

Rafael Maso Prévide

**Efeito da pinealectomia na expressão e atividade das enzimas
antioxidantes no córtex pré-frontal, fígado e sóleo**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

Rafael Maso Prévide

**Efeito da pinealectomia na expressão e atividade das enzimas antioxidantes
no córtex pré-frontal, fígado e sóleo**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Prévide, Rafael Maso.

Efeito da pinealectomia na expressão e atividade das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal, fígado e sóleo / Rafael Maso Prévide. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Cipolla Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do animal pinealectomizado.

Versão do título para o inglês: Effect of pinealectomy on the expression and activity of antioxidant enzymes in the prefrontal cortex, liver and soleus.

Descritores: 1. Melatonina 2. Pinealectomia 3. Glutathione peroxidase 4. Catalase 5. PCR em tempo real I. Cipolla Neto, José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0143/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Maso Prévide.

Título da Dissertação: Efeito da pinealectomia na expressão e atividade das
enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal, fígado e
sóleo.

Orientador(a): José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**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 49 nas fls. 69 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Cipolla Neto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo dos mecanismos de produção da melatonina mitocondrial** do qual participou(aram) o(s) alunos **Rafael Maso Prévide, Rafael Peres**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **15.05.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de maio de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, José Cipolla Neto, por ter me aceito em seu laboratório e compartilhado o grande conhecimento que possui sobre melatonina e a glândula pineal neste período.

Aos meus pais, Archimedes e Maria Edna, por apoiarem minha decisão de vir para São Paulo realizar minha pós-graduação. Não é fácil superar a distância, mas meu pensamento está em vocês todos os dias!

Aos meus irmãos, Renato e Rosana, pelo carinho e companhia, mesmo que seja “online”.

A minha tia Eunice, que é uma segunda mãe para mim aqui em São Paulo e sempre me oferece um lar aos domingos.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A Julieta H. Scialfa, minha grande amiga e colega de trabalho, que presta um serviço imprescindível ao nosso laboratório e nos acompanha em nossas noites de trabalho. Não tenho palavras para te agradecer Ju, meu carinho por você é eterno.

A Daniella do Carmo Buonfiglio e Fernanda Gaspar do Amaral por me ensinarem as técnicas de biologia molecular presentes neste trabalho e ao Marco Taneda por me ensinar a técnica de pinealectomia e realizar as cirurgias dos meus animais.

Agradeço ao prof. Rui Curi por ceder seu laboratório para a realização dos ensaios de atividade enzimática e ao Kaio Vitzel por me ajudar na realização dos mesmos.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia, Rosana Dantas, Ana Lopes, Caroline Mendes, Angela Ramos, Jéssica Andrade, Rodrigo Garcia, Rafael Peres, Ariane Turati, Lia Coelho, Ronaldo Mello, pela ajuda em experimentos e momentos de descontração.

Aos amigos do ICB, Sandra, Mit, Katherine e Daniel por passarem comigo pelos dilemas da pós-graduação e serem a companhia nas disciplinas, almoços no bandeirão e nas aventuras por São Paulo.

Aos integrantes da minha banca de qualificação, Fábio Bessa Lima, Maria Tereza Nunes e Fernanda Gaspar do Amaral, pelas importantes sugestões para o desenvolvimento e continuidade do meu trabalho.

Aos meus eternos amigos de Franca, Leo Barduco, Jorge, Gigio, Leo Barbosa, Richele, Gabriel, Laine, Kamila, Igor e Roberto. Não é sempre que podemos estar juntos, mas

quando nos encontramos é como se o tempo não tivesse passado e não houvesse distância nenhuma!

Ao secretário de pós-graduação José Maria pelo eficiente trabalho que desempenha.

"A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e
depois desinquieta. O que ela quer
da gente é coragem."

João Guimarães Rosa

RESUMO

PRÉVIDE, R. M. **Efeito da pinealectomia na expressão e atividade das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal, fígado e sóleo.** 2011. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A melatonina é uma indolamina produzida e secretada pela glândula pineal, sendo um sinalizador tanto circadiano como sazonal para o organismo. Suas funções também estão implicadas em regulações de diversos parâmetros como o metabolismo de carboidratos, homeostase mitocondrial, ciclo vigília-sono e processos antienvhecimento. O objetivo do presente estudo foi verificar em ratos Wistar o efeito da pinealectomia na expressão gênica e atividade das enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal, fígado e sóleo utilizando para este fim animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados repostos com melatonina. Os animais foram sacrificados 60 dias após a cirurgia em 4 pontos distribuídos igualmente ao longo do dia, sendo dois do fotoperíodo (ZT6 e ZT12) e dois do escotoperíodo (ZT18 e ZT24). A expressão gênica da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutases 1 e 2 foram avaliadas por PCR em tempo real e a atividade enzimática da glutathione peroxidase e da catalase por espectrofotometria. Foi detectada uma redução na expressão do RNA mensageiro da glutathione peroxidase no sóleo de animais pinealectomizados no ZT18 e uma atividade aumentada da mesma enzima no animal pinealectomizado no ZT6. No córtex pré-frontal foi detectado um aumento de atividade da glutathione peroxidase em animais pinealectomizados no ZT24. Conclui-se que a ausência de melatonina altera o padrão de expressão da glutathione peroxidase no sóleo e provoca um aumento na atividade da mesma enzima no córtex pré-frontal e no sóleo.

Palavras chave: Melatonina. Pinealectomia. Glutathione peroxidase. Catalase. PCR em tempo real.

ABSTRACT

PRÉVIDE, R.M. **Effect of pinealectomy on the expression and activity of antioxidant enzymes in the prefrontal cortex, liver and soleus.** 2011. 46 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Melatonin is an indolamine synthesized and secreted by the pineal gland during the night, being both a circadian and seasonal signal for the organism. Besides that, melatonin is also involved in the regulation of various parameters such as carbohydrate metabolism, mitochondrial homeostasis, sleep-wake cycle and antiaging processes. The purpose of this study was to investigate the effect of pinealectomy on gene expression and activity of antioxidant enzymes in the prefrontal cortex, liver and soleus muscle using for this purpose control, pinealectomized and melatonin-treated pinealectomized rats. The animals were sacrificed 60 days after surgery in four points evenly distributed throughout the day, two from the photoperiod (ZT6 and ZT12) and two from the dark period (ZT18 and ZT24). Glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase 1 and 2 gene expression was evaluated by qPCR and glutathione peroxidase and catalase enzyme activity was assessed by spectrophotometry. A reduction of glutathione peroxidase mRNA expression was found in the soleus muscle of pinealectomized animals at ZT18 and an increased activity of the same enzyme at ZT6 was observed in this group compared to control. The prefrontal cortex presented an increased activity of glutathione peroxidase in the pinealectomized animals at ZT24. We conclude that the absence of melatonin alters the expression pattern of glutathione peroxidase in the soleus muscle and causes an increase in the activity of the same enzyme in the prefrontal cortex and soleus.

Key words: Melatonin. Pinealectomy. Glutathione peroxidase. Catalase. qPCR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Melatonina	12
1.2 O metabolismo do animal pinealectomizado	14
1.3 Radicais livres e estresse oxidativo	15
1.4 Enzimas antioxidantes	16
<i>1.4.1 Superóxido Dismutase</i>	16
<i>1.4.2 Glutathione peroxidase</i>	16
<i>1.4.3 Catalase</i>	17
1.5 Enzimas antioxidantes e melatonina	17
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Pinealectomia	20
3.3 Reposição de melatonina	20
3.4 Coleta das Amostras	21
3.5 Extração de RNA e Tratamento com DNase	21
3.6 Obtenção de cDNA	22
3.7 Análise Quantitativa da Expressão Gênica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real	22
3.8 Clonagem e Obtenção dos Padrões	24
3.9 Atividade enzimática	26
<i>3.9.1 Atividade enzimática da glutathione peroxidase</i>	26
<i>3.9.2 Atividade da catalase</i>	27
3.10 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Córtex pré-frontal	28
4.2 Fígado	31
4.3 Sólido	34
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melatonina

O hormônio melatonina é secretado pela glândula pineal, possuindo tanto ritmicidade circadiana e sazonal de secreção, ambas mantidas sob o controle do oscilador circadiano localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. A melatonina, que é secretada durante a noite com duração inversa ao do fotoperíodo, participa na transmissão da mensagem circadiana e sazonal para o organismo (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003).

A melatonina é uma indolamina (Figura 1) e os grupos funcionais acetil e metoxi são decisivos para a especificidade de ligação a receptores e também para a característica anfifílica da molécula, a qual permite sua entrada em qualquer célula, compartimento ou fluido corpóreo (POEGGELER et al., 2002).

