitos isolados, provoca a liberação de angiotensina II por esse tipo celular. Demonstrou-se, ainda, que há a mobilização de pelo menos duas vias de transdução nos pinealócitos quando estimulados pela angiotensina II: aumento da concentração de cálcio intracelular e mobilização de processos de fosforilação em tirosina usando as vias das proteínas JAK/ STAT. Dessa forma, pelo presente trabalho pode- se especular que quando a glândula pineal é estimulada pela liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos, ao mesmo tempo que esta age nos pinealócitos promovendo a via de síntese de melatonina, age, também, nos

astrócitos, liberando angiotensina II que, por sua vez, age nos pinealócitos potenciando a ação estimulatória da noradrenalina, levando a um aumento da síntese de melatonina.

Palavras-chave: Glândula pineal, Melatonina, Angiotensina II, Sistema renina-angiotensina local, Losartan, Pinealócitos, Astrócitos, Interação parácrina.

ABSTRACT

MORICONI, S.H.J.S. **Paracrine interaction between glial cells and pinealocytes determines the potentiating effects of Angiotensin II on noradrenaline-stimulated melatonin synthesis on the rat pineal gland.** 91 f. Thesis - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

We have previously demonstrated that Angiotensin II (AngII) potentiates the noradrenaline-stimulated (Nor+) melatonin synthesis in the rat pineal gland [Baltatu et al., J. Neurochem.(2002)80, 328-334]. The aim of the present paper was to study the possible paracrine interactions between glial cells and pinealocytes in the rat pineal gland. To accomplish this aim, after standard pineal cell dissociation we studied the two cellular types separated in different cell cultures, either of glial pineal cells or pinealocytes. First, we showed, using freshly dissociated pineal cells, that Losartan[™] is able to reduce Nor+ induced melatonin synthesis, similarly to what happens with pineal glands culture. Noradrenaline stimulation is able to induce melatonin synthesis in glial cell-free pinealocytes cell culture, what is not blocked by Losartan[™]. In this condition, AngII is able to potentiated the Nor+ induced melatonin synthesis, an AngII effect that is blocked by Losartan[™]. Moreover, AngII stimulated pinealocytes show an increase in Ca²⁺ current as evaluated by confocal microscopy. On the other hand, pinealocytes-free glial cells cultures when stimulated by noradrenaline release AngII in the culture medium. Taking into account the above results it is possible to speculate that in the intact pineal gland noradrenaline released by sympathetic terminals stimulated pinealocytes inducing the well know process of melatonin synthesis at the same time that stimulate glial cells that release AngII that acting through AT1 receptors in pinealocytes potentiate melatonin synthesis by the inducing an increase in the intracellular Ca²⁺ pool and tyrosine phosphorylation of JAK/STAT complex.

Key words: Pineal gland, Melatonin, Angiotensin II, Local renin-angiotensin system, Pinealocytes, Astrocytes, Paracrine interaction.

ABREVIATURAS

5-HIAA	ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HIAL	5-hidroxi-indolacetaldeído
5-HL	5-hidroxitriptofol
5-http	5-hidroxitriptofano
5-MIAA	ácido 5-metoxi-indolacético
5-ML	5-metoxitriptofol
5-MT	5-metoxitriptamina
AT1	receptor angiotensina II
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
CRE	elemento responsivo ao AMPc
CREB	proteína ligante a elementos responsivos ao AMPc
DAG	diacilglicerol
GABA	ácido γ -amino-butílico
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
ICER	repressor imediato induzido por AMPc
IML	coluna intermediolateral da medula espinhal torácica alta
IP ₃	trifosfato de inositol
IR	receptor insulina
IRS-1	substrato – 1 do receptor de insulina
JAKs	janus quinase
MAO	monoamino O ₂ redutase
MAPK	proteína – quinase ativada por mitógeno
MEL	melatonina
NAS	N-acetilserotonina
NAT	N-acetiltransferase
NPY	neuropeptídeo Y
PVH	núcleo paraventricular hipotalâmico
RAS	sistema renina angiotensina
RHT	trato retino hipotalâmico
SCG	gânglio cervical superior

SCN	núcleo supraquiasmático hipotalâmico
STATs	tradutores de sinal e ativadores de transcrição
TPOH	triptofano hidroxilase
TRP	triptofano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de corte sagital de encéfalo de rato mostrando a glândula pineal	18
Figura 2: Representação esquemática de dois tipos de pinealócitos de vertebrados	19
Figura 3: Via neural clássica no controle da glândula pineal.....	20
Figura 4: Representação esquemática da informação fotoperiódica transmitida pela secreção de MEL	21
Figura 5: Segundos mensageiros envolvidos na resposta intracelular à noradrenalina	24
Figura 6: Terceiros mensageiros envolvidos na resposta intracelular à noradrenalina	25
Figura 7: Via de síntese de MEL	26
Figura 8: Vias de degradação de MEL	28
Figura 9: Cultura de astrócitos isolados	47
Figura 10: Cultura de pinealócitos isolados.....	47
Figura 11: Co-cultura de astrócitos e pinealócitos.....	48
Figura 12: Imunofluorescência em cultura de astrócitos isolados	48
Figura 13: Imunofluorescência para o GFAP em cultura de pinealócitos Isolados	48
Figura 14: Número de astrócitos presentes nas culturas de pinealócitos, incubadas ou não com diferentes concentrações de AraC... ..	50
Figura 15: Número de astrócitos presentes nas culturas de pinealócitos, incubadas ou não com AraC, ao longo do tempo.....	51
Figura 16: Expressão do RNA mensageiro do receptor beta-adrenérgico do tipo I.....	52
Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do receptor alfa-adrenérgico do tipo I.....	53
Figura 18: Cromatograma padrão da angiotensina II	54
Figura 19: Cromatograma da amostra obtida de astrócitos pineais estimulados por noradrenalina 10^{-6} M	55
Figura 20: Conteúdo de melatonina no meio de cultura de pinealócitos	

estimulados com noradrenalina em diferentes concentrações	56
Figura 21: Pinealócitos incubados ou não com noradrenalina 10^{-6} M e tratados cronicamente com Losartan 10^{-5} M	57
Figura 22: Conteúdo de melatonina do meio de cultura em que pinealócitos isolados foram cultivados e estimulados com noradrenalina 1μ M, em associação ou não com angiotensina II (10μ M)	58
Figura 23: Conteúdo de melatonina do meio de cultura em que pinealócitos isolados foram cultivados e estimulados com noradrenalina 1μ M, em associação ou não com angiotensina II (10μ M) e losartan (10μ M)	59
Figura 24: Conteúdo de melatonina de pinealócitos cultivados na presença de astrócitos, em uma cultura mantida por 48h.....	60
Figura 25: Média de fluorescência medida 8 pinealócitos por microscopia Confocal em quando expostos à angiotensina II na concentração de 2×10^{-5} M	61
Figura 26: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina induzido pela angiotensina II	62
Figura 27: Gráficos que mostram a quantidade de Jak-2 expressas nas proteínas provenientes das glândulas pineais estimuladas com angiotensina II e o grau de fosforização da quinase Jak-2.....	63
Figura 28: Grau de fosforização da quinase Jak-2 em glândulas estimuladas por noradrenalina 10^{-6} M	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cultura sem transparência	50
Tabela 2: Número com transparência	51
Tabela 3: Médias $\pm$ erros-padrões dos conteúdos de melatonina de pinealócitos incubados ou não com noradrenalina pré-incubados ou não com Losartan.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 RITMOS BIOLÓGICOS E A GLÂNDULA PINEAL.....	16
1.1.1 RITMOS BIOLÓGICOS	16
1.1.2 HISTÓRICO; GLÂNDULA PINEAL	17
1.1.3 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA PINEAL EM ROEDORES E SEU CONTROLE NEURAL	18
1.1.4 MELATONINA E SEU MODO DE AÇÃO	20
1.1.5 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DA GLÂNDULA PINEAL ...	22
1.1.6 EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NORADRENERGICA NA GLÂNDULA PINEAL	22
1.1.7 BIOSÍNTESE DE MELATONINA	26
1.1.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DISPONIBILIDADE DE SUBSTRATO.....	28
1.1.9 GLÂNDULA PINEAL E O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	29
1.1.10 PAPEL DA ANGIOTENSINA II NA SÍNTESE DE MELATONINA	31
1.1.11 CROSS-TALK ENTRE A SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PROVOCADA PELA ANGIOTENSINA II E A NORADRENALINA NA SÍNTESE DE MELATONINA PELA GLÂNDULA PINEAL	32
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE GLÂNDULA PINEAL	34
3.2 DISSOCIAÇÃO CELULAR DA GLÂNDULA PINEAL	34
3.3 CONTAGEM CELULAR	36
3.4 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS	36
3.5 CULTURA PRIMÁRIA DE PINEALÓCITOS.....	37
3.6 CO-CULTURA.....	37
3.7 TRATAMENTO DOS PINEALÓCITOS E ASTRÓCITOS	38
3.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PARA MELATONINA	39
3.9 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PARA ANGEOTENSINA II	39
3.10 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS.....	40
3.11 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE-TRANSCRIÇÃO RESERVA (RT-PCR).....	41
3.11.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	41
3.11.2 OBTENÇÃO DO cDNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE POR PCR	42

3.12 MICROSCOPIA CONFOCAL	43
3.13 IMUNO-FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE GFAP E VIMETINA.....	43
3.14 TÉCNICA DE WESTERN BLOT APLICADA NAS GLÂNDULAS PINEAIS ..	44
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4 RESULTADOS	47
4.1 CARACTERÍSTICAS DA CULTURA DE PINEALÓCITOS E ASTRÓCITOS SEPARADOS	47
4.1.2 TIPOS DE CÉLULAS	49
4.2 ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS ADRENOCEPTORES β e α EM ASTRÓCITOS DA GLÂNDULA PINEAL	52
4.3 ESTUDOS FUNCIONAIS COM AS CULTURAS CELULARES ESPECÍFICAS	53
4.3.1 DOSAGEM DE ANGIOTENSINA II LIBERADA PELOS ASTRÓCITOS	53
4.3.2 EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA SOBRE A SÍNTESE DE MELATONINA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS	56
4.3.3 EFEITOS DO LOSARTAN SOBRE SÍNTESE DE MELATONINA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS.....	56
4.3.4 EFEITOS DA ANGIOTENSINA II SOBRE SÍNTESE DE MELATONINA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS	58
4.3.5 EFEITOS DO LOSARTAN SOBRE A POTENCIAÇÃO PROVOCADA PELA ANGIOTENSINA II SOBRE SÍNTESE DE MELATONINA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS	59
4.3.6 ESTUDOS FUNCIONAIS USANDO CO-CULTURA DE PINEALÓCITOS E ASTRÓCITOS	60
4.4 ANÁLISE DE INFLUXO DE CÁLCIO USANDO-SE O MICROSCÓPIO CONFOCAL	60
4.5 ESTUDOS FUNCIONAIS USANDO A ANÁLISE PROTÉICA POR WESTERN BLOT	61
5 DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 RITMOS BIOLÓGICOS E A GLÂNDULA PINEAL

1.1.1 RITMOS BIOLÓGICOS

As variações rítmicas que ocorrem no ambiente terrestre são, em parte, decorrentes dos movimentos de rotação e translação da Terra, o que resulta na mudança do fotoperíodo, no regime das chuvas, nas estações do ano, na temperatura e nas marés.

Sabemos que a vida dos organismos existentes parece moldar-se em função do seu meio ambiente, e a sua vida depende da capacidade de adaptação de suas funções fisiológicas e seus comportamentos a estas modificações periódicas. Assim os ritmos biológicos surgem em respostas a essas variáveis, permitindo a antecipação de muitos mecanismos regulatórios fisiológicos e comportamentais, garantindo de forma mais eficiente, a sobrevivência individual e da espécie.

Os ritmos biológicos cujo período é de 24 ± 4 horas recebem o nome de ritmos circadianos; aqueles cujo período de oscilação for menor que o período dos ritmos circadianos recebem o nome de ritmos ultradianos e aqueles cujo período é maior, ritmos infradianos.

A geração da ritmicidade circadiana e sua sincronização e eventos rítmicos ambientais dependem de estruturas especializadas, denominadas relógios biológicos ou osciladores circadianos.

Nos vertebrados, a glândula pineal assim como o núcleo supraquiasmático hipotalâmico (SCN) desempenham um papel importante na geração e sincronização dos ritmos biológicos. Nos mamíferos, podemos dizer que o SCN é a sede do relógio endógeno e governa a maioria dos ritmos circadianos e a alternância claro/escuro ambiental típica do dia e da noite é responsável pela sincronização do ritmo tornando-o de exatamente 24 horas.

A glândula pineal por sua vez, em mamíferos, sob o controle do SCN, produz e secreta, de forma rítmica circadiana, um hormônio chamado melatonina (MEL). Esse hormônio, além das características circadianas, é produzido exclusivamente à noite em todas as espécies de mamíferos, sejam eles de hábitos noturnos ou diurnos. Graças a essas características particulares de

produção e secreção, a melatonina adquire filogeneticamente, um papel fisiológico importante de modulação, sincronização e/ou geração de alguns dos ritmos circadianos típicos do organismo vertebrado como, PE. Ex., ritmos hormonais e metabólicos, ritmos de atividade e repouso e vigília e sono, ritmos imunológicos, etc. Além disso, o perfil circadiano de produção de melatonina, refletindo de forma fiel a duração do período de escuro ambiental (noite) transmite para o meio interno informações fotoperiódicas relativas às estações do ano sendo, portanto, responsável pela deflagração de mecanismos adaptativos sazonais tais como reprodução, migração, hibernação, pelagem, etc. (CIPOLLANETO e AFECHE, 2007).

Dessa forma, graças às características rítmicas de produção e secreção de MEL, ela sinaliza para o meio interno dois tipos de informações temporais: uma diária (que traduz a alternância claro/escuro ambiental) e outra fotoperiódica (que reflete as mudanças do fotoperíodo anual) e que se expressa pela duração do episódio secretório.

1.1.2 HISTÓRICO: GLÂNDULA PINEAL

Herófilo, em torno de 300 anos a.C relatou a presença da glândula pineal pela primeira vez dando a ela um papel de regulação do fluxo do pneuma dentro do sistema ventricular do cérebro (ARENDT, 1995).

Passados 125 anos, surgem às primeiras descrições feitas por Galeno que a glândula pineal era constituída por uma estrutura diferente do tecido nervoso é similar a outras glândulas. A próxima referência feita a glândula pineal foi ao século XVII pelo filósofo francês Descarte onde apontou pela primeira vez a conexão da glândula com a informação visual, postulando, ainda, que através de movimentos, a pineal de algum modo controlava o fluxo do spiritus animalis (liquor) nos nervos e assim acabava influenciando os movimentos do corpo. (ARENDT, 1995)

E, em 1954, Kitay e Altschule, através de um estudo rigoroso da literatura, reintroduziu a glândula pineal como objeto científico de estudo, descrevendo possíveis implicações fisiológicas e fisiopatológicas da sua função ou disfunção. Outros momentos importantes foram quando Kappers, 1960 descreveu as vias

neurais simpáticas de controle da glândula pineal e Lerner et al, 1960, descreveram a melatonina e sua estrutura molecular.

1.1.3 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA PINEAL EM ROEDORES E SEU CONTROLE NEURAL

Moller em 1992 apontou três porções distintas na glândula pineal de ratos formando assim o complexo pineal (**Figura 1**): primeiramente temos a pineal profunda ou lâmina intercalar, está localizada entre as comissuras posteriores e habenular, numa região chamada de recesso pineal, e da sua porção dorsal sai o pedúnculo pineal que se comunica com a pineal superficial sendo a glândula propriamente dita e onde temos a síntese e produção do hormônio MEL.

Figura 1: Esquema de corte sagital de encéfalo de rato mostrando a glândula pineal.

Como cada ser vivo, até mesmo dentro da mesma espécie apresenta características próprias, é de se esperar que o mesmo ocorra com a glândula pineal que pode apresentar variações no tamanho, formato e posição.

A glândula pineal é composta predominantemente por pinealócitos, células neuroendócrinas que chegam a representar cerca 85 a 90% de todas as células presentes na glândula. Além dos pinealócitos também encontramos, de forma

importante, células gliais (astrócitos) na proporção de 10% das células (KARASEK e REITER, 1992; PÉVET, 1983).

Os pinealócitos podem ser então classificados em três tipos básicos (**Figura 2**), fotorreceptor pineal verdadeiro (encontrado em lampreia, peixes, sapos e alguns répteis), fotorreceptor pineal modificado (encontrado em ofídeos e aves) e pinealócitos senso estrito (encontrados em mamíferos) (KORF e STEHLE, 1998).

FIGURA 2: Representação esquemática de dois tipos de pinealócitos de vertebrados. A- fotorreceptor pineal verdadeiro. B- fotorreceptor pineal modificado. C- pinealócito senso estrito. SCG: gânglio cervical superior.

Em 1911 Cajal demonstrou em camundongo que a principal inervação da glândula pineal era simpática, mas em rato essa demonstração se deu, como descrito acima, apenas em 1960 por Kappers, apontando formalmente a existência dessa inervação e sua proveniência do gânglio cervical superior.

Portanto, o controle neural da glândula pineal após esse apontamento pôde ser melhor investigado e hoje sabemos que a glândula pineal está sob um controle de estruturas neurais centrais, dentre as quais o SCN é o componente fundamental. Este sistema inclui projeções retinianas, através das vias retino-hipotalâmicas, para os núcleos hipotalâmicos incluindo os núcleos supraquiasmáticos que por sua vez conectam-se funcionalmente com a glândula pineal através de uma via que inclui os núcleos paraventriculares hipotalâmicos, os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral da medula

espinhal, os gânglios cervicais superiores, de onde se originam os axônios dos neurônios pós-ganglionares simpáticos, que se projetam para a glândula pineal através dos ramos carotídeos internos e dos nervos conários (CIPOLLA-NETO e AFEICHE, 1992; ERLICH e APUZZO, 1985) (**Figura 3**).

Figura 3: Via Neural Clássica no Controle da Glândula Pineal.

1.1.4 MELATONINA E SEU MODO DE AÇÃO

A indolamina 5-metoxi-N-acetilriptamina (MEL) descoberta em 1960 por Aaron Lerner é uma molécula lipo e hidrossolúvel o que garante a ela penetrar facilmente qualquer célula e atravessar facilmente a barreira hemato-encefalica (REITER, 1991).

Como já descrito a maior produção e síntese de MEL ocorre na própria glândula pineal, mas pode ser sintetizada também, p.ex., na retina, na glândula de Harder e no trato intestinal, onde possui outras funções não hormonais, como neurotransmissor ou modulador local (PANG *et al.*, 1977).

Como dito acima, a principal função da glândula pineal, em todas as espécies estudadas é traduzir a informação concernente ao ciclo/escuro

ambiental para o organismo para que possa organizar seus ritmos endógenos e se adaptar às condições externas. Portanto, a mensagem endócrina da MEL transmite as informações sobre a variação da duração do ciclo luminoso.

Assim, o padrão de secreção de MEL sinaliza para o meio interno duas informações temporais: se é dia/noite no meio externo, informações sazonais da duração do fotoperíodo, refletidas pela duração do episódio secretório noturno de secreção de melatonina maiores no inverno e menores no verão, como mostra a **figura 4** (BARTNESS e GOLDMAN, 1989).

FIGURA 4: Representação esquemática da informação fotoperiódica transmitida pela secreção de MEL. A variação diária da concentração de MEL fornece informação de dia/noite (A), enquanto a variação na duração de secreção (d) fornece informação sobre as estações do ano (B).

1.1.5 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DA GLÂNDULA PINEAL

O neurotransmissor noradrenalina é responsável por desencadear a atividade metabólica na glândula. Sob o comando do SCN, o sistema simpático pineal se torna ativo à noite ocorrendo a liberação da noradrenalina pelas fibras provenientes do gânglio cervical superior (BUIJIS, 1996 MOORE, 1996).

A atividade dos nervos conários torna-se mais intensa na imediata transição do claro para o escuro ambiental e a quantidade da noradrenalina liberada por estas fibras durante a fase noturna é cerca de 100 vezes superior àquela liberada durante o dia.

Uma vez liberada, a noradrenalina agirá nos receptores adrenérgicos presentes nas membranas dos pinealócitos, ativando assim uma cascata de eventos bioquímicos. Estão presentes nos pinealócitos adrenoceptores que respondem à estimulação noradrenérgica.

O adrenoceptor β_1 : possui uma densidade cuja expressão do seu RNAm apresenta um ritmo de 24 horas com o pico na primeira metade da noite. Os efeitos da ativação desses receptores β -adrenérgicos são mediados pela proteína G estimulatória (Gs), gerando um aumento na quantidade intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) pela ativação da enzima adenilato ciclase (PFEFFER *et al.*, 1998).

O adrenoceptor α_1 está localizado também na membrana dos pinealócitos, não apresenta variação circadiana nem na afinidade e nem na densidade. De modo geral, ele potencializa os efeitos de uma ativação do receptor β_1 (SUGDEN e KLEIN, 1985).

1.1.6 EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NORADRENERGICA NA GLÂNDULA PINEAL

Alguns eventos ocorrem logo após a noradrenalina ser liberada no período noturno.

- Evento 1: Como já descrito, na membrana do pinealócito, a estimulação dos adrenoceptores β_1 , acoplados a uma proteína estimulatória (Gs), conduz a um aumento dos níveis de AMPC de apenas 10 vezes, mas à ativação simultânea dos

receptores do tipo α_1 potencializa este aumento para 100 vezes (VANECEK *et al.*, 1985). Esta potencialização ocorre devido ao aumento das concentrações intracelulares de CA^{2+} e à ativação da proteína quinase dependente de CA^{2+} (PKC). Por outro lado, apenas a ativação dos receptores α_1 adrenérgicos, como esperado, não surte efeito sobre as concentrações intracelulares de AMPc.

- Evento 2: Aumento dos níveis de CA^{2+} intracelular decorrente da ativação dos receptores de tipo α_1 que são acoplados a uma fosfolipase C e a um canal de cálcio. A resposta do CA^{2+} à estimulação α_1 adrenergica é bifásica: um primeiro componente rápido e transitório resulta da liberação de CA^{2+} de reservatórios intracelulares pelo inositol trifosfato (IP3), enquanto o segundo componente, mais duradouro, resulta da abertura de um canal de cálcio do tipo L (SAEZ *et al.*, 1994; SCHAAD *et al.*, 1995) (**Figura 5**).

O aumento intracelular do CA^{2+} conduz à translocação e a ativação da PKC (HO *et al.*, 1988). Parece então que o papel potencializador dos receptores α_1 adrenergicos é essencialmente mediado pelo CA^{2+} e pela PKC. Provalvemente o efeito potencializador desta quinase sobre o AMPc se efetue sobre a proteína Gs ou sobre a adenilato ciclase (SUDDEN e KLEIN, 1988).

O aumento dos níveis de CA^{2+} provoca também uma hiperpolarização da membrana do pinealócitos (PARFFIT *et al.*, 1975). Este efeito parece refletir ao menos em parte, o efluxo de K^+ provocado pela abertura de um canal de K^+ sensível ao CA^{2+} e AMPc (CENA *et al.*, 1991) (**Figura 5**).

FIGURA 5: Segundos mensageiros envolvidos na resposta intracelular à noradrenalina; (+): efeito estimulatório; (-): efeito inibitório; AA: ácido aracdônico; AC: adenilato ciclase; ATP: adenosina trifosfato; CaM: calmodulin; DAG: diacilglicerol; Gi: proteína G inibitória; Gq: estimulatória ligada à fosfolipase C; Gs: estimulatória; GC: guanilato ciclase; GTP: guanosina trifosfato; NA: noradrenalina; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; PI: fosfoinositídeos; PKA: proteína quinase dependente de AMPc; PKC: proteína dependente de Ca^{2+} ; PLA^2 : fosfolipase A²; PLC: fosfolipase C.

Evento 3: Após a ativação de segundo-mensageiros como descrito, temos a mobilização e ativação de outras vias de transdução, como o gene *crem*, cuja expressão é induzida pela AMPc, traduz proteínas tanto ativadoras (CREB-proteína ligante a elementos responsivos ao AMPc) como inibidoras (ICER-repressor imediato induzido por AMPc) da atividade de CRE (elemento responsivo ao AMPc) (FOULKES e SASSONE-CORSI, 1996).