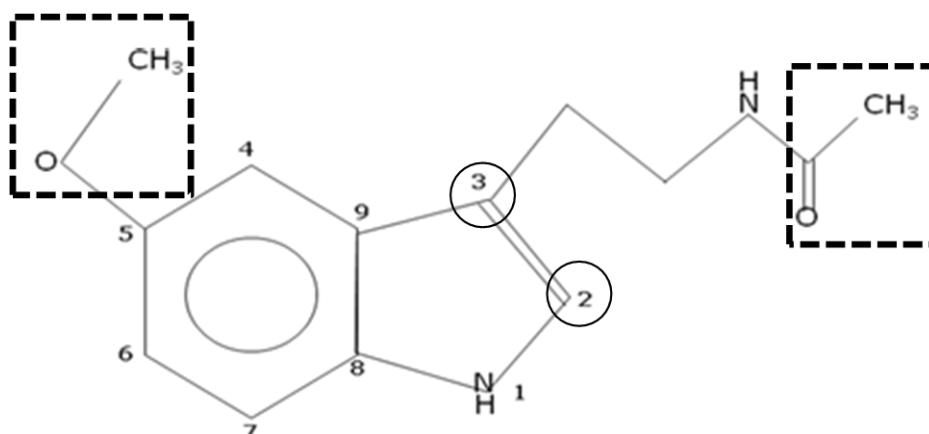


Figura 1. Estrutura química da melatonina. Os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico conferem a capacidade antioxidante da molécula e os grupos acetil e metoxi conferem a característica anfifílica à molécula

antioxidantes, ser reguladora de enzimas, de mecanismos de apoptose e da função mitocondrial (CIPOLLA-NETO e AFECHE, 2008).

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

A concentração plasmática no momento do pico noturno é, no rato, de aproximadamente 100 pg/mL ($0,43 \times 10^{-9}$ M) (VOLLRATH, 1981). No entanto, deve-se ter cuidado ao considerar esta como a única dose “fisiológica”, uma vez que em certos tecidos e compartimentos a melatonina pode ser encontrada em concentrações mais altas (até 100 a 1000 vezes maior), como no líquido, por exemplo (REITER e TAN, 2003).

Foram identificados receptores para melatonina de membrana plasmática tanto de alta afinidade, denominados MT_1 e MT_2 , quanto de baixa afinidade, denominado MT_3 . Existem também receptores nucleares, no caso RZR/ROR (CONWAY et al., 2000).

Os receptores de alta afinidade MT_1 e MT_2 pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G, ligando-se à proteína G_i e promovendo uma redução na produção do AMPc (MORGAN et al., 1994). O receptor MT_1 , além de ligar-se à G_i , tem afinidade pela proteína $G_{q/11}$ que lhe confere a característica de poder aumentar a produção de diacilglicerol e IP_3 , podendo resultar em maior concentração intracelular de cálcio e atividade da PKC (BARRETT et al., 1996). Por outro lado, está demonstrado em vários sistemas que a melatonina, mediada pelo receptor MT_1 , pode ativar correntes retificadoras de potássio, diminuindo a despolarização celular e resultando em uma redução do influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Os mecanismos mobilizados pela G_i quando o receptor MT_2 é ativado podem resultar em uma redução do GMPc, além de implicar na mobilização de dois mecanismos de transdução intracelular: um dependente do componente α (inibição da adenilato ciclase) e outro dependente do componente $\beta\gamma$, resultando na ativação da fosfolipase C (REPERT; WEAVER; GODSON, 1995).

Existem também sítios de produção de melatonina fora da pineal, como na retina, no trato gastrointestinal e leucócitos, onde ela tem ação autócrina e parácrina. Porém, em

mamíferos, esses sítios não contribuem em nada para a melatonina circulante (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006).

1.2 O metabolismo do animal pinealectomizado

Diversos são os trabalhos que demonstram existir alterações no metabolismo energético do animal pinealectomizado. No trabalho de Picinato et al. (2002), ilhotas pancreáticas foram extraídas tanto de animais intactos quanto de animais pinealectomizados. A pinealectomia induziu um aumento na secreção de insulina estimulada por glicose e na oxidação de glicose, além de alterações na amplitude rítmica e um avanço de fase para as curvas diárias das ilhotas incubadas com glicose 8,3 mM, condição semelhante a do animal alimentado e onde supostamente as células estão mais ativas.

Animais pinealectomizados submetidos ao teste de tolerância à glicose intravenosa tiveram resultados alterados principalmente no período da tarde com responsividade do transporte de glicose reduzida em 33% e o conteúdo de GLUT-4 reduzido em 40% no tecido adiposo peri-epididimal. Esses resultados demonstram que a pinealectomia é responsável tanto pelo comprometimento tanto da secreção de insulina como de sua ação (LIMA et al., 2008).

No trabalho de Borges-Silva, 2005 foi verificado que efeitos do exercício físico como aumento na lipólise basal e na estimulada por isoproterenol, aumento na incorporação de palmitato (esterificação), redução da incorporação de acetato (lipogênese) em lipídios e níveis de leptina circulante diminuídos não foram verificados em animais pinealectomizados. Os mesmos indivíduos pinealectomizados treinados apresentaram ainda uma redução na lipólise e um aumento na taxa de incorporação de acetato.

Animais pinealectomizados treinados apresentam uma redução na capacidade aeróbica e no conteúdo de glicogênio do fígado e do músculo, como também um aumento na atividade nas enzimas dos adipócitos envolvidas no metabolismo intermediário como a citrato sintase e lactato desidrogenase tanto no pinealectomizado sedentário quanto no treinado (BORGES-SILVA et al., 2007).

1.3 Radicais livres e estresse oxidativo

Na mitocôndria, o produto final da cadeia respiratória é água, gerada numa redução de quatro elétrons do oxigênio molecular (O_2) pelo complexo IV. Entretanto, essa conversão não é perfeita e pode vir a gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Dentre as espécies reativas mais comuns podemos citar o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (LEE et al., 2001; LENA Z, 2001). Por definição, os radicais livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo, fazendo essas espécies altamente reativas. Entre os radicais livres de O_2 , o radical $\cdot OH$ é considerado o mais potente oxidante em sistemas biológicos, com um período de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e portanto com uma reatividade muito alta (YU, 1994). A mitocôndria também é capaz de produzir óxido nítrico ($NO\cdot$) a partir da óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS) (GHAFOURIFAR e RICHTER, 1997; GIULIVI et al., 1998). Dependendo do meio em que se encontra a mitocôndria, $NO\cdot$ pode se tornar uma espécie reativa de nitrogênio, como o cátion nitrossomo (NO^+), ânion nitroxil (NO^-) ou peroxinitrito ($ONOO^-$) (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992).

Normalmente, os radicais livres ou são decompostos, ou seus produtos de peroxidação são neutralizados pelos antioxidantes naturalmente presentes no organismo (FRIDOVICH, 1995; GENOVA et al., 2003). Enquanto pequenas variações na concentração das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem ser importantes na sinalização celular (DRÖGE, 2002), uma síntese exagerada destas pode levar a danos a proteínas, lipídios e ao DNA (STADTMAN e LEVINE, 2000; RUBBO et al., 1994; LEDOUX et al., 1999). O estresse oxidativo surge de um aumento significativo na concentração das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, e/ou por uma diminuição dos mecanismos de detoxificação. Os danos causados a biomoléculas pelo aumento de ROS levam ao acúmulo de dano oxidativo em diversas regiões celulares, a desregulação de vias de sinalização e a condições patológicas. Muito do interesse em estresse oxidativo vem de patologias, como o dano causado por isquemia/reperfusão, aterosclerose, hipertensão, câncer, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (SCHRADER e FAHIMI, 2006).

1.4 Enzimas antioxidantes

1.4.1 Superóxido Dismutase

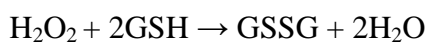
Superóxido dismutases são metaloenzimas amplamente distribuídas pelas células tanto de organismos eucariontes como procariontes. Elas constituem uma família de enzimas que catalizam a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio. A SOD1 ou CuZnSOD é a enzima encontrada no citoplasma celular, enquanto a SOD2 ou MnSOD é a enzima mitocondrial. A SOD3, ou ECSOD, é a forma caracterizada mais recentemente, sendo a superóxido dismutase encontrada no meio extracelular (JOHNSON e GIULIVI, 2005). Os genes responsáveis pela síntese das superóxido dismutases são encontrados em cromossomos diferentes, possuem diferentes regulações, e em relação a homologia dos aminoácidos, SOD1 e SOD3 possuem 40% de homologia enquanto a SOD2 não possui homologia com os outros dois membros da família (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A CuZnSOD é uma enzima resistente ao aquecimento, ao ataque por proteinases e à desnaturação por reagentes como o SDS e a uréia. Ela pode ser inibida por cianeto e pela incubação com dietilditiocarbamato (DDTC). Já o mesmo não ocorre com a MnSOD, que é mais propensa a desnaturação por calor e solventes orgânicos e não é inibida por cianeto (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As superóxido dismutases agem através de uma reação química de dois passos, onde no primeiro a forma oxidada da enzima se liga ao ânion superóxido, adquirindo um próton e liberando oxigênio molecular. Em seguida, a forma reduzida da enzima se liga a um segundo ânion superóxido e um próton liberando H_2O_2 e voltando assim a seu estado oxidado (JOHNSON e GIULIVI, 2005).