A proteína CREB está presente de maneira constitutiva na glândula pineal, sua fosforilação é essencial à sua ativação.

A CREB fosforilada liga-se ao seu sítio CRE na região promotora do DNA iniciando a transcrição do gene da N-acetiltransferase (NAT). Após estimulação β_1 -adrenérgica a fosforilação da CREB ocorre em quase todos os pinealócitos (TAMOTSU *al.*, 1995), o que não ocorre após estimulação α_1 adrenergica. Portanto, na glândula pineal de ratos, a fosforilação da CREB envolve

principalmente a via de transdução dos receptores β_1 adrenergicos/ adenilato ciclase/ AMPC/ PKA (ROSEBOOM e KLEIN, 1995).

Ao contrario do que ocorre com a CREB, o principal determinante da atividade do ICER é sua concentração intracelular, e não seu estado de fosforilação. A expressão do ICER é rapidamente induzida pela via receptores β_1 adrenergicos/ adenilato ciclase/ AMPC/ PKA/ CREB, como mostra a **Figura 6**.

FIGURA 6: Terceiros mensageiros envolvidos na resposta intracelular à noradrenalina (+): efeito estimulatório; (-): efeito inibitório; P-CREB: forma fosforilada da CREB; PKA: proteína quinase A; NA: noradrenalina.

Então durante o período noturno os níveis de expressão de RNAm do CREB estão fortemente aumentados e no fim da noite e início do dia sua expressão diminui gradualmente, provavelmente sendo reprimida pela proteína ICER, o que constitui uma alça de retrocontrole negativo.

Portanto, podemos dizer que o ICER possui um papel na diminuição da síntese de MEL que ocorre no fim da noite, já que seu efeito repressor pode ser estendido a todos os outros sítios CRE, em especial o gene da NAT (STRHLE *et al.*, 1993).

1.1.7 BIOSSÍNTESE DE MELATONINA

A síntese de MEL como mostra a **Figura 7** tem início com o aminoácido triptofano (TRP), este é captado da circulação sanguínea através de um sistema de transporte de aminoácidos neutros, também comum em células do sistema nervoso central (SUGDEN, 1989; SUGDEN e MORRIS, 1979).

FIGURA 7: Via de síntese de MEL.

O TRP é hidrolizado e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) que sofre a ação da triptofano hidroxilase (TPOH) (E.C. 1.14.16.4).

A atividade da TPOH é dependente de oxigênio de um co-fator pteridínico reduzido, apresenta no rato um ritmo circadiano. Portanto, seu pico noturno é dependente entre outros fatores da estimulação noradrenérgica, mediada pelos receptores β e o aumento do AMPc, num processo dependente de síntese

protéica (EHRET *et al.*, 1991; SHEIN *et al.* 1971; SITARAM e LEES, 1984; YOUNG e ANDERSON, 1982).

A atividade dessa enzima constitui o passo limitante para a síntese de serotonina que, como se verá abaixo é o substrato fundamental para a síntese de MEL.

O 5-HTP sofre a ação da enzima descarboxilase de L aminoácidos (DAAA) (E.C. 4.1.1.28) sendo transformado em serotonina (5-HT). A concentração de serotonina na glândula pineal é muito alta e apresenta uma variação diária, com concentrações mais elevadas durante o período claro. Neste, predomina a sua metabolização pela MAO (E.C.1.4.3.4), ou seja, ela é desaminada por essa enzima que possui uma variação circadiana com valores elevados durante o período claro (KING e STEINLECHNER, 1985).

A serotonina sob a ação da MAO é transformada em 5-hidroxi-indolacetaldeído (5-HIAL), e este por sua vez sofre a ação da enzima aldeído desidrogenase (E.C.1.2.1.3) transformando-se em ác. 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) e sob a ação do álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.1) transforma-se em 5-hidroxitriptofol (5-HL). Estes dois produtos podem ser O-metilados sob a ação da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (E.C.2.1.1.4).

Durante o período escuro se observa uma queda nos níveis de serotonina. Isto ocorre em consequência do enorme aumento na atividade da N-acetiltransferase (NAT), e, portanto, o metabolismo da serotonina é desviado para via acetilativa. Além disso, a serotonina é secretada pelos pinealócitos sob estimulação noradrenérgica e mediada pelos receptores α_1 .

A serotonina é primeiro transformado em N-acetilserotonina e, em seguida, este composto sofre a ação da HIOMT, sendo então O-metilado transformando-se em 5-metoxi-N-acetiltryptamina ou melatonina (MEL).

A meia-vida da MEL é mais ou menos 20 minutos no plasma, É rapidamente degradada no fígado (**Figura 8**), sendo convertida em 6-hidroximeletonina e em seguida sulfatada e eliminada na urina sob a forma de 6-sulfatoximelatonina (BROWN *et al.*, 1991; KOPIN *et al.*, 1961). A presença de 6-sulfatoximelatonina na urina tem sido utilizada como um índice de medida do funcionamento da glândula pineal. A MEL também é metabolizada no cérebro, sendo convertida em N-acetil-5-metoxiquenurenina pela enzima 2,3-indolamina dioxigenase (HIRATA *et al.*, 1974).

FIGURA 8: Vias de degradação de MEL.

1.1.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DISPONIBILIDADE DE SUBSTRATO

As enzimas que participam na via de síntese da MEL podem apresentar uma ritmicidade diária assim:

DAAA: a concentração de serotonina na glândula pineal é mais alta do que em qualquer outro tecido corpóreo. Este ritmo está em oposição de fase com as concentrações de MEL, refletindo a utilização noturna de serotonina para a síntese de MEL. A DAAA é uma enzima pouco específica encontrada na maioria dos tecidos, sua atividade na pineal é maior do que em outros tecidos, requer piridoxal fosfato como co-fator e não apresenta ritmicidade circadiana, sendo que a variação de sua atividade está na dependência da concentração de seu substrato (SUGDEN, 1989).

MAO: sua atividade foi detectada nos pinealócitos, mas também nas terminações nervosas noradrenérgicas (YANG *et al.*, 1972). Podemos encontrar dois tipos de MAO: o tipo A nas terminações nervosas e o tipo B nos pinealócitos. A MAO apresenta variação circadiana com valores mais elevados durante o dia. Álcool e aldeído desidrogenases: nenhuma dessas enzimas está saturada pelo 5-HIAL. Os níveis de 5-HIAA e 5-HL variam paralelamente aos níveis de serotonina.

NAT: a enzima que cataliza a N-acetilação da serotonina. Dois tipos de NAT estão presentes na glândula pineal: a arilamina presente em todos os tecidos do organismo e arilalquilamina específica da pineal. A serotonina apresenta pouca afinidade pela primeira, mas uma afinidade muito grande pela segunda enzima. A atividade da arilalquilamina NAT apresenta variação circadiana dependente da ativação noradrenérgica e usa a acetil coenzima A como co-fator.

HIOMT: é responsável pela transformação de N-acetilserotonina em melatonina, sendo passo final da via de síntese de melatonina. No entanto, a regulação desta enzima é complexa. Alguns trabalhos (RIBELAYGA *et al.*; 1997; RIBELAYGA *et al.*; 1999), mostraram que a variação circadiana do RNAm da enzima está sob o controle da estimulação noradrenérgica diária, enquanto o controle do ritmo circadiano de sua atividade parece depender de eventos pós-transcricionais induzidos por outro neurotransmissor, possivelmente o neuropeptídeo Y.

1.1.9 A GLÂNDULA PINEAL E O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O sistema renina angiotensina (RAS) é responsável pela produção local de angiotensina II que, além do seu papel hormonal clássico, pode exercer uma ação parácrina ou autócrina diretamente nos sítios de formação (ARDALLOU *et al.*, 1999).

A angiotensina II (AngII) de circulação sistêmica possui um papel fisiológico importante na regulação da pressão sanguínea e volume plasmático (CLAUSER *et al.*, 1996).

A ação da angiotensina II estende-se também à retenção de sódio e água renais por efeitos diretos nos rins e, indiretamente, através da estimulação da síntese de aldosterona e interações com o sistema nervoso central que induzem a ingestão hídrica, apetite para sal e liberação do hormônio neuro-hipofisário ADH (ALLEN *et al.*, 1998).

A produção dependente da via clássica do sistema renina angiotensina inicia-se com a produção da enzima renina pelas células justaglomerulares localizadas nos rins. Esta na circulação sanguínea periférica age sobre o seu substrato, o angiotensinogênio (α_2 globulina de origem hepática) formando o decapeptídeo angiotensina I (AngI). Esta substância é clivada por uma enzima

conversora dipeptidil-carboxipeptidase (ACE) transformando-se em angiotensina II.

Os efeitos da angiotensina II são mediados por receptores específicos de membrana, de distribuição ampla no organismo. Esses receptores podem ser diferenciados de acordo com sua inibição específica por diferentes antagonistas (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

Existem dois subtipos principais de receptores de angiotensina II, o AT₁ e o AT₂.

AT₁: temos como antagonista o Losartan e o Candesartan, pertencentes à família dos bifenilimidazóis, com afinidade na faixa dos nanomoles.

AT₂: temos PD123177 e PD123319, que pertencem à família dos tetra-hidroimidazopiridinas com o mesmo grau de afinidade. Existe um outro antagonista CGP42112A, tendo afinidade para ambos os receptores, dependendo da concentração utilizada. Foi demonstrada a existência de dois outros subtipos de receptores para AngII: AT₃ e AT₄ (BERRY *et al.*, 2001).

O receptor AT₁ foi inicialmente clonado em células do músculo liso de ratos e da glândula adrenal de bovinos. Verificou-se que este receptor é composto por 359 aminoácidos e com um peso molecular de 40.9K. Este receptor possui 7 α -hélices transmembrânicas, caracterizando-o como um receptor metabotrópico. No meio extracelular uma das alças transmembrânicas constitui-se em sítio de ligação com a angiotensina II, essa ligação ocorrendo através de resíduos de serina e treonina localizados nessa região.

O receptor AT₁ é acoplado a vários sinais de transdução via proteína G, podendo ser estimulatória (Gs), inibitória (Gi) e inespecífica (Go), ativando enzimas como fosfolipase C β ₁, fosfolipase C γ ₁, fosfolipase A₂, adenilato ciclase, tirosina quinase (MARRERO *et al.*, 1995) ou até mesmo canais iônicos para cálcio do tipo L, e, portanto, produzindo efeitos biológicos diferentes dependendo do sistema em que se encontra.

Baltatu *et al.*, 1997 demonstraram que a glândula pineal é um dos órgãos que apresentam maior atividade enzimática semelhante à renina. Além disso, demonstra-se a presença, na glândula pineal, de uma quantidade considerável de enzima conversora de angiotensina (HAULICA *et al.*, 1975; NAHMOD *et al.*, 1982; MIZUNO *et al.*, 1985) como a dipeptidil-carboxipeptidase (ECA) que converte a angiotensina I (decapeptídeo) em angiotensina II (octapeptídeo), como visto acima.

Além disso, Baltatu *et al.*, em 1997/1998, demonstraram, utilizando a técnica de hibridização *in situ*, que a marcação do RNAm do angiotensinogênio localiza-se em células astrogliais da glândula pineal, e que a marcação do RNAm do receptor AT₁ de angiotensina, por sua vez, coincide com a marcação da triptofano hidroxilase nos pinealócitos, além de demonstrarem a presença do RNAm para os dois subtipos de receptores de angiotensina II (em menor quantidade AT_{1a} e o AT_{1b} como receptor predominante dado seu caráter neuroendócrino). Somente o RNAm para renina, enzima que transforma angiotensinogênio em angiotensina I, não foi encontrado neste estudo, esta provavelmente sendo recrutada através da circulação ou compensada através da produção de uma enzima que realiza a mesma função.

Dessa forma, a glândula pineal, contendo todos os elementos componentes de um sistema renina-angiotensina local com sede de síntese nos astrócitos e elementos de resposta nos pinealócitos, poderia ser um local propício para se estudar as relações parácrinas entre estes dois elementos celulares.

1.1.10 PAPEL DA ANGIOTENSINA II NA SÍNTESE DE MELATONINA

A presença da angiotensina I, angiotensina II e ECA tanto na glândula pineal intacta como em cultura de pinealócitos já é bem demonstrada pela literatura (CHANGARIS, 1977; CHANGARIS, 1978).

Como demonstrado por Kappers em 1960, a glândula pineal recebe uma inervação simpática proveniente do gânglio cervical superior que durante a síntese de MEL libera o neurotransmissor noradrenalina.

Finocchiaro *et al.*, 1990, nos traz que angiotensina II aumenta a liberação de noradrenalina por terminais nervosos simpáticos presentes na glândula pineal. A própria noradrenalina parece exercer uma retroalimentação positiva em sua liberação por estimulação β -adrenérgica e uma retroalimentação negativa por estimulação α -adrenérgica (ALBERTS e STJARNE, 1982). A angiotensina II também exercerá um papel na estimulação de todos os passos da síntese de serotonina, e, provavelmente, através da liberação de noradrenalina, estimularia indiretamente a produção de N-acetilserotonina e MEL. Ainda segundo Finocchiaro *et al.*, 1990, a angiotensina II, agindo através de receptores pré-

sinápticos, aumentaria a produção de acetilcolina, e esta, por sua vez, estimularia a produção de serotonina. Este sistema teria a sua ação máxima quando a presença de noradrenalina é nula ou mínima.

Em um trabalho posterior, Dos Santos, 2003 e Baltatu *et al.* 2002, evidenciaram uma redução dos níveis de 5-HTP associados há uma redução na expressão gênica da triptofano hidroxilase e conseqüentemente na síntese de MEL em culturas de glândulas pineais desnervadas, pré-incubadas com losartan e estimuladas com noradrenalina e também na pineal de ratos transgênicos que apresentavam uma diminuição de 90% do nível de angiotensinogênio cerebral e com o nível plasmático normal, demonstrando um efeito direto do sistema renina-angiotensina local neste processo. Dessa forma a angiotensina II na pineal parece ter uma ação direta em pinealócitos, através de receptores AT₁ mobilizando vias de transdução que resultam no aumento da expressão e ativação da triptofano hidroxilase regulando, assim, a síntese de MEL por regular a síntese de seu precursor, a serotonina.

1.1.11 CROSS-TALK ENTRE A SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PROVOCA DA PELA ANGIOTENSINA II E A NORADRENALINA NA SÍNTESE DE MELATONINA PELA GLÂNDULA PINEAL

Como sabemos o receptor AT₁ está acoplado a vários sinais de transdução via proteína G podendo ser tanto G_s, G_i e G_o. Marrero *et al.*, 1995 demonstraram que angiotensina II induz uma rápida fosforilação em tirosina e essa fosforilação está associada com aumento da JAKs (Janus quinase) que por sua vez, fosforila e ativa um grupo de proteínas reguladoras gênicas STATs (tradutores de sinal e ativadores de transcrição). Sugerindo o controle da angiotensina II via JAK/STAT na transcrição e ativação dos genes responsáveis pelo crescimento.

Marrero ainda demonstra que essas vias dependentes de tirosina quinase estão envolvidas no aumento da expressão da triptofano hidroxilase (WOOD e RUSSO, 2001).

Dessa forma, haveria uma ação sinérgica entre a noradrenalina e a angiotensina II resultando num aumento da atividade da TPOH o que resultaria numa potenciação da síntese de MEL.

2 OBJETIVOS

Mediante os dados da literatura sobre o sistema renina-angiotensina pineal, em particular os dados de De Santos, 2003 e Baltatu et al., 2002, citados acima, pode-se levantar como hipótese que a noradrenalina poderia agir nos astrócitos, provocando a liberação de angiotensina II. Esta, por ação parácrina, agiria nas membranas dos pinealócitos, em receptores AT1, mobilizando uma das possíveis vias de transdução intracelular já demonstradas em outros sistemas: a cascata da fosfolipase C, IP3, diacilglicerol e PKC; ou o aumento do cálcio intracelular via canais do tipo L; ou, ainda, a mobilização das vias que impliquem em fosforilação em tirosina. Em qualquer dos casos, levando a um aumento da expressão da triptofano hidroxilase e sua atividade o que resultaria numa potenciação da via de estimulação dos receptores $\beta 1$.

Com o intuito de testar essas hipóteses, dois são os objetivos específicos deste trabalho:

- 1) Estudar a interação parácrina entre pinealócitos e astrócitos como postulada nos trabalhos de Dos Santos (2003) e Baltatu et al., 2002;
- 2) Verificar os mecanismos de transdução intracelulares mobilizados pela Angiotensina II nos pinealócitos que possam justificar a potenciação pela angiotensina II do efeito estimulatório provocado pela noradrenalina sobre a síntese de melatonina pela glândula pineal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA PRIMARIA DE GLÂNDULA PINEAL

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 120 e 180 g. Esses animais foram sacrificados por decapitação, e as glândulas pineais retiradas e mantidas em meio de cultura BGJb com vermelho de fenol e BSA (1 mg/ml), acrescido de glutamina (2mM), ácido ascórbico (0.1 mg/ml) e penicilina (100 U/ml) - estreptomicina (100 µg/ml) em gelo.

Sob fluxo laminar, as glândulas foram dissecadas e transferidas para placas de cultura contendo 24 poços (1 ou 2 glândulas por poço); em cada poço, havia 200 µl de meio de cultura e um disco de nylon de 4mm de diâmetro sobre o qual as glândulas foram colocadas.

As placas foram acondicionadas em uma câmara incubadora modular, preenchida com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), saturada de umidade, e colocada em estufa de CO₂ a 37 °C.

As glândulas foram mantidas em cultura por 48 horas, sendo transferidas para uma nova placa, com meio fresco, a cada 24 horas. Após o término das 48 horas, as glândulas foram submetidas à estimulação por 5 horas. A incubação foi interrompida e as glândulas coletadas individualmente em gelo seco e armazenadas em congelador a -85 °C até a realização das dosagens.

3.2 DISSOCIAÇÃO CELULAR DA GLÂNDULA PINEAL

Para realização desse experimento utilizamos ratos machos da linhagem Wistar com peso de 100 g, sacrificados por decapitação. As glândulas pineais foram retiradas e acondicionadas em tubo de centrifuga contendo meio de cultura DMEM mantido em gelo.

A dissociação enzimática foi feita através do Kit de digestão proteolítica com papaína (*Papain Dissociation System, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey*). A dissociação foi realizada de acordo com o protocolo do fornecedor.

Este Kit é composto basicamente:

1. Frasco de papaína, uma protease de peso molecular 23KDaltons. Como a papaína não é reativa em sua forma cristalina nativa este frasco

contém também um agente redutor suave, a L-cisteína, que ativa a papaína e também, em conjunto com outra substância, o ácido etilenodiaminetetracético (EDTA), que age como agente estabilizador para a papaína;

2. Frasco de Desoxirribonuclease (Dnase), esta enzima é uma endonuclease que digere filamentos simples e duplos de DNA;
3. Frasco de ovomucóide, uma glicoproteína inibidora de protease, de peso molecular da aproximadamente 28KDaltons. Este frasco também contém albumina sérica bovina, substância que remove exonucleases, endonuclease, ribonuclease e atividades de protease, além de ser um agente estabilizante em reações;
4. Tampão, que no caso é o Earle's Balanced Salt Solution (EBSS).

Inicialmente, em fluxo laminar, foi realizado o seguinte procedimento:

1. Adicionou-se 5 ml de EBSS no frasco de papaína;
2. Adicionou-se 500 µl de EBSS no frasco de Dnase, agitando levemente, resultando em uma solução de 2000 U/ml de Dnase;
3. Ressuspendeu-se o ovomucóide com 32 ml de EBSS (suficiente para 5 digestões);
4. Adicionou-se ao frasco de papaína 250 µl da solução de Dnase (2), acertando o pH para 7,4 com carbogênio (95% CO₂ e 5% O₂);
5. Colocou-se em um tubo de centrifuga (15 ml) 2,7 ml de EBSS, 300 µl de ovomucóide e 150 µl da solução de Dnase, acertando o pH para 7,4 com carbogênio.

As glândulas foram lavadas com PBS, picotadas com uma tesoura cirúrgica e colocadas na solução enzimática equilibrada com 95% O₂ e 5% CO₂ e incubadas em banho com agitação plana (cerca 100 ciclos por minuto) a 37 °C por 50 min. Após esse período o tecido foi dissociado mecanicamente usando-se uma pipeta Pasteur e a proteólise foi interrompida pela adição de ovomucóide. As células foram precipitadas por centrifugação (Beckman CS 6-R) a 300 g por 5 min a uma temperatura de 20 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 5ml de meio DMEM acrescido de soro fetal bovino 10% filtrado

(Cultilab). O meio contendo as células foi passado no filtro “Cell Strainer” da Falcon (70 μ m) para retirar os tecidos não digeridos.

3.3 CONTAGEM CELULAR

As células foram coradas com azul de tripano, substância que penetra nas células mortas devido à alteração da integridade da membrana, permitindo assim, uma contagem somente de células vivas.

Foi retirada uma alíquota de 10 μ l do meio de cultura, no qual as células foram ressuspensas, acrescentou-se 10 μ l do corante azul de tripano para realizar a contagem celular na câmara de *Neubauer*. A concentração celular foi calculada levando em consideração as diluições e o volume da câmara, obtendo-se, então, a quantidade de células por ml. Esse procedimento resulta em 2×10^5 células (85 a 90% de pinealócitos e 10 a 15% de astrócitos) por glândula, quando utilizamos em média 40 a 50 animais.

3.4 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Após a dissociação, as células foram distribuídas em placas de cultura com 6 poços (2×10^5 cél/ml, 3 ml por poço), mantidas em estufa umidificada a 37 °C, 5% de CO₂. 24 horas após procedeu-se à troca do meio de cultura (neste momento, retirava-se o sobrenadante, onde se concentravam os pinealócitos, que eram transferidos para outra placa de modo a serem cultivados isoladamente). Após essa primeira troca, a cada 48 horas trocava-se 50% do meio de cultura das células remanescentes, os astrócitos, que permaneceram aderidas ao fundo da placa.

Como, nos primeiros experimentos foi observado um crescimento muito rápido dos astrócitos, duas modificações foram realizadas nos experimentos subsequentes.

A primeira foi utilizar no primeiro dia garrafas de 75 cm² cada qual com um volume de 15 ml, e reduzir a concentração celular total para 10^5 células/ml ou 5×10^4 células/ml, aumentando, assim, a quantidade final de células astrocitárias obtidas. A segunda modificação foi a de realizar a segunda troca do meio de

cultura somente no 7º dia, com isso, mantendo na cultura os fatores de crescimento produzidos pelos astrócitos.

As culturas de astrócitos assim obtidas foram utilizadas experimentalmente somente após estabelecer-se a confluência celular, o que acontecia entre o 7º e o 9º dias, em geral.

Essas culturas exclusivas de astrócitos foram incubadas com noradrenalina 1µM por um período de 2 horas. Os meios de cultura foram colhidos para dosagem da angiotensina II.

3.5 CULTURA PRIMÁRIA DE PINEALÓCITOS

Como descrito acima, os pinealócitos ficaram durante as primeiras 24 horas em co-cultura com os astrócitos. Após esse período, transferiu-se todo o sobrenadante para um tubo de centrifuga de 50 ml, onde o material foi centrifugado a 300 g por 5 min a 20 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os pinealócitos em 1ml de meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino.

O material celular foi contado na câmara de *Neubauer* e as células foram ressuspendidas em um volume adequado de meio para a concentração celular final de 2×10^5 células/ml. Em seguida, os pinealócitos foram semeados em placas de 6 poços (3 ml/ por poço) ou em garrafas de 25 cm² (5 ml).

Para padronizar a metodologia adequada para o cultivo de pinealócitos isolados, avaliou-se os efeitos de um inibidor mitótico, a citosina β-D-arabinofuranosídeo (AraC) nas concentrações de ou 4, 8 ou 10 µM, associadamente ou não ao processo de transferência do sobrenadante 24 horas após a dissociação das células da pineal. Foi feita uma contagem diária dos astrócitos, nas diferentes condições, em 10 campos observados ao microscópio (área de 2,55 mm²) com um aumento de 100x em 5 garrafas por tratamento.