1.4.2 Glutathione peroxidase

Segundo Halliwell e Gutteridge, 2007, glutathione peroxidases são enzimas que removem H_2O_2 acoplado sua redução a água com a oxidação de glutathione reduzida (GSH) conforme a seguinte equação:



A glutathione oxidada (GSSG) é convertida novamente a glutathione reduzida pela enzima glutathione reductase, como mostra a equação:

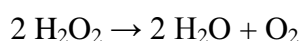


A glutatona é sintetizada no citoplasma de todas as células animais. A mitocôndria contém de 10 a 20% da glutatona reduzida (GSH) citoplasmática e mesmo assim precisa adquirir GSH através de transportadores localizados na sua membrana interna (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Existem várias isoformas da glutatona peroxidase, sendo a Gpx1 a forma citosólica, Gpx2 a forma gastrointestinal, Gpx3 a forma plasmática ou extracelular. As glutatonas peroxidases reduzem hidroperóxidos para os seus correspondentes alcoóis, utilizando glutatona (GSH) como cofator. A Gpx1, enzima analisada neste projeto, foi por mais de uma década considerada a única selenoproteína em mamíferos, mas muito pouco de seu controle transcricional é conhecido (STOYTCHEVA e BERRY, 2009).

1.4.3 Catalase

Nos peroxissomos também há o consumo de O₂. Porém, não existe produção de ATP nesse processo, sendo um processo onde a energia livre é liberada na forma de calor. Esse fato associado a processos metabólicos que contribuem para a formação de H₂O₂ nos peroxissomos, como a β oxidação dos ácidos graxos, as reações enzimáticas das flavinas oxidases tornam os peroxissomos outra organela produtora de ROS (SCHRADER e FAHIMI, 2006). Para manter o equilíbrio entre produção e degradação dessas espécies reativas, os peroxissomos possuem vários mecanismos de defesa antioxidante, sendo a catalase a enzima mais expressa e que é responsável pela degradação de H₂O₂ em água e oxigênio demonstrada na seguinte reação:



1.5 Enzimas antioxidantes e melatonina

Vários trabalhos indicam o efeito da melatonina na regulação de enzimas antioxidantes. Ozturk et al., 2000 encontraram atividade aumentada da SOD no fígado de ratos após a administração de melatonina na concentração de 10mg/kg por 7 dias e, em outro estudo, foi relatada atividade aumentada da SOD no rim, fígado e cérebro após uma injeção única de melatonina na concentração de 5mg/kg do animal (LIU e NG, 2000).

Albarrán et al., 2001 demonstraram que a atividade da SOD é diminuída no córtex, pulmão e fígado de pintos expostos a luz constante por um período de sete dias. Em outro experimento semelhante, foi observada atividade reduzida da glutatona peroxidase no córtex,

estriado, hipotálamo, hipocampo e cerebelo de pintos expostos a luz constante por 6 dias (PABLOS, 1997). Ambos os estudos correlacionam a atividade reduzida das enzimas antioxidantes aos níveis reduzidos de melatonina devido à exposição dos animais a luz constante.

Quando levamos em conta a expressão do RNAm das enzimas antioxidantes, também encontramos evidências do papel da melatonina. Antolin et al. 1996, detectaram através da técnica de Northern blot aumento do RNAm da CuZnSOD e da MnSOD na glândula harderiana de hamsters após injeção exógena de melatonina. O mesmo efeito foi verificado após tratamentos agudos e crônicos com melatonina na expressão da CuZnSOD, MnSOD e glutathione peroxidase no córtex de ratos (KOTLER et al., 1998).

Tendo em vista estes resultados, torna-se necessário verificar o efeito da retirada da glândula pineal e conseqüente ausência de melatonina circulante, na expressão gênica e atividade das enzimas antioxidantes em três tecidos responsivos à melatonina.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi esclarecer se ocorrem alterações na expressão do RNAm e na atividade das enzimas antioxidantes CuZnSOD, MnSOD, glutathione peroxidase e catalase no animal pinealectomizado e, caso ocorressem essas alterações, verificar se elas foram revertidas no animal pinealectomizado tratado com melatonina. Para esse fim, foram escolhidos três tecidos metabolicamente ativos e comumente utilizados em ensaios de enzimas antioxidantes, sendo eles, o córtex pré-frontal, o fígado e o músculo sóleo.

- Investigar e analisar em animais controles, em animais pinealectomizados e em animais pinealectomizados tratados com melatonina a expressão do RNAm das enzimas antioxidantes CuZnSOD, MnSOD, glutathione peroxidase e catalase em 4 pontos distribuídos igualmente ao longo do dia utilizando a técnica de qPCR;
- Verificar a atividade enzimática das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e catalase em animais controles, em animais pinealectomizados e em animais pinealectomizados tratados com melatonina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos, linhagem Wistar, com peso em torno de 200 g. Os animais foram divididos em grupo Controle, grupo Pinealectomizado e grupo Pinealectomizado tratado com melatonina. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), com comida e água à vontade, em ciclo 12 horas de claro por 12 horas de escuro.

3.2 Pinealectomia

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilasina na proporção de 5:3 ml, respectivamente, (solução final 0,15 ml / 100 g de peso do animal, intraperitoneal) e fixados em aparelho estereotáxico. O escalpo foi aberto sagitalmente e, após divulsionamento da musculatura e fâscias que cobrem o crânio na região da junção sutural lâmbda, foi feita uma abertura circular usando-se uma broca construída especialmente para esse propósito. A peça óssea é então retirada expondo-se a confluência venosa posterior. Com uma pinça cirúrgica, a glândula pineal, localizada imediatamente abaixo da superfície é retirada. Após breve hemostasia, o retalho ósseo é recolocado e o escalpo suturado.

3.3 Reposição de melatonina

A reposição de melatonina foi feita na água dos animais, onde a água normal era trocada pela água contendo melatonina na quantidade de 1 mg/kg do animal meia hora antes do início do período de escuro do biotério (escotoperíodo). No momento em que se iniciava o período de claro (fotoperíodo), as garrafas contendo melatonina eram retiradas e substituídas por outras garrafas contendo apenas água. Foi realizado o controle diário do consumo da solução contendo melatonina para que o ajuste diário da dose em função do peso e consumo fosse calculado.

3.4 Coleta das Amostras

Após dois meses de pinealectomia, os animais foram sacrificados por decapitação. Os sacrifícios foram realizados em 4 pontos igualmente distribuídos ao longo do dia (ZT6, ZT12, ZT18, ZT24).

ZT é uma nomenclatura utilizada para uniformizar os horários do ciclo circadiano sincronizado pelo claro-escuro ambiental, sendo que em ciclos 12 h/12 h claro/escuro convencionou-se que o ZT0 representa a transição do escuro para o claro (o início do claro) e que o ZT12, a transição do claro para o escuro (o início do escuro), independentemente do horário em que o biotério apaga ou acende suas luzes, como pode ser visto no esquema abaixo.



3.5 Extração de RNA e Tratamento com DNase

Para a extração do RNA total dos tecidos, foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o tecido foi inicialmente homogeneizado com o reagente Trizol até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, acrescida de 0,2 ml de clorofórmio por ml de Trizol para desproteínização. O sobrenadante foi então separado por centrifugação (12.000 g, 15 min, 4 °C), e o RNA contido na fase aquosa foi separado em um novo tubo, onde foi precipitado com isopropanol, em seguida lavado com etanol 75% e dissolvido com H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

Antes de sua utilização, uma amostra de cada extração foi quantificada e analisada, quanto à pureza e integridade, por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) que analisa 2 µL da amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e determina a sua concentração em ng/µL, além da razão 260/280 que é um indicativo da qualidade do RNA extraído. Amostras com razão 260/280 acima de 1,80 foram utilizadas nos procedimentos subsequentes. As amostras de RNA também foram aplicadas em gel de agarose para verificação de integridade.

Para eliminar uma eventual contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA total foram tratadas com Turbo DNA-*free*TM (Ambion, Austin, TX, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, 1 µL da enzima Turbo DNase e 1,1 µL do tampão de reação foram adicionados a 10 µL do RNA total e as reações foram incubadas à 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2 µL de tampão de inativação e posterior incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, seguida de centrifugação (10.000 g, 1,5 minutos, 4 °C) para separação do sobrenadante. Este continha o RNA total tratado, que foi transferido para novo tubo e quantificado utilizando o aparelho NanoDropTM 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), conforme descrito anteriormente. As amostras foram mantidas à -80 °C para posterior síntese de cDNA.

3.6 Obtenção de cDNA

Amostras de 5 µg de RNA total tratado com DNase foram submetidas à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto foi adicionado a 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 (10 mM cada), primers randômicos (150 ng) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em volume final de 20 µL. As reações foram incubadas no termociclador MyGeneTM Series Gradient (LongGene®, China) por 5 minutos à 65 °C, seguida de 10 minutos à 25 °C, com aquecimento para 42 °C por 75 minutos e 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas à -20 °C.

3.7 Análise Quantitativa da Expressão Gênica por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 2 µL de cDNA (10 ng/µL) previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 12,5 µL de POWER SYBR Green mix (Applied Biosystems), 8,5 µL de água MilliQ e 400 nM dos primers específicos para cada gene.

Os primers usados foram desenhados de modo que sua localização lhes desse a característica de flanquearem um íntron (*intron-spanning*), o que impossibilita a amplificação de DNA genômico que eventualmente não tenha sido degradado pelo tratamento com DNase. A eficiência dos pares de primers foi testada e determinada por reação de PCR em tempo real utilizando diluições (10^7 a 10^2 cópias) dos respectivos fragmentos clonados, nas mesmas condições e com o mesmo aparelho usado para todas as reações subseqüentes.