3.6 CO-CULTURA

Após as culturas de astrócitos atingirem o grau de confluência celular (7 a 10 dias) elas foram lavadas 3 vezes em DMEM e incubadas por mais 2 dias em meio sem soro fetal bovino.

Sobre essa monocamada glial foram semeados os pinealócitos mantidos em cultura ou o conjunto das células obtidas pelo procedimento básico de dissociação celular da glândula pineal. Essas co-culturas foram mantidas por 48 h em DMEM com 10% de soro fetal bovino, quando foram utilizadas experimentalmente.

3.7 TRATAMENTO DOS PINEALÓCITOS E ASTRÓCITOS

Os pinealócitos isolados, após a transferência do sobrenadante e centrifugação foram ressuspensos em meio DMEM sem soro fetal bovino. Após esse processo foram deixados descansar por 1 hora, quando então foram estimulados ou não com noradrenalina 10^{-6} M (por um período de 5 horas), ou noradrenalina 10^{-6} M associada com angiotensina II 10^{-5} M, além de serem submetidos ao tratamento crônico com losartan 10^{-5} M, adicionado ao meio de cultura imediatamente após a dissociação.

Já a estimulação dos astrócitos com noradrenalina 10^{-6} M foi realizada quando a cultura apresentava confluência das células formando uma monocamada, o que se deu entre o sétimo e o nono dia após a digestão proteolítica.

A noradrenalina foi diluída em uma solução de HCL (0,01N), resultando uma solução de noradrenalina a 10^{-2} M. Essa solução então foi diluída em uma solução de ácido ascórbico a 10^{-2} M, resultando em uma solução de concentração de noradrenalina 10^{-4} M.

As células então foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C, 5% de CO² por 2 horas. Em seguida foram retirados os 3ml de meio de cada poço, sendo armazenados em congelador a -80°C para posterior dosagem de angiotensina II.

Adicionou-se, neste momento, 2 ml de ácido perclórico a cada poço, sonicando-se cada um por 1 min. Após esse procedimento deve-se retirar o conteúdo dos poços, coloca-los em um frasco de centrifuga e centrifugá-lo a uma velocidade de 14000 rpm a 20 °C por 4 min. Desprezou-se o precipitado e armazenou-se o sobrenadante a -80 °C.

3.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PARA MELATONINA

A melatonina foi dosada em um sistema de cromatografia líquida de alta resolução, com detecção eletroquímica (HPLC, WATERS, Milford, Mass., USA).

O sistema cromatográfico é composto por bomba Waters 510 operada isocraticamente, coluna Resolve C18 (partícula esférica de 5 mm, 3,9x150 mm) e detector eletroquímico Waters 464 operado em modo DC e controlado por um programa computacional máxima 820, através de interface (Water System Interface Module) programável.

As células (pinealócitos) foram sonicadas (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, N.Y., USA) em 80 µl de ác. perclórico 0,1M acrescido de 0,02% de EDTA e 0,02% de metabissulfito de sódio, por 10 segundos, sendo posteriormente centrifugadas por 2 minutos a 13000g (Eppendorf 5415C Centrifuge, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y., USA)

O sistema cromatográfico foi operado isocraticamente com fluxo de 1,0ml/min e potencial de oxidação de +900mV, usando-se, como fase móvel, uma solução contendo tampão acetato de sódio 0,1M, ácido cítrico 0,1M, EDTA 0,15mM e metanol 30%.

O estoque dos padrões (1mM) foi preparado em uma solução de HCL 0,1M acrescido de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, aliquotado em tubos de microcentrifuga e mantidos em congelador a -85 °C. A alíquota referente a MEL foi diluída em uma solução de ácido perclórico 0,1M, EDTA 0,02% e Metabissulfito de sódio 0,02%, para obtenção das concentrações necessárias à análise.

3.9 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA PARA ANGIOTENSINA II

Como sabemos, a angiotensina II é um composto octapeptídico com baixo peso molecular (PM=1046,2 Dalton). Para sua recuperação, o meio de cultura foi filtrado através de filtro Amicon-Ultra de 15 ml (Millipore). Esse filtro é capaz de reter substâncias com peso molecular superior a 5kD. Após a filtração do meio as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -80 °C.

Foi utilizado o sistema cromatográfico de alta resolução Merck Hitachi L-6000, equipado com uma coluna de fase reversa C-18 (4.6 mm x 250 mm) (TSK-ODS-120 T), fluxo de 1 ml/min, monitorada através de um detector UV variável a

214 nm. O gradiente foi de 5 a 60% de Acetonitrila (90% + 10% de solvente A) em Solvente A (Água + TFA 0.1%) e o tempo do gradiente foi de 35 min.

3.10 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A análise de aminoácidos inicia-se com a liofilização do material que foi obtido através do HPLC. Esse material resultante foi ressuspendido em água deionizada e transferido para uma ampola e, em seguida, secado a vácuo e lavado por 3 vezes, sendo secado a cada lavagem.

Logo após, foram adicionados 100 µl da solução de fenol em HCl 1M, inserindo-se nitrogênio na ampola e fechando-a hermeticamente com maçarico. Esta ampola ficou acondicionada na estufa a 110 °C por 6 a 8 horas. Esta reação tem a função de quebrar as ligações peptídicas, função esta exercida pelo HCl. O fenol utilizado e o meio inerte, proporcionado pela adição de nitrogênio, têm como função evitar a oxidação.

Após esse tempo, é necessário realizar uma lavagem com H₂O (± 50 µl) por três vezes, secando o material a vácuo, para retirar a maior parte do HCl. Em seguida, a amostra foi lavada em uma solução Redry (400 µl de etanol, 400 µl de H₂O e 200 µl de trietilamina (TEA)) por três vezes, secando o material a vácuo após cada lavagem. Essa solução neutraliza o HCl ainda presente na amostra através da TEA, que reage com o mesmo, formando um composto volátil.

A partir do momento em que a amostra está lavada e seca, é iniciado um processo de derivatização, no qual se insere um grupo fenilisotilcianato nos aminoácidos presentes na amostra. Neste processo, adicionou-se 50 µl da solução de derivatização (350 µl de etanol, 50 µl de TEA, 50 µl de fenilisotilcianato e 50 µl de H₂O) à amostra deixando por 10 a 15 min e adicionou-se 350 µl de H₂O.

A amostra foi, então, passada pelo HPLC, com tampão de corrida A, contendo 470ml do tampão de análise (19 g. de acetato de sódio, 1000 ml de H₂O, 0,5 ml de TEA, 200 µl de EDTA a 1M, com pH de 6,4 titulado com ácido acético glacial) e 30 ml de acetonitrila e tampão de corrida B, com 400ml de acetonitrila, 200 ml de H₂O e 100 µl de EDTA a 1M. A utilização do TEA e do EDTA proporciona uma melhor separação dos aminoácidos e conseqüentemente

uma melhor visualização de seus picos. A leitura cromatográfica foi realizada com um comprimento de onda de 254 nm.

Para a análise de aminoácidos da amostra é necessário realizar uma cromatografia nas mesmas condições dos padrões de aminoácidos, para poder comparar pelos tempos de retenção e quantificar os aminoácidos das amostras.

3.11 Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR)

3.11.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total dos pinealócitos e dos astrócitos separadamente foi feita utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram inicialmente solubilizadas no reagente Trizol® por sucessivas pipetagens. Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após esse tempo, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio para 1 ml de Trizol para desproteinização e as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas. Novamente, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Depois desse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 g, 2 a 8 °C. A fase aquosa (superior) contendo o RNA total foi transferida para um tubo novo e autoclavado.

Para a precipitação do RNA, em cada tubo com amostra foi adicionado álcool isopropílico (0,5 ml para cada 1 ml de Trizol®), e essa solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g, 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado. Ao precipitado foi adicionado 1ml de etanol 75%. Após cuidadosa agitação, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 12.000 g, 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado e os tubos com os precipitados foram deixados por 10 minutos à temperatura ambiente para que o etanol secasse por completo. Após esse tempo, o precipitado contendo o RNA total foi ressuspendido em água DEPC e estocado a -70 °C até o dia do ensaio.

Antes de sua utilização, uma amostra de cada extração foi quantificada e analisada quanto à pureza e integridade por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. E através de eletroforese em gel de agarose

desnaturante a 1,2% foi verificada a integridade do RNA isolado. As bandas foram reveladas sob luz ultravioleta.

3.11.2 Obtenção do cDNA e Amplificação dos Genes de Interesse por PCR

Uma amostra de 5 µg de cada RNA foi submetida à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5 mM cada), primers randômicos (150 ng) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas por 50 min à 42 °C, seguido de aquecimento à 70 °C por 15 min para desnaturação da enzima. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas reações de PCR, amplificações de 40 ciclos, utilizando-se primers específicos para os genes de interesse, 10 pmol de cada primer em 100 µL de master mix, e a enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega/USA), conforme instruções do fabricante. Os primers usados para RT-PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento e o tamanho dos seus produtos amplificados estão descritos no quadro abaixo.

Primer	Seqüências sense (5'-3')	Seqüências antisense (5'-3')	Temp.	Pares de Bases
β1	AGTGCTGCGATTTCGTC ACC	ACCCATGATGATGCCAGT G	61,4° C	320
α1	GAAATTGCTGACATTGT GGACACC	TCATGTTATCTGAAGGGCG GTAGG	54°C	241

Para controle negativo e positivo utilizou-se água e cDNAs de coração e córtex, respectivamente. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose-EtBr 1,2%, visualizados com iluminação ultravioleta e as imagens foram adquiridas em equipamento de fotovideodocumentação.

3.12 Microscopia Confocal

Os pinealócitos foram centrifugados a 300 g por 5 minutos a 20 °C. Ressuspendeu-se o precipitado em meio DMEM na concentração de 5×10^5 células/ml, e colocou-se fluo 4 (5 µl/ml), deixando por 1h no banho maria a 37 °C*.

As placas para microscopia confocal foram tratadas com poli-l-lisina (0,01%) (200 µl), por 1h. Após esse período retirou-se o excesso de poli-l-lisina.

Após o tratamento com fluo 4 os pinealócitos foram centrifugados a 300 g por 5 minutos a 20 °C, e depois ressuspensos com 1ml de meio e centrifugados novamente (repetição de 3 vezes para lavar os pinealócitos e tirar a fluorescência do meio). Ressuspendeu-se os pinealócitos com 1ml de DMEM, colocou-se 200 µl em cada placa tratada com poli-l-lisina (0,01% - 200 µl, por 1h. Após esse período retirou-se o excesso de poli-l-lisina) e esperou-se por 5 minutos para a adesão*. Os pinealócitos foram levados para o microscópio confocal da Carl – Zeiss modelo LSM 510, onde foram estimulados com Angiotensina II (10^{-8} M). A excitação foi feita no comprimento de onda de luz de 505nm e a emissão no comprimento de onda de 530 nm*.

Foram analisados, em média, 15 pinealócitos por placa. Os gráficos para a análise da microscopia confocal foram montados no programa ORIGIN 5.0.

*Os procedimentos foram realizados no escuro pelo fato do Fluo 4 ser fotossensível.

3.13 Imuno-fluorescência para detecção de GFAP e VIMETINA

As células (pinealócitos e astrócitos) em suspensão foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4) após breves centrifugações e fixadas em paraformaldeído a 2% em PB. Após 10-15 minutos de fixação as células foram lavadas novamente com PB, espalhadas sobre lâminas gelatinizadas e colocadas em placa quente (37 °C) por 15 minutos para secar.

As células aderidas às lâminas foram então incubadas com um anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra uma proteína glial marcadora de astrócitos (GFAP e VIMETINA; Sigma, Saint Louis, MO, USA) diluído a 1:2000 em PB contendo 0,01% de Triton X-100. As incubações com os anticorpos primários foram conduzidas por 14-20 horas à temperatura ambiente em uma câmara úmida. Após três lavagens (10 minutos cada) em PB, as células foram incubadas

com um anticorpo secundário anti-camundongo feito em burro marcado com isotiocianato de fluoresceína (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) diluído a 1:50 em PB por 2 horas. As células foram então lavadas em PB as lâminas forma cobertas com laminulas utilizando um tampão glicerol-carbonato. O material foi então analisado em microscópio de fluorescência e imagens digitais foram coletadas e montadas com o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, USA).

3.14 TÉCNICA DE WESTERN BLOT APLICADA NAS GLÂNDULAS PINEAIS

As glândulas pineais provenientes de ratos machos, da linhagem Wistar, com peso de 100 g, foram mantidas em cultura por 48 horas como descrito acima. As glândulas foram incubadas por diferentes períodos (0 min; 5 min; 10 min; 15 min; 30 min; 60 min e 120 min), com Angiotensina II 10^{-5} M, e/ ou Losartan 10^{-5} M e/ ou Noradrenalina 10^{-6} M. Após esse período de incubação, as glândulas foram lavadas com solução de Hank's e cada grupo transferido para eppendorfs (previamente marcados) contendo 100 μ l de tampão imunoprecipitado gelado (contendo 100 mM Tris, pH=7,6; 1% triton X-100; 0,01 mg/ml aprotinina; 2 mM PMSF; 10 mM Na_3VO_4 ; 10 mM NaF; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e 10 mM EDTA) , onde foram sonicados Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, N.Y., USA) por 10 segundos e acondicionados em gelo picado até última amostra.

Em seguida, os extratos teciduais foram centrifugados (centífuga BECKMAN 70.1 Palo Alto, CA, USA) a 1200rpm a 4 °C por 30 min para a remoção do material insolúvel. Após esse processo foi realizada a quantificação de proteína das amostras (através do reagente Bradord - Bio Rad)).

O sobrenadante das amostras foram imunoprecipitados com anti-fosforotirosina, anti-IRS-1, anti-JAK, anti-AKT ou anti-PI3K por 4 horas, após esse tempo, foi adicionado 50 μ l de proteína A (Sepharose 6MB) e após 2 horas os precipitados foram coletados por centrifugação e lavados por 3 vezes com tampão específico. As proteínas foram tratadas com tampão Laemmli contendo DTT a 100 nM e aplicadas (200 μ g) no gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) 8%, onde foram separados eletroforicamente juntamente com tampão de corrida previamente diluído, em aparelho para minigel (Bio-Rad).

O SDS-PAGE foi submetido inicialmente a 30 volts por aproximadamente 45 min ou até que as proteínas ficassem alinhadas e ultrapassassem a porção inicial do gel, e essa voltagem foi aumentada em 30 volts a cada 15 min até que a voltagem de 120 volts fosse atingida. Em cada gel foi aplicado, como padrão um marcador pré-corado de pesos moleculares conhecidos com valores estabelecidos em miosina (195-205 kDa), β -galactosidase (116kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

As proteínas separadas no SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o equipamento de eletrotransferência em cuba de minigel da Bio-Rad mantido sob uma voltagem constante de 120 v, em tampão de transferência durante 2 horas.

Após a eletrotransferência das proteínas, as membranas foram pré-incubadas por 2 horas a temperatura ambiente na solução bloqueadora para reduzir a ligação de proteínas inespecíficas à membrana. As membranas foram, então, lavadas por três sessões de 10 min, com 10 ml de solução basal e incubadas por 4 horas a 22 °C com anticorpo secundário em solução Tampão bloqueadora com leite Molico a 1%.

As bandas das proteínas nas membranas foram visualizadas utilizando o Kit de reagente ECL de detecção para Western blotting, por quimioluminescência. O excesso do reagente líquido foi retirado das membranas e essas manipuladas em câmara escura. As membranas foram, então, fixadas em cassete contendo o filme para auto-radiografia. O tempo de exposição variou de 1 min a 40 min de acordo com o anticorpo utilizado.

Após a exposição da membrana o filme foi revelado utilizando líquido de revelação e fixador próprio para tal procedimento (Kodak). As intensidades das bandas das auto-radiografias reveladas foram quantificadas por densitometria ótica, utilizando o programa Scion Image Software (Frederick, MD, USA). Os cálculos estatísticos foram feitos com o programa Prism 3.0 utilizando o Test-t Student's.

3.15 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism 5. A análise de variância foi realizada pelo teste ANOVA unifatorial ou multifatorial e o pós-teste utilizado foi o teste de Bonferroni para comparação entre todos os grupos experimentais ou os testes de Dunnett e Newman-Keuls para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle. Os gráficos para análise dos resultados da microscopia confocal foram feitos utilizando o programa Origin 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA CULTURA DE PINEALÓCITOS E ASTRÓCITOS SEPARADOS

4.1.1 IMAGENS DA CULTURA

Nas **Figuras 9, 10 e 11** abaixo estão apresentadas as fotomicrografias das culturas de astrócitos e de pinealócitos isolados e da co-cultura de ambas as células.

A cultura de astrócitos aqui representada ainda não está em confluência, pois é uma cultura mantida por apenas 5 dias. Os pinealócitos, após permanecerem juntos em cultura, tendem a se associar, como pode ser observado na **Figura 10**. Na co-cultura de pinealócitos e astrócitos pode-se observar que os pinealócitos ficam sobrepostos aos astrócitos. As células com prolongamentos são os astrócitos e as células arredondadas são os pinealócitos (**Figura 11**).

Figura 9: Cultura de astrócitos isolados. Aumento de 200x.

Figura 10: Cultura de pinealócitos isolados. Aumento de 200x.

Figura 11: Co-cultura de astrócitos e pinealócitos. Aumento de 100X.

Utilizando a técnica de marcação por imunofluorescência com os marcadores GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e vimentina, ambos marcadores de astrócitos, pode-se verificar a qualidade das culturas em separado de astrócitos e de pinealócitos, obtendo-se marcação para GFAP e vimentina somente para os astrócitos (**Figura 12**).

Figura 12: Imunofluorescência em cultura de astrócitos isolados: (A) Vimentina e (B) proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

Figura 13: Imunofluorescência para o GFAP em cultura de pinealócitos isolados.

4.1.2 TIPOS DE CÉLULAS

Como mostrado na **Figura 14** e **Tabela 1**, testamos diferentes concentrações de AraC (4 μ M, 8 μ M e 10 μ M) com o objetivo de determinar a mais eficaz na eliminação ou redução dos astrócitos contaminantes.. Fizemos uma estimativa diariamente da quantidade de astrócitos pela contagem dos astrócitos presentes em diferentes campos da garrafa de cultura observados em microscópio com aumento de 100X.

Esse procedimento foi testado em duas situações: 1) células dissociadas e imediatamente incubadas com AraC para impedir a multiplicação dos astrócitos (**Tabela 1, Figura 14**); 2) após 24h da dissociação celular, separou-se o meio, como relatado acima, semeando-se, primordialmente os pinealócitos acrescidos, então, da AraC (**Tabela 2, Figura 15**).

Como mostram as tabelas e figuras abaixo, os grupos com transferência após 24 horas, apresentaram uma redução muito mais acentuada dos astrócitos no 3º dia (10 vezes), quando comparados com os grupos sem transferência, independentemente do tratamento a que foram submetidos, demonstrando a efetividade do processo de transferência, portanto, no aumento da pureza das culturas de pinealócitos.

As concentrações de 8 μ M e 10 μ M de AraC não apresentaram diferença em sua efetividade, tanto no grupo sem transferência das células como grupo com transferência ($p \geq 0,05$). Porém, ambas foram mais efetivas no impedimento do crescimento astrocitário se comparadas ao grupo incubado com AraC 4 μ M ($p < 0,05$).

Tabela 1: Cultura sem transferência. Porcentagem de astrócitos em relação ao total de células obtidas no processo de digestão enzimática, durante o tempo da cultura. As células foram incubadas desde o primeiro dia com AraC e não houve transferência das mesmas. Comparação feita por ANOVA seguida pelo teste de Newman Keuls. * $p < 0.01$.

Tempo de cultura	Grupos Experimentais			
	Controle	AraC 4 μ M	AraC 8 μ M	AraC 10 μ M
1º dia	0,33%	0,24%	0,27%	0,20%
2º dia	2,93%	2,56%	2,67%	2,69%
3º dia	3,93%	2,68%	2,80%	2,66%
4º dia	10,79%	2,22%	1,33%	1,33%
5º dia		1,83%	0,96%	0,80%
6º dia		2,78%	1,18%	0,73%
7º dia		2,75%	1,11%	0,68%
8º dia		3,02%	0,97%	0,80%
9º dia		2,99%	1,31%	0,69%

Figura 14: Número de astrócitos presentes nas culturas de pinealócitos, incubadas ou não com diferentes concentrações de AraC. Os tratamentos foram realizados no dia da dissociação.

Tabela 2: Cultura com transferência. Porcentagem de astrócitos em relação ao total de células obtidas no processo de digestão enzimática, durante o tempo da cultura. As células foram transferidas após 24 horas e incubadas com AraC. Comparação feita pelo teste de Newman Keuls. * $p < 0.01$.

Tempo de cultura	Grupos Experimentais			
	Controle	AraC 4 μ M	AraC 8 μ M	AraC 10 μ M
1º dia	0,39%	0,20%	0,29%	0,30%
2º dia	2,47%	3,00%	2,99%	2,31%
3º dia	0,33%	0,35%	0,38%	0,35%
4º dia	1,58%	0,44%	0,45%	0,30%
5º dia	2,83%	0,28%	0,26%	0,13%
6º dia	12,84%	0,29%	0,22%	0,17%
7º dia		0,31%	0,20%	0,18%
8º dia		0,58%	0,23%	0,15%
9º dia		0,48%	0,18%	0,16%

Figura 15: Número de astrócitos presentes nas culturas de pinealócitos, incubados ou não com AraC, ao longo do tempo. As concentrações de 8 μ M e 10 μ M de AraC não apresentaram diferença em sua efetividade, tanto no grupo sem transferência das células como no grupo com transferência ($p > 0,05$). Porém, ambas foram mais efetivas no impedimento do crescimento astrocitário se comparadas ao grupo incubado com araC 4 μ M ($p < 0,05$).

4.2 ESTUDOS DE EXPRESSÃO DOS ADRENOCEPTORES β e α EM ASTRÓCITOS DA GLÂNDULA PINEAL

Os resultados do PCR mostraram, em astrócitos, tanto a expressão gênica de adrenoceptores do tipo β_1 (**Figura 16**) quanto α_1 (**Figura 17**), indicando a possível presença destes receptores na sua membrana celular e , conseqüentemente, a possibilidade de responderem funcionalmente á estimulação noradrenérgica.

Figura 16: Expressão do RNA mensageiro do receptor beta-adrenérgico do tipo 1. M:banda de pesos moleculares; Sol: Soleus; Pin: glândula pineal; Pi: pinealócitos; As: astrócitos; Cór: Córtex cerebral

Figura 17: Expressão do RNA mensageiro do receptor alfa-adrenérgico do tipo 1. M:banda de pesos moleculares; Sol: Soleus; Cor: coração; Pin: glândula pineal; Pi: pinealócitos; As: astrócitos.

4.3 ESTUDOS FUNCIONAIS COM AS CULTURAS CELULARES ESPECÍFICAS

4.3.1 DOSAGEM DE ANGIOTENSINA II LIBERADA PELOS ASTRÓCITOS

Como podemos observar nas **Figura 18** e **Figura 19**, obtivemos, com a estimulação noradrenérgica de cultura de astrócitos isolados, pela dosagem do meio, uma substância que se assemelha á Angiotensina II tanto no tempo de retenção quanto na composição de aminoácidos.

Figura 18: Cromatograma padrão da angiotensina II.

Figura 19: Cromatograma da amostra obtida de astrócitos pineais estimulados por noradrenalina 10^{-6} M.

4.3.2 EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA SOBRE A SÍNTESE DE MELATONINA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS

Com o intuito de melhor caracterizar a resposta da síntese de melatonina por pinealócitos isolados em cultura, obtiveram-se dados quanto à curva dose-resposta para noradrenalina (**Figura 20**). Esses dados indicam que as células respondem de acordo com a concentração de noradrenalina.

Figura 20 Conteúdo de melatonina do meio de cultura de pinealócitos estimulados com noradrenalina em diferentes concentrações.