Os primers, número de acesso no GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), seqüências do sense e do antisense, tamanho dos fragmentos amplificados e a localização estão listados no Quadro 1.

Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 95 °C por 10 minutos, 2) 40 ciclos que incluíram a desnaturação a 95 °C por 15 segundos; o anelamento dos primers a 60 °C (temperatura ótima para todos os pares de primers usados) por 30 segundos e a extensão a 60 °C por 30 segundos, e 3) 1 ciclo para análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 30 segundos; 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de *melting*.

Quadro 1. Seqüência dos primers utilizados.

Primer	Número de acesso	Seqüência	Localização	Fragmento
CuZnSOD (SOD1)	NM_017050.1	5' –CCGGTGCAGGGCGTC–3'	40-54	74bp
		5' –TCCTGTAATCTGTCCTGACACCA–3'	114-92	
MnSOD (SOD2)	NM_017051.2	5' –TCACAGCAATTTCTGGACAAACC–3'	291-313	82bp
		5' –AGTCACGCTTGATAGCCTCCA–3'	373-353	
Glutathione peroxidase (GPx)	NM_030826.3	5' – CCTGGTGGTCTCGGTTT–3'	204-221	90bp
		5' – TCGGACATACTTGAGGGAATTCA–3'	294-272	
Catalase	NM_012520.1	5' –CATTGAGCCCA GCCCG–3'	1026-1041	64bp
		5' –GGCGGTGAGTGTCTGGTAA–3'	1090-1071	
Proteína ribossomal L37a (Rpl37a)	NM_001108801	5' –CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG–3'	161-254	93bp
		5' –GCCACTGTTTTATGCAGGAAC–3'		
Beta actina (Actb)	NM_031144	5' –CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT–3'	117-214	97bp
		5' –AAGACCTCTATGCCAACACAGTG–3'		

O método de qPCR utilizando uma curva padrão consiste em determinar o número de cópias de cada gene pela comparação entre o valor de amplificação (*crossing point* e curva de amplificação) de cada amostra, com a curva de padrões composta de diluições de plasmídeos recombinantes que contêm cópias clonadas dos genes de interesse e constitutivos (10^7 a 10^3 cópias). Os procedimentos de clonagem e obtenção dos padrões estão descritos no próximo item.

Após a determinação do número de cópias de cada gene, o valor obtido para os genes de interesse foi normalizado pelo gene constitutivo Rpl37a no sóleo e pelo Rpl37a e beta actina no córtex e fígado.

3.8 Clonagem e Obtenção dos Padrões

A obtenção dos fragmentos amplificados para cada gene de interesse e para os constitutivos foi feita utilizando os pares de primers citados acima, nas mesmas condições de ciclagem e com o mesmo aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Como descrito no item anterior, os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 2 μL de cDNA (10ng/ μL) de pineal previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 12,5 μL de POWER SYBR Green mix (Applied Biosystems), 8,5 μL de água MilliQ e 400 nM dos primers específicos para cada gene.

Após a amplificação, procedeu-se a eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Biochemical CO, St. Louis, EUA) e os pares de primers que apresentaram somente um fragmento amplificado no tamanho esperado foram escolhidos para serem usados nas reações subseqüentes. Os procedimentos de clonagem foram feitos individualmente para cada fragmento.

O passo seguinte foi o da ligação do fragmento amplificado ao vetor pGEM-T easy (Figura 2, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) que foi feita adicionando 3 μL da reação de PCR que mostrou somente um fragmento amplificado à 5 μL do tampão de ligação, 0,5 μL do vetor pGEM-T easy e 1 μL da enzima T4 DNA ligase. A reação foi gentilmente misturada e incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

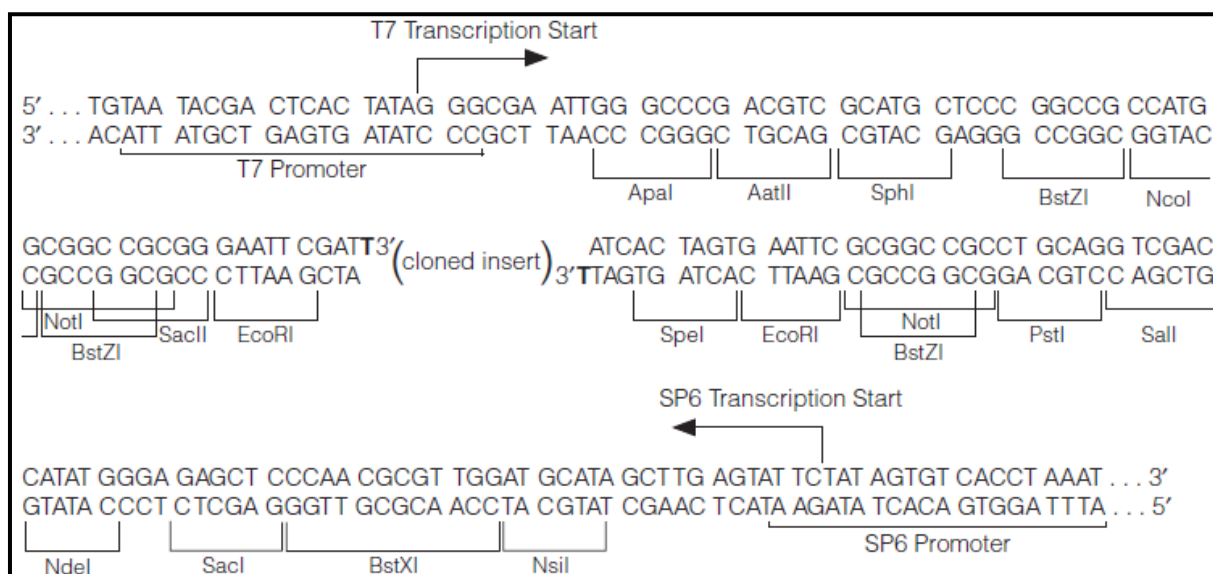


Figura 2. Mapa do vetor pGEM-T easy mostrando o sítio de inserção do fragmento, com os diversos posicionamentos dos sítios de restrição para várias enzimas e a localização dos dois promotores para início da transcrição.

Com o fragmento inserido no vetor, a transformação de bactérias *E. coli* competentes foi feita adicionando 2 μL da ligação à 25 μL de bactérias One Shot[®] Mach1[™]-T1^R (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi incubada em gelo por 20 minutos, seguidos de 50 segundos a 42 °C e de 2 minutos novamente no gelo. Esse procedimento de transformação é conhecido como *heat-shock*. As bactérias transformadas foram adicionadas a 200 μL de meio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas a 37 °C por 1 hora, com agitação plana de 225 rpm.

As bactérias foram então semeadas em placas de cultura com meio LB (Luria Bertani) Agar adicionado de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina (KD Medical, Inc., Columbia, MD, EUA), 100 μL de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactosídeo) e 20 μL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo), ambos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 12 horas.

Devido à aplicação de IPTG e X-gal, pôde-se realizar a seleção das colônias bacterianas que possuíam o inserto de interesse. Colônias azuis não continham inserto, possuindo vetores intactos que puderam expressar β -galactosidase ativa capaz de reagir com X-gal e resultar na coloração azul. Colônias brancas por sua vez apresentavam o inserto que interrompeu a seqüência codificadora da β -galactosidase (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

Após incubação, 2 colônias brancas de cada fragmento foram adicionadas individualmente a tubos contendo 2 mL de meio LB (Luria Bertani, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) acrescidos de 2 μL de ampicilina (1 mg/mL, Sigma Biochemical CO, St. Louis,

MO, EUA). As culturas líquidas foram incubadas a 37 °C por 12 horas, com agitação plana de 225 rpm.

As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos para formação do precipitado de bactérias, o sobrenadante foi descartado e a obtenção de *mini-prep* foi feita utilizando o kit QIAprep® Miniprep (Qiagen, Germantown, MD, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As preparações tiveram suas concentrações aferidas pelo aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O material genético das bactérias recombinantes obtido pela preparação de *mini-prep* foi submetido à análise de restrição com a enzima EcoRI (Fermentas Life Sciences, Burlington, Oregon, Canadá) e posterior eletroforese em gel de agarose 2,0% (Sigma Biochemical CO, St. Louis, EUA) para confirmação da presença do fragmento de interesse.

A obtenção de 10^7 cópias dos fragmentos clonados foi feita através de cálculos matemáticos utilizando a concentração e tamanho dos plasmídeos, o tamanho dos fragmentos clonados e o número de Avogrado. Diluições seriadas (10^7 a 10^3 cópias) foram feitas em água MilliQ imediatamente antes de cada reação de PCR em tempo real. Cada diluição foi pipetada em duplicata e passou pelos mesmos procedimentos descritos para as amostras. Tanto amostras quanto diluições para curva padrão foram sempre amplificadas no mesmo bloco de reações.

3.9 Atividade enzimática

Todas as amostras utilizadas para atividade enzimática foram rapidamente coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Para sua utilização nos ensaios de atividade enzimática, as mesmas foram homogeneizadas em tampão fosfato 10mM, pH 7,0. Os valores obtidos para atividade enzimática foram normalizados pela quantidade de proteína de cada amostra, obtida pelo método do Bradford.

3.9.1 Atividade enzimática da glutathiona peroxidase

O método parte do princípio de que a glutathiona oxidada (GSSG) é instantaneamente e continuamente reduzida por um excesso de atividade da glutathiona redutase promovendo assim um nível constante de glutathiona reduzida (GSH). A concomitante oxidação do NADPH é monitorada por espectrofotômetro.

As seguintes soluções foram pipetadas numa placa de 96 poços para espectrofotômetro: 100 µl de tampão fosfato 0.1 M, 10 µl de amostra, 20 µl de glutathione redutase e 20 µl de GSH 10 mM. A mistura então foi incubada por 1 min a 37 °C. Após a incubação, adicionou-se 20 µl de solução de NADPH 1.5 mM e a placa foi imediatamente colocada no espectrofotômetro após a adição de 20 µl de t-butil 12 mM e o decréscimo da absorbância a 365 nm foi monitorado durante 360 segundos. A redução do NADPH é calculada através do declive linear obtido durante a redução de absorbância e através do coeficiente de extinção do NADPH.

3.9.2 Atividade da catalase

O ensaio de atividade da catalase segue o método proposto por Aebi, H., 1984. Primeiramente, o espectrofotômetro é mantido a 30°C, temperatura onde se observa atividade máxima da catalase. Em cada cubeta adiciona-se 650 µl de tampão fosfato 50 mM, 10 µl de amostra e 340 µl de H₂O₂, sendo importante seguir essa ordem, pois a reação se inicia assim que o peróxido de hidrogênio é adicionado. A leitura ocorreu logo em seguida durante 300 segundos, a 240 nm e 30 °C. Após a leitura, foi analisado o decréscimo da absorbância do peróxido de hidrogênio em um intervalo de decréscimo linear de 180 segundos.

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas, escolhidas de acordo com o desenho experimental, foram realizadas utilizando-se o programa computacional Prism v 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os testes usados para cada grupo de dados e as respectivas significâncias estatísticas estão descritos na legenda de cada gráfico. Foram considerados com diferença significativa aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Córtex pré-frontal

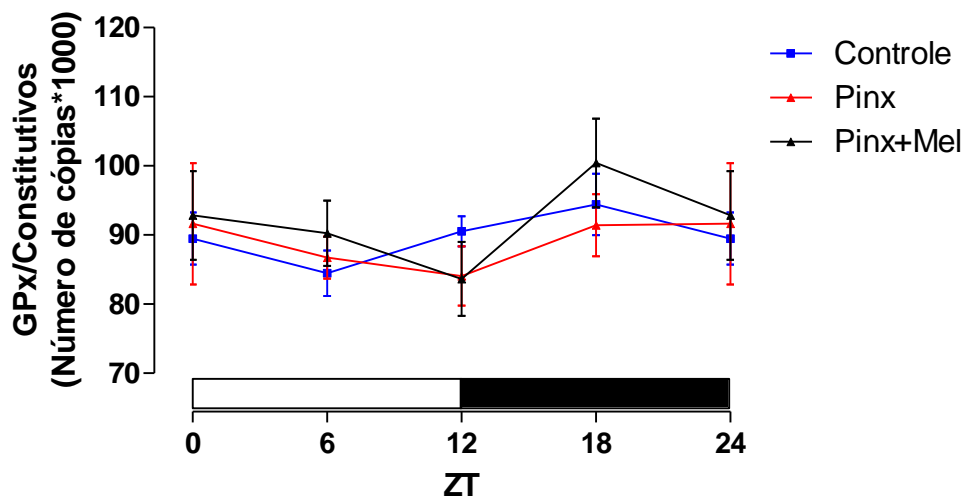


Figura 3. Perfis diários da expressão do RNAm da glutathione peroxidase no córtex pré frontal dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,6817$ para o fator tratamento; $p = 0,2385$ para o fator ZT e $p = 0,9597$ para a interação tratamento x ZT

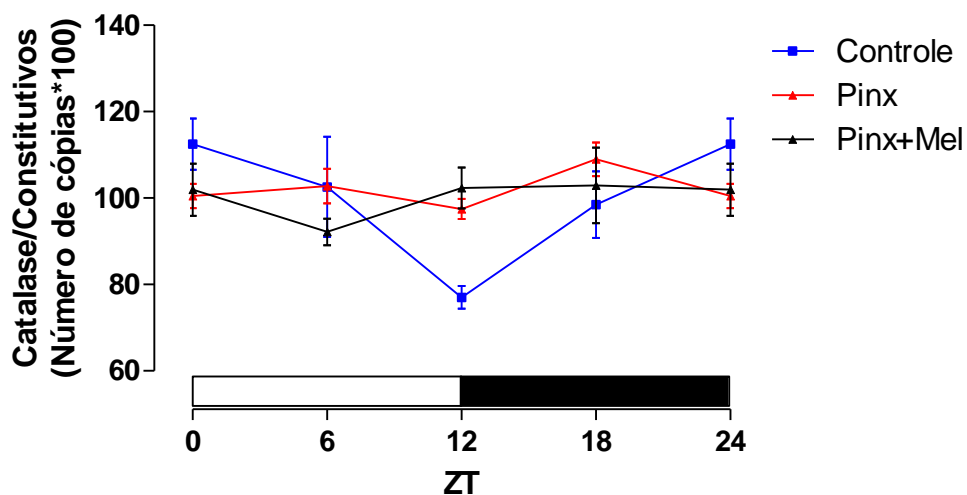


Figura 4. Perfis diários da expressão do RNAm da catalase no córtex pré frontal dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,8785$ para o fator tratamento; $p = 0,0543$ para o fator ZT e $p = 0,0305$ para a interação tratamento x ZT

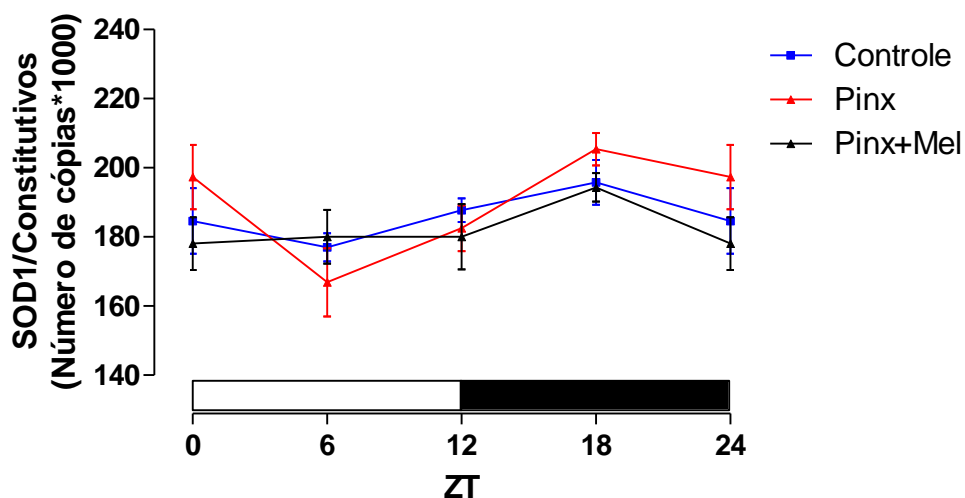


Figura 5. Perfis diários da expressão do RNAm da SOD1 no córtex pré frontal dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,2906$ para o fator tratamento; $p = 0,0082$ para o fator ZT e $p = 0,5054$ para a interação tratamento x ZT

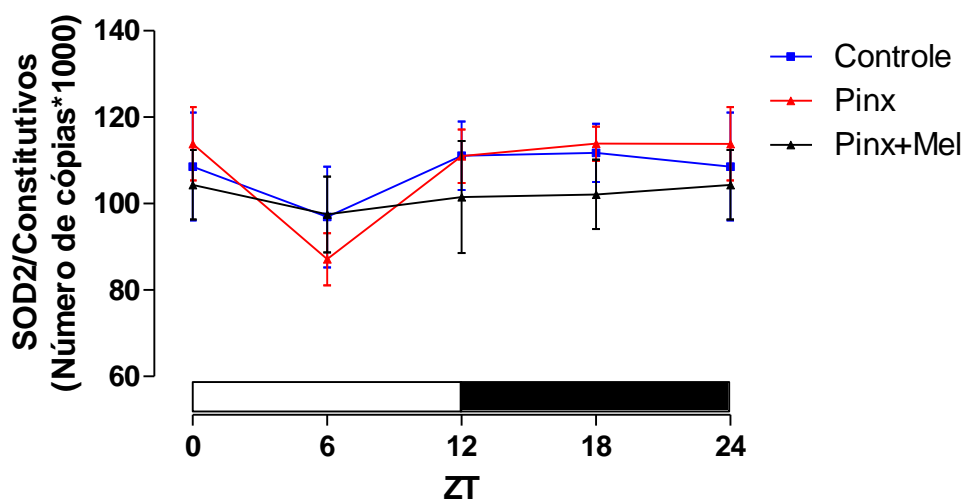


Figura 6. Perfis diários da expressão do RNAm da SOD2 no córtex pré frontal dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,5508$ para o fator tratamento; $p = 0,1756$ para o fator ZT e $p = 0,9672$ para a interação tratamento x ZT

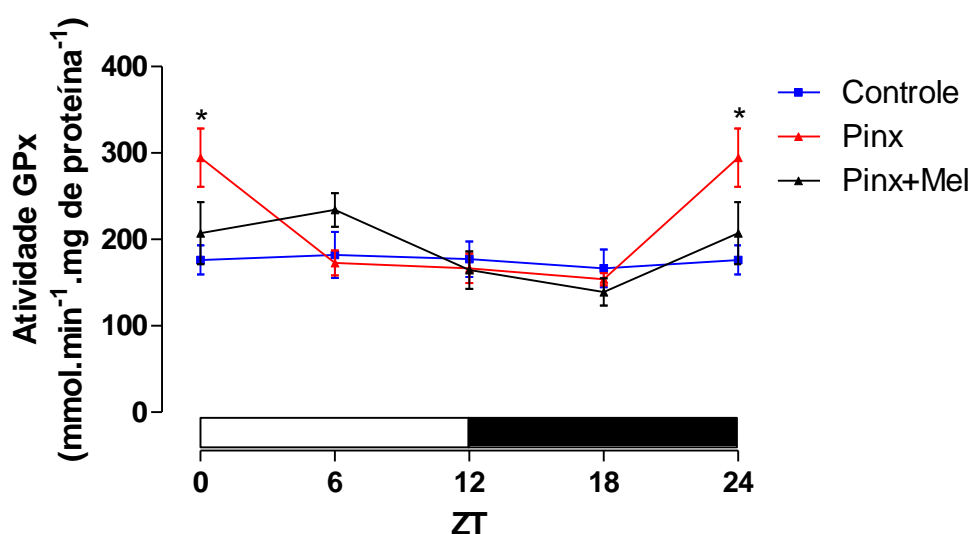


Figura 7. Perfis diários da atividade da GPx no córtex pré frontal dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 6 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,0212$ para o fator tratamento; $p = 0,0002$ para o fator ZT e $p = 0,0048$ para a interação tratamento x ZT

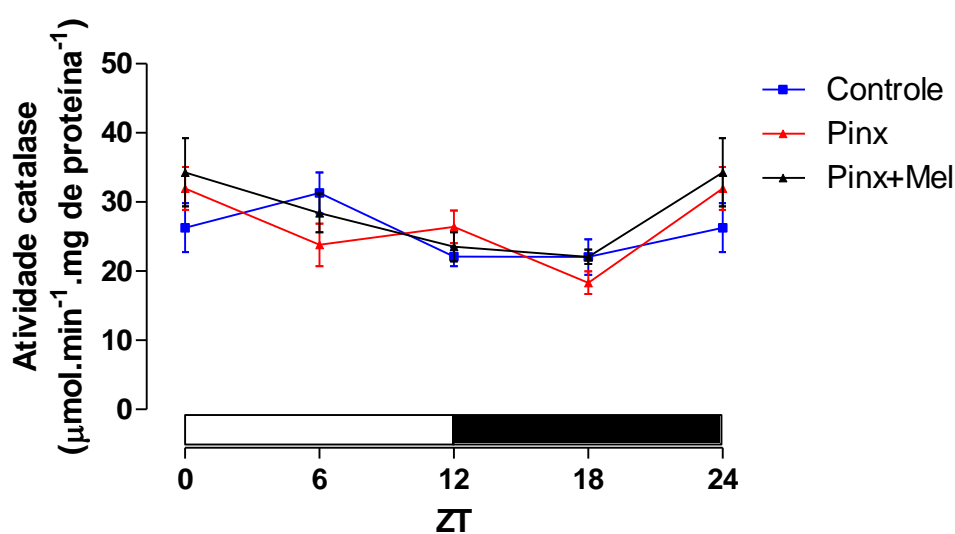


Figura 8. Perfis diários da atividade da catalase no córtex pré frontal dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 6 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,3162$ para o fator tratamento; $p = 0,0002$ para o fator ZT e $p = 0,2889$ para a interação tratamento x ZT

No córtex pré-frontal não encontramos nenhuma alteração significativa na expressão do RNAm das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), catalase e superóxido dismutases. Existe uma variação entre os ZTs para a enzima SOD1. É interessante notar que, aparentemente, apesar da não significância estatística, há uma nítida mudança do padrão de expressão da catalase nos animais pinealectomizados, independentemente de serem tratados ou não com melatonina.

Em relação à atividade enzimática, há um aumento significativo no ZT24 na atividade da glutatona peroxidase do grupo pinealectomizado quando comparado ao grupo controle e o pinealectomizado tratado com melatonina. A catalase não teve a sua atividade alterada em consequência da pinealectomia.

4.2 Fígado

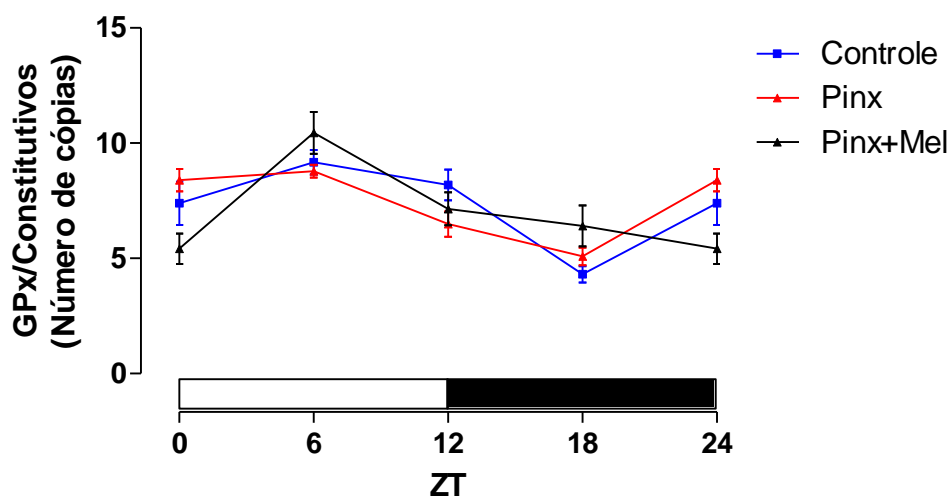


Figura 9. Perfis diários da expressão do RNAm da glutatona peroxidase no fígado dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,5477$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,0012$ para a interação tratamento x ZT.

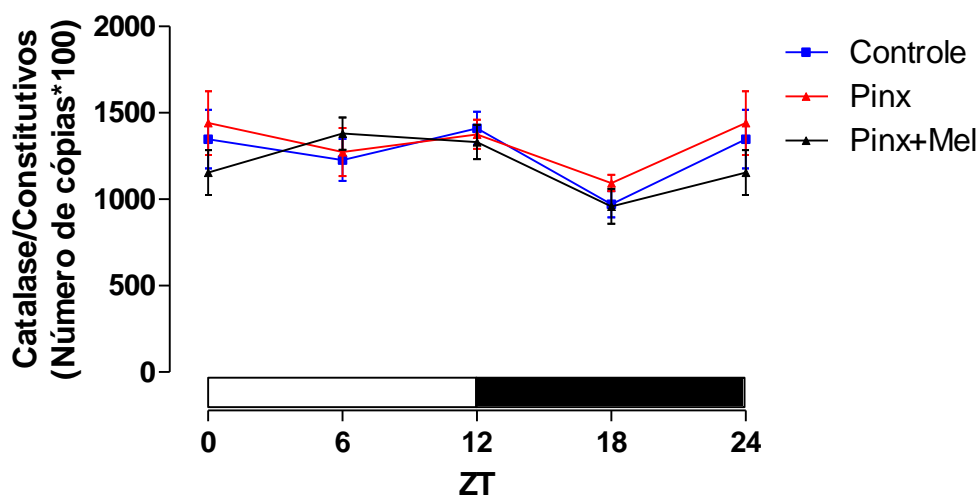


Figura 10. Perfis diários da expressão do RNAm da catalase no fígado dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,2996$ para o fator tratamento; $p = 0,0077$ para o fator ZT e $p = 0,8561$ para a interação tratamento x ZT.

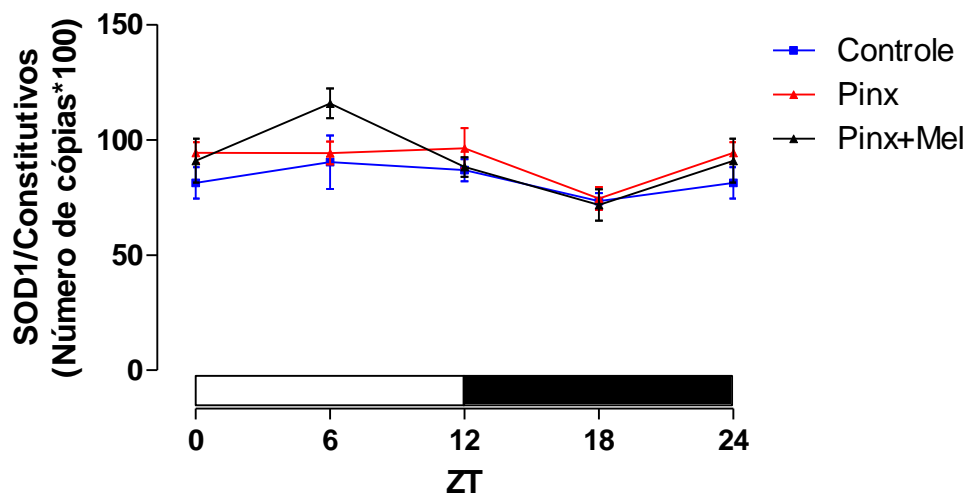


Figura 11. Perfis diários da expressão do RNAm da SOD1 no fígado dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,0866$ para o fator tratamento; $p = 0,0006$ para o fator ZT e $p = 0,4947$ para a interação tratamento x ZT

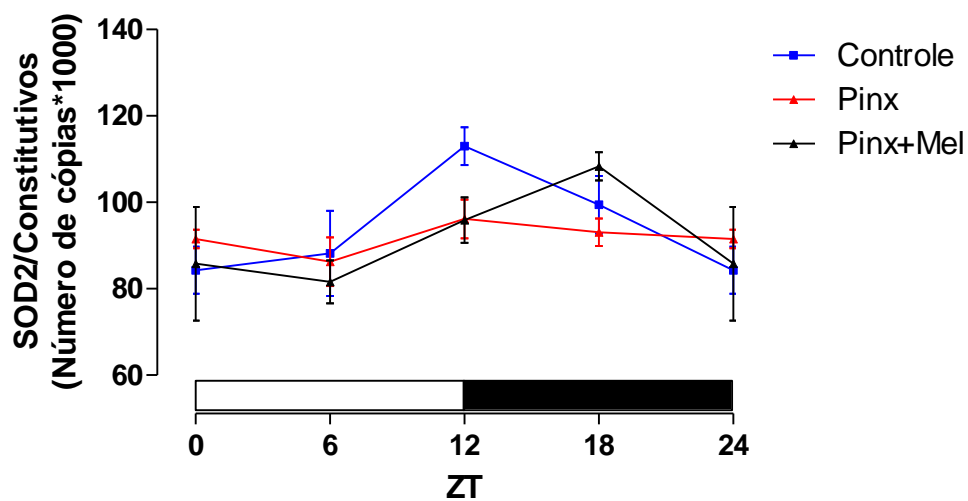


Figura 12. Perfis diários da expressão do RNAm da SOD2 no fígado dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,8696$ para o fator tratamento; $p = 0,0218$ para o fator ZT e $p = 0,6614$ para a interação tratamento x ZT

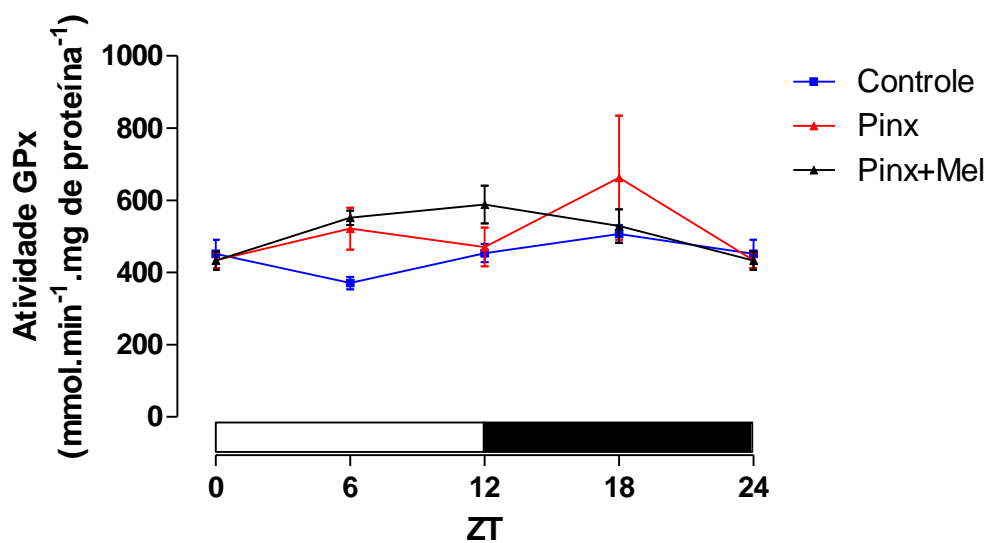


Figura 13. Perfis diários da atividade da GPx no fígado dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 6 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,1683$ para o fator tratamento; $p = 0,0369$ para o fator ZT e $p = 0,1933$ para a interação tratamento x ZT

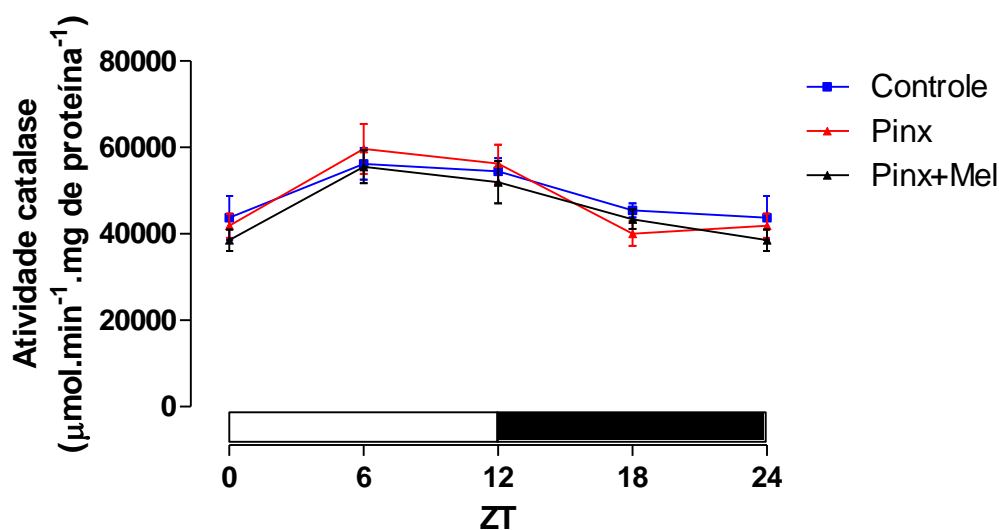


Figura 14. Perfis diários da atividade da catalase no fígado dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 6 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,3640$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,9584$ para a interação tratamento x ZT

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão do RNAm e na atividade das enzimas antioxidantes no fígado quando comparamos os grupos estudados. Porém encontramos variações significativas na expressão das enzimas GPx, catalase, SOD1 e SOD2 ao longo do dia. A mesma variação ao longo dos ZTs também ocorre com a atividade da glutathiona peroxidase e da catalase.

4.3 Sóleo

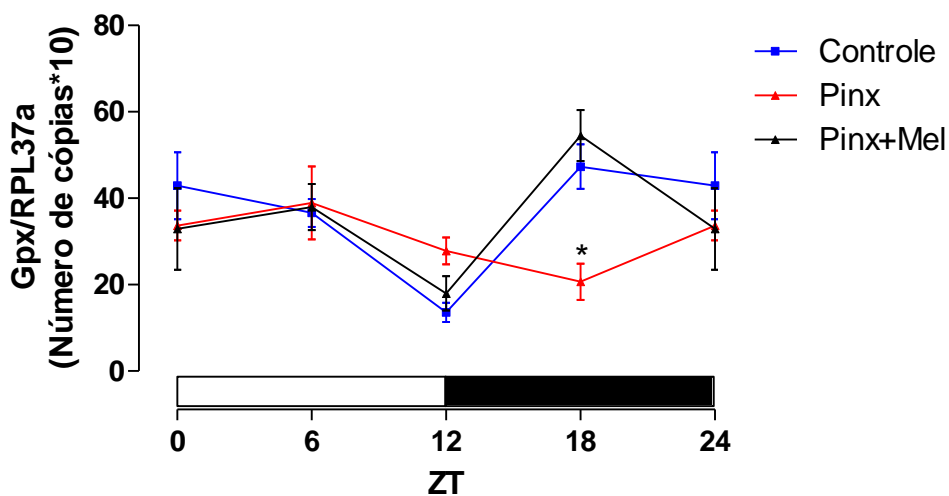


Figura 15. Perfis diários da expressão do RNAm da glutatona peroxidase no sóleo dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,2357$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0.0057$ para a interação tratamento x ZT.

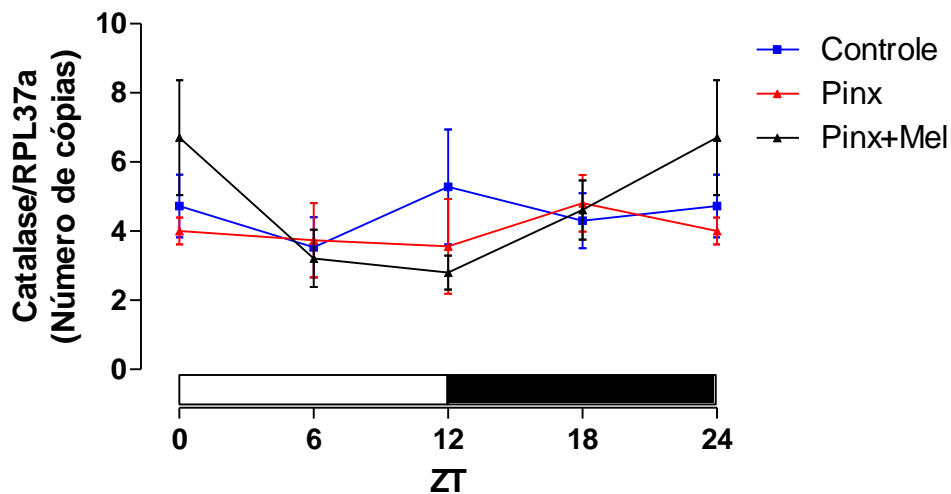


Figura 16. Perfis diários da expressão do RNAm da catalase no sóleo dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,5248$ para o fator tratamento; $p = 0,2288$ para o fator ZT e $p = 0,4532$ para a interação tratamento x ZT.

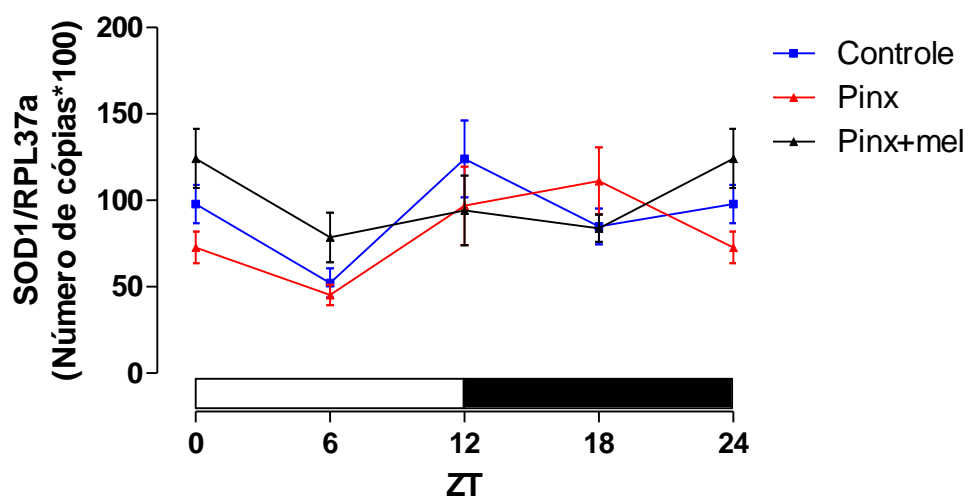


Figura 17. Perfis diários da expressão do RNAm da SOD1 no sóleo dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,0662$ para o fator tratamento; $p = 0,0011$ para o fator ZT e $p = 0,0606$ para a interação tratamento x ZT

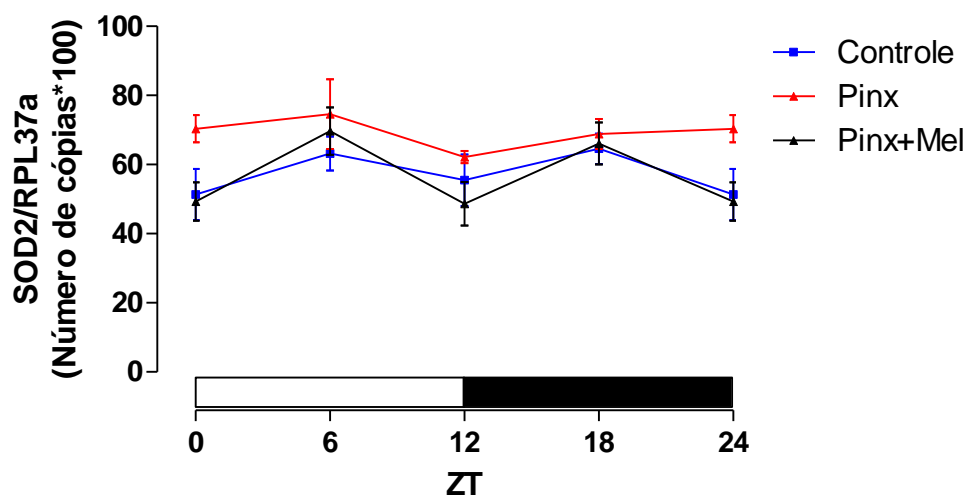


Figura 18. Perfis diários da expressão do RNAm da SOD2 no sóleo dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 5 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,0018$ para o fator tratamento; $p = 0,0187$ para o fator ZT e $p = 0,7248$ para a interação tratamento x ZT

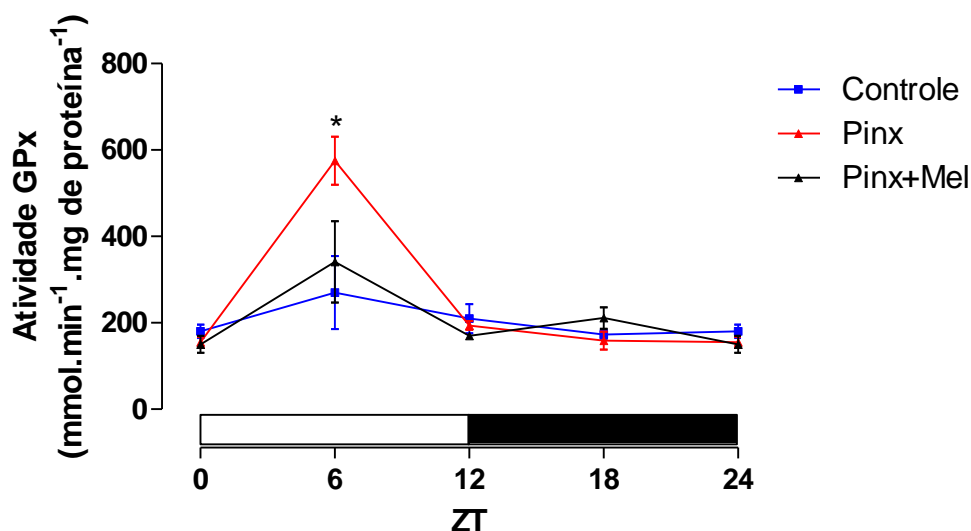


Figura 19. Perfis diários da atividade da GPx no sóleo dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 6 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,1244$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,0020$ para a interação tratamento x ZT

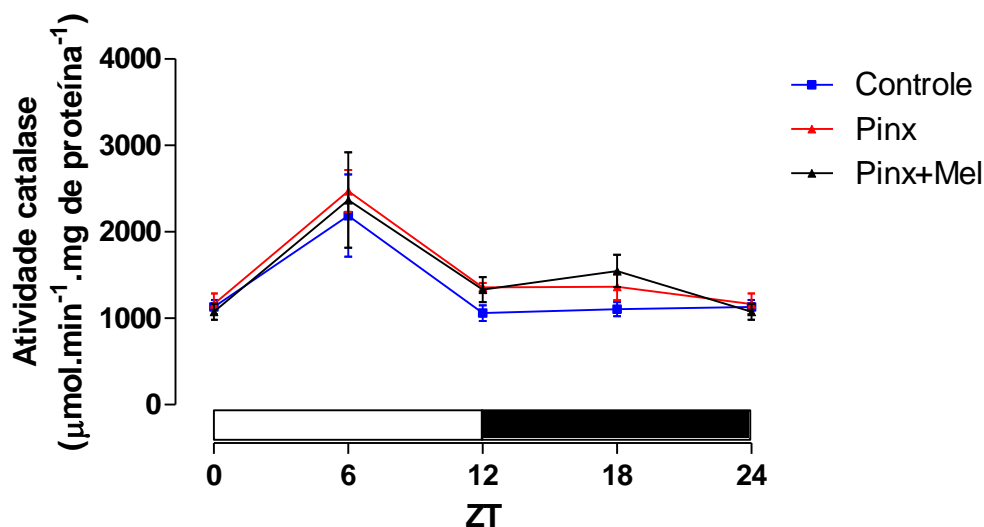


Figura 20. Perfis diários da atividade da catalase no sóleo dos animais controles, pinealectomizados e pinealectomizados tratados com melatonina 60 dias após a cirurgia (n = 6 por grupo, em cada ZT). ANOVA bifatorial seguida de Bonferroni com $p = 0,3150$ para o fator tratamento; $p < 0,0001$ para o fator ZT e $p = 0,9481$ para a interação tratamento x ZT

Encontramos no sóleo uma redução significativa no RNAm da glutathiona peroxidase do grupo pinealectomizado em relação ao grupo controle e ao grupo pinealectomizado tratado com melatonina no ZT18. Levando em consideração as horas do dia, existe uma variação ao longo dos quatro pontos na expressão das enzimas GPx, SOD1 e SOD2. Aparentemente,

existe um ritmo de 12 horas na expressão da SOD2 que foi mascarado no animal pinealectomizado.

Quanto à atividade enzimática, existe uma variação temporal nos valores de atividade encontrados para a glutathione peroxidase e para a catalase e a atividade da glutathione peroxidase encontrasse aumentada no ZT6 no grupo pinealectomizado quando comparada aos grupos controle e pinealectomizado repostado com melatonina.

5 DISCUSSÃO

Vários são os trabalhos que demonstram a influência da melatonina na regulação das enzimas antioxidantes, porém estes usam como modelo experimental a suplementação de melatonina em doses farmacológicas, demonstrando aumento na atividade das enzimas antioxidantes (LIU e NG, 2000; OZTURK et al., 2000) e de seus respectivos RNAm (ANTOLIN et al., 1996; KOTLER et al. 1998). Existem também relatos de diminuição da atividade das enzimas antioxidantes após exposição de animais a situações de claro