4.3.3 EFEITOS DO LOSARTAN SOBRE SÍNTESE DE MELATONINA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS

Os pinealócitos isolados foram submetidos ao tratamento crônico com Losartan 10^{-5} M (antagonista específico de receptores para angiotensina II do tipo AT1 (TIMMERMANS *et.al.*, 1993)), adicionado ao meio de cultura imediatamente após a dissociação. 24 horas após, as células foram recolhidas, centrifugadas e contadas (para permanecer com a mesma concentração celular inicial de 3×10^5 células/ml) e, 1 hora depois, as células foram estimuladas ou não com Noradrenalina 10^{-6} M por um período de 5 horas (tempo suficiente para que ocorresse a síntese de melatonina).

Os resultados mostram (**Figura 21 e Tabela 3**) que a síntese de melatonina estimulada pela noradrenalina não foi reduzida pela pré-incubação dos pinealócitos com Losartan, diferentemente do que se observa com glândulas intactas. Esses dados favorecem a hipótese da necessidade da interação parácrina entre pinealócitos e astrócitos para que haja a potenciação exercida pela angiotensina II via receptores AT₁.

Tabela 3: Médias $\pm$ erros-padrões dos conteúdos de melatonina de pinealócitos incubados ou não com noradrenalina pré-incubados ou não com Losartan. $p < 0,05^*$ relativamente ao grupo controle. Análise estatística Anova seguida de Newman Keuls, três blocos experimentais.

	Controle ng/3x10 ⁵ cel	Noradrenalina ng/3x10 ⁵ cel	Losartan ng/3x10 ⁵ cel	Losartan+Noradrenalina ng/3x10 ⁵ cel
Melatonina	0,00 $\pm$ 0,00	1,072 $\pm$ 0,187*	0,00 $\pm$ 0,00	1,342 $\pm$ 0,1835*

Figura 21: Pinealócitos incubados ou não com Noradrenalina 10⁻⁶M e tratados cronicamente com Losartan 10⁻⁵M.

4.3.4 EFEITOS DA ANGIOTENSINA II SOBRE SÍNTESE DE MELATONINA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS

Pinealócitos isolados, após a transferência do sobrenadante e centrifugação, foram ressuspensos em meio DMEM sem soro fetal bovino, para evitar a presença de angiotensina II. Após esse processo foram deixados descansar por 1h, quando então foram estimulados ou não com noradrenalina 10^{-6} M ou noradrenalina 10^{-6} M associada com angiotensina II 10^{-5} M.

O gráfico (**Figura 22**) mostra o efeito de potenciação da angiotensina II associada com noradrenalina sobre a síntese de melatonina, demonstrada anteriormente que se confirmou no conjunto dos dados. ($p < 0,05$).

Figura 22 Conteúdo de melatonina do meio de cultura em que pinealócitos isolados foram cultivados e estimulados com noradrenalina $1\mu\text{M}$, em associação ou não com a angiotensina II ($10\mu\text{M}$). * $p < 0,001$ para comparação com o grupo controle; ** $p < 0,01$ para comparação com o grupo Noradrenalina.

4.3.5 EFEITOS DO LOSARTAN SOBRE A POTENCIAÇÃO PROVOCADA PELA ANGIOTENSINA II SOBRE SÍNTESE DE MELATONINA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO NORADRENÉRGICA EM CULTURA DE PINEALÓCITOS ISOLADOS

Em outro experimento, além de analisar-se a ação da angiotensina II adicionada à estimulação por noradrenalina, avaliou-se também o antagonismo do losartan. Observou-se que, além da potenciação induzida pela Ang II na síntese de melatonina (confirmada neste experimento), o losartan reverteu este efeito, confirmando o envolvimento dos receptores do tipo AT1 nas ações da angiotensina II (**Figura 23**).

Figura 23: Conteúdo de melatonina do meio de cultura de pinealócitos isolados, estimulados com noradrenalina 1 μ M, em associação ou não com a angiotensina II (10 μ M) e losartan (10 μ M). * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; ** $p < 0,001$ (Nor x Nor + Ang II); *** $p < 0,001$ (Nor + Ang II x Nor + Ang II + Los). Não diferença estatística entre Nor e Nor + Ang II + Losartan.

4.3.6 ESTUDOS FUNCIONAIS USANDO CO-CULTURA DE PINEALÓCITOS E ASTRÓCITOS

Diferentemente de pinealócitos isolados e confirmando a hipótese de os astrócitos serem responsáveis pela liberação de angiotensina quando estimulados por noradrenalina, a co-cultura dos dois tipos celulares é capaz de ter o efeito estimulatório da noradrenalina reduzido pela incubação com losartan (meio de cultura, $p < 0,05$) (**Figura 24**).

Figura 24: Conteúdo de melatonina de pinealócitos cultivados na presença de astrócitos, em uma cultura mantida por 48h. Não houve troca do meio de cultura. As células foram estimuladas com noradrenalina 1 μ M, associadamente ou não ao losartan 10 μ M (o qual esteve presente desde o primeiro dia). * $p < 0,05$

4.4 ANÁLISE DE INFLUXO DE CÁLCIO USANDO-SE O MICROSCÓPIO CONFOCAL

A estimulação por Angiotensina II de pinealócitos isolados provocou uma entrada de cálcio como mostrado na **Figura 25**.

Angiotensina 2×10^{-5}

Média do ratio de fluorescência: $14 \pm 4,503966506$
 N: 8
 Porcentagem de células que responderam: 33%

Figura 25: Média da fluorescência medida 8 pinealócitos por microscopia confocal em quando expostos à Angiotensina II na concentração de $2 \times 10^{-5}M$

4.5 ESTUDOS FUNCIONAIS USANDO A ANÁLISE PROTÊICA POR WESTERN BLOT

Como vimos à literatura mostra que o receptor de Angiotensina II está ligado a vias de transdução que implicam em fosforilação em tirosina que, por sua vez, podem estar ligadas à ativação da triptofano hidroxilase. Com o intuito de detectar o grau de fosforilação promovido pela estimulação do receptor AT_1 , as glândulas pineais foram extraídas em diferentes tempos (0min; 5min; 10min; 15min; 30min; 60min e 120min), após a estimulação com Angiotensina II $10^{-5}M$. As alíquotas contendo a mesma concentração de proteínas ($40\mu g$) foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpo antifosfotirosina. Como podemos verificar pela **Figura 26**, a Angiotensina II induz uma rápida fosforilação em tirosina, já após 5 minutos de incubação, sinal esse que retorna após 2 horas.

Figura 26: Avaliação do grau de fosforilação em tirosina induzido pela Angiotensina II. As proteínas foram tratadas diretamente com Laemmli e aliquotadas com a mesma concentração (40 μ g). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto radiografia corresponde ao conjunto de 9 glândulas por grupo experimental.

Marrero e colaboradores (1995) demonstraram através de células de músculo liso da aorta de rato, que a Angiotensina II induz uma rápida fosforilação em tirosina quinases intracelulares (Jak-2 e STAT) e essa fosforilação está associada a um aumento da atividade da Jak-2. Utilizando anticorpos específicos anti-JAK-2 e anti-fosfotirosina, podemos avaliar a quantidade e o grau de fosforilação dessa quinase, frente à estimulação pela angiotensina II (**Figura 27**).

Figura 27: O gráfico **A** mostra a quantidade de Jak-2 expressa nas proteínas provenientes das glândulas pineais estimuladas com angiotensina II. As proteínas foram extraídas em uma solução tampão específica e imunoprecipitadas com anticorpo anti-jak-2. O gráfico **B** mostra o grau de fosforilação da quinase Jak-2. As proteínas foram extraídas em uma solução tampão específica e imunoprecipitadas com anticorpo anti-jak-2 e imunoblotadas com anticorpo antifosfotirosina. A representação gráfica da densitometria óptica realizada corresponde ao conjunto de 9 glândulas por grupo experimental

Em glândulas estimuladas com Noradrenalina 10^{-6} M e extraídas em diferentes tempos (0min; 5min; 15min; 30min; 60min e 120min), nota-se um pequeno aumento da fosforilação em tirosina quinase aos 5 e 15 minutos decorrente do aumento da atividade da Jak-2 (**Figura 28**).

Figura 28: Grau de fosforilação da quinase Jak-2 em glândulas estimuladas por noradrenalina 10^{-6} M. As proteínas foram extraídas em tampão específico imuniprecipitadas com anticorpo anti Jak-2 e imunoblotadas com anticorpo anti p-Try. A representação gráfica da desintometria óptica realizada em auto radiografia corresponde ao conjunto de 9 glândulas por grupo experimental.

5 DISCUSSÃO

Os dados relatados por Dos Santos, 2203 e Baltatu et al., 2202, indicaram, pela primeira vez na literatura, que o sistema renina-angiotensina local pineal poderia modular diretamente a síntese de melatonina estimulada pela noradrenalina que ocorre nos pinealócitos.

Neste trabalho os autores demonstraram que há uma redução 20 a 50% nos níveis de melatonina em glândulas pineais desnervadas estimuladas, *in vitro*, por noradrenalina, quando da pré-incubação com Losartan, um bloqueador de receptores AT₁ angiotensinérgicos. Demonstraram, adicionalmente, que animais geneticamente deficientes na síntese de angiotensinogênio cerebral, mostram uma redução considerável no pico noturno de melatonina produzida pela glândula pineal.

Sabendo-se que a síntese de angiotensina II pineal esta, aparentemente, na concentrada nos astrócitos e que os receptores de angiotensina II estão nos pinealócitos, os autores levantaram a hipótese de existir uma interação parácrina entre esses dois tipos de células regulando a síntese melatonina. Mais explicitamente, a noradrenalina, ao mesmo tempo em que age nos adrenoceptores na membrana dos pinealócitos, age sobre os astrócitos fazendo com que houvesse secreção de angitensina II que, por sua vez agiria sobre os receptores AT₁ existentes no pinealócitos potenciando, por alguma de suas vias de transdução, a síntese de melatonina.

Com essas idéias em mente, este trabalho foi planejado.

Em primeiro lugar, foi necessário desenvolver um método que permitisse dissociar os tipos celulares da glândula pineal e cultivá-los separadamente. Só assim seria possível testar as várias hipóteses levantadas anteriormente.

Como demonstrado, com o método proposto foi possível desenvolver culturas primárias relativamente puras de astrócitos e de pinealócitos, com células viáveis por tempo suficiente para que os experimentos pudessem acontecer.

Em primeiro demonstrou-se que a estimulação noradrenérgica de culturas de astrócitos, provocaram a liberação no meio de cultura de angiotensina II, cromatograficamente detectada. Além disso, demonstrou-se a existência da expressão do RNA mensageiro para adrenoceptores nesse tipo celular,

levantando a hipótese de os receptores, uma vez sintetizados serem os responsáveis pela secreção da angiotensina II.

Demonstrou-se, em seguida, que, diferentemente do que acontece com glândulas *in vitro*, a estimulação de pinealócitos isolados com noradrenalina não é afetada pela presença de Losartan.

Ou seja, não há, como acontece em glândulas intactas, nos pinealócitos, os componentes moleculares necessários para que se expresse a demonstrada potenciação exercida pela angiotensina II sobre a síntese de melatonina induzida pela estimulação noradrenérgica.

Por outro lado, se, neste mesmo tipo de cultura (pinealócitos isolados), se adicionar angiotensina II junto com a noradrenalina, o efeito sobre a síntese de melatonina é consideravelmente maior daquele que se obteria se a estimulação fosse unicamente com a noradrenalina. Nesse caso, a pré-incubação com Losartan faz com que apareça o efeito redutor da estimulação noradrenérgica.

Para completar o quadro, quando fazemos a co-cultura pinealócitos + astrócitos, o conjunto se comporta como a glândula e mostra o efeito bloqueador do Losartan à estimulação noradrenérgica.

Restava por demonstrar quais as vias de transdução mobilizadas pela angiotensina II nos pinealócitos.

Em primeiro lugar, demonstramos que a estimulação dos pinealócitos por angiotensina induz um influxo de cálcio detectável por imunofluorescência e microscopia confocal. Esse aumento na concentração intracelular de cálcio poderia, por si, potenciar o efeito da estimulação noradrenérgica na síntese de melatonina, como discutido anteriormente.

Além disso, no entanto, demonstrou-se, também, que a angiotensina mobiliza vias que implicam em fosforilação de tirosina e, em particular do sistema JAK/STAT, sistema que é igualmente mobilizado pela noradrenalina.

Dessa forma, parece que a angiotensina II mobiliza um conjunto de vias de transdução todas elas sinérgicas às vias de transdução mobilizadas pela noradrenalina, resultando num aparente reforço do sinal noradrenérgico e, conseqüentemente, uma potenciação no seu efeito indutor da síntese de melatonina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANHÊ, G.F.; CAPERUTO, L.C.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; SOUZA, L.C.; HIRATA, A.E.; VELLOSO, L.A.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C.R.O. In vivo activation of insulinreceptor tyrosine kinase melatonin in the rat hypothalamus. *Journal of Neurochemistry*, v. 90, p. 559-566, 2004.
- ARDAILLOU, R. AngiotensinII receptor. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: S30-S39, 1999.
- BALTATU, O.; BADER, M.; GANTEN, D. Brain and renin-angiotensin system. NICHOLLS, M. G.; IKRAM, H.; BRUNNER, H.; WALKER, F.; SWEET, C. (Ed.). 100 Years of Renin-Angiotensin System. Oxford: Hughes Associates, 1998. p. 167-170.
- BALTATU, O.; NISHIMURA, H.; HOFFMAN.; STOLTENBURRG, G.; HAULICA, D.; LIPPOLDT, A.; GANTEN, D.; URATA, H. High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary glands. *Brain Res.*, v. 752, p. 269-278, 1997.
- BALTATU, O.; AFECHE, S.C.; SANTOS, S.H.J.; CAMPOS, L.A.; BARBOSA, R.; MICHELINI, L.C.; BADER, M.; CIPOLLA-NETO, J. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. *Journal of Neurochemistry*, v. 80, p. 328-334, 2002.
- BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D. Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia*, v. 45, p. 939-45, 1989.
- BORJIGIN, J.; WANG, M.M.; SNYDER, S.H. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin-N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*, v. 378, p. 783-785, 1995.
- BROWN, G.M.; BAR-OR, A.; GROSSI, D.; KASHUR, S.; JOHANNSON, E.; YIE, S.M. Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat. *J. Pineal Res.*, v. 10, p. 141-147, 1991.
- BUIJIS, R.M. The anatomical basis for expression of circadian rhythms : the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. In : Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms, *Progress in Brain Research* 111 :229-40, 1996.
- CAJAL, S. R. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres. Paris, Maloine, 1911.
- CIPOLLA-NETO,J.; AFECHE, S.C. Glândula pineal: fisiologia celular e função. In: AIRES, M.M (Ed.). *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 83-93,
- CLAUSER, E.; CURNOW, K.M.; DAVIES, E.; CONCHON, S.; TEUTSCH, B.; VLANELLO, B.; MONNOT, C.; CORVOL, P. AngiotensinII receptors: Protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 134, p. 403-411, 1996.

COON, S.L.; ROSEBOOM, P.H.; BALER, R.; WELLER, J.L.; NAMBOODIRI, A.; KOONIN, E.V.; KLEIN, D.C. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression Cloning and molecular analysis. *Science*, v. 270 p. 1681-1683, 1995.

DEGUCHI, T.; AXELROD, J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal. Biochem.*, v. 50, p. 176-179, 1972.

DOS SANTOS, S.H.J. *Papel da angiotensina II na modulação da síntese de melatonina pela glândula pineal de ratos*. Tese (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.

EHRET, M.; PÉVET, P.; MAITRE, M. Tryptophan hydroxylase synthesis induce by 3', 5' – cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J. Neurochem.*, 57: 1516-1521, 1991.

ERLICH, S.S.; APUZZO, M.L.J. The pineal gland: anatomy, physiology and Clinical significance. *J. Neurosurg.*, v. 63, p. 321-341, 1985.

FINOCCHIARO, L.M.; GOLDSTEIN, D.J.; FRINKIELMAN, S.; NAHMOD, V.E. Interaction of angiotensin II with the cholinergic and noradrenergic systems in the rat pineal gland: regulation of indole metabolism. *J. Endocrinol.*, v. 126, n. 1, 59-66, 1990.

GASTEL, J.A.; ROSEBOOM, P.H.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science*, v. 279, p. 1358-1360, 1998.

HAULICA, I.; BRANISTEANU, D.D.; ROSCA, V.; STRATONE, A.; BERBELEU, V.; BALANG, G.; IONESCU, L. A renin-like activity in pineal gland and hypophysis. *Endocrinology*, v. 96, p. 508-510, 1975.

HIRATA, F.; HAYAISHI, O.; TOHUYAMA, T.; SENOH, S. In vitro and In vivo formation of two new metabolites of de melatonin. *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 1311-1313, 1974.

KAPPERS, J.A. The development topographical relation and innervation of epiphysis cerebri in the albino rat. *Zeit Zellforsch.*, v. 52, p. 163-215, 1960.

KARASEK, M.; REITER, R. J. Morphofunctional aspects of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Techn.*, v. 21, v. 136-57, 1992.

KING, T.S.; STEINLECHNER, S. Pineal indolalkylamine synthesis and metabolism: kinetic consideration. *Pineal Res. Rev.*, v. 3, p. 69-113, 1985.

KITAY, J.L.; ALTSCHULE, M.D. *The pineal gland* Cambridge: Cambridge Harvard University Press, 1954. 79-95.

KLEIN, D.C.; AUERBACH, D.A.; NAMBOODIRI, M.A.A.; WELLER, G.H.I. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In: REITER, R.J. (Ed.). *The Pineal gland*. Boca Raton: CRC Press, 1981.

KLEIN, D.C.; BERG, G.R.; WELLER, J.L. Melatonin synthesis: adenosine 3', 5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. *Science*, v. 168, p. 970-980, 1970.

KLEIN, D.C.; BUDO, M.J.; KAPOOR, C.L.; KRISHNA, G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3', 5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science*, v. 199, p. 309-311, 1978.

KLEIN, D.C.; NAMBOODIRI, M.A.A. Control of the circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity: possible role of protein thiol: disulfide exchange. *TIBS*, p. 98-102, 1982.

KLEIN, D.C.; ROSEBOOM, P.H.; COON, S.L. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme. The first postcloning view. *TEM*, v. 7, p. 106-112, 1996.

KLEIN, D.C.; SCHAAD, D.L.; NAMBOODIRI, M.A.A.; YU, L.; WELLER, J.L.. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 20, p. 299-304, 1992.

KLEIN, D.C.; SUGDEN, D.; WELLER, J.L. Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 80, p. 599-603, 1983.

KLEIN, D.C.; CHIK, C.L.; WELLER, J.L.; HO, A.K. Adrenergic regulation of pineal cAMP and cGMP: evidence for a gating mechanism progress in catecholamine. In: *Molecular and cellular endocrinology*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988. p. 415-422.

KORF, H.W.; STEHLE, J.H. The pineal organ, its hormone melatonin and the photoneuroendocrine system. *Adv. Embryol. Cell. Biol.*, v.146, p. 1-100, 1998.

MARRERO, M. B.; SCHIEFFER, B.; PAXTON, W. G.; HEERDT, L.; BERK, B. C.; DELAFONTAINE, P.; BERNSTEIN, K E. Direct stimulation of Jak/Stat pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*, v. 375, p. 247-250, 1995.

MIZUNOKI.; HASHIMOTO S.; OJIMA M.; KUNII N.; TANI M.; NIMURA S.; WATARI H.; FUKUCHI S. Immunoreactive renin in human brain: distribution and properties. *Jpn. Circ J.*, v. 49, p. 1005-1011, 1985.

MOLLER, M. Fine structure of pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc. Res. Techn.*, v. 21, p. 188-208, 1992.

MORGAN, W.W.; HANSEN, J.T. Time course of the disappearance of pineal noradrenaline following cervical ganglionectomy. *Exp. Brain Res.*, v. 32, p. 429-434, 1978.

NAHMUD, V.E.; BALDA, M. S.; PIROLA, C. J.; FINKIELMAN, S.; GEJMAN, P. V.; VARDINALI D. P. Circadian rhythm and neural regulation of rat pineal angiotensin converting enzyme. *Brain Res.*, v. 236, p. 216-220, 1982.

NAMBOODIRI, M.A.A.; FAVILLA, J.T.; KLEIN, D.C. Pineal N-acetyltransferase is inactivated by disulfide-containing peptides insulin is the most potent. *Science*, v. 213, p. 571-573, 1981.

OHYAMA, K.; YAMANO, Y.; CHAKI, S.; INAGAMI, T. Domains for G protein coupling in angiotensin II receptor subtypes: studies by site-directed mutagenesis. *Biochem, Biophys. Res. Commun*, v. 189, p. 677-683, 1992.

OLCESE, J. Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J. Neurochem.*, v.7, p. 943-947, 1991.

ONISHI, J.; ISHIIIDO, M.; SHIBATA, T.; INAGAMI, T.; MURAKAMI, K.; MIYAZAKI, H. The rat angiotensin II AT_{1A} receptor couples with three different signal transduction pathways. *BBRC.*, v. 186, p. 1094-1101, 1992.

PARFITT, A.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol. Pharmacol.*, v. 11, p. 241-255, 1975.

PÉVET, P. Anatomy of the pineal gland of mammals. In: **Current endocrinology: the pineal gland**. New York: Elsevier Biomedical, 1983. p. 1-75.

PFEFFER, M.; KÜHN, R.; KRUG, L.; KORF, W.H.; STEHLE, H.J. Rhythmic variation in β_1 -adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *European J. Neuroscience*, v. 10, p. 2896-2904, 1998.

RIBELAYGA, C.; PÉVET, P.; SIMMONEAUX, V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.*, v. 777, p. 247-50, 1997.

RIBELAYGA, C.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PÉVET, P.; SIMONEAUX, V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology*, v. 140, p. 1375-84, 1999.

SHEIN, H.M. Control of melatonin synthesis by noradrenaline in rat pineal organ cultures. In: WOLSTENHOLME, G.E.W.; KNIGHT, J. (Ed.) *The Pineal Gland*. London: Churchill Livingstone, 1971. p. 197-206,

SITARAM, B.R.; LEES, G.J. Effect of oxygen on the induction of tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of rat pineal glands. *J. Neurochem.*, v. 42, p. 1183-1185, 1984.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*, v. 45, p. 922-931, 1989.

SUGDEN, D. 5-Hydroxytryptamine amplifies β -adrenergic stimulation of N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *J. Neurochem.*, v. 55, p. 1655-1658, 1991.

SUGDEN, D.; VANECEK, J.; KLEIN, D.C.; THOMAS, T.; ANDERSON, W.B. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature*, v. 61, p. 314-359, 1985.

SUGDEN, A.L.; SUGDEN, D.; KLEIN, D.C. Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J. Biol. Chem.*, 261, n. 25, p. 11608-12, 1986.

SUGDEN, A.L.; SUGDEN, D.; KLEIN, D.C. α_1 -Adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J. Biol. Chem.*, v. 262, n. 2, p. 741-5, 1987.

SUGDEN, D.; KLEIN, D.C. Adrenergic stimulation of rat pineal rat pineal hydroxyindol-O-methyltransferase. *Brain. Res.*, v. 265, p. 348-351, 1983.

TIMMERMANS, P.B.M.W.M.; WONG, P.C.; CHIU, A.T.; HERLIN, W.F.; BENFIELD, P.; CARINI, J.J.; LEE, R.J.; WEXLER, R.R.; SAYE, J.A.M.; SMITH, R.D. AngiotensinII receptors and angiotensinII receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.*, v. 15, p. 205-251, 1993.

VANECEK, J.; SUGDEN, D.; WELLER, J.; KLEIN, D.C. Atypical synergistic α_1 -adrenergic- and β -adrenergic regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3',5 monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*, v. 11, n. 6, p. 2167-2173, 1985.

YU, L.; SCHAAD, N.C.; KLEIN, D.C. Calcium potentiates cyclic Ampc stimulation of pineal arylalkylamine N-acetyltransferase. *J. Neurochem.*, v. 60, p. 1436-1443, 1993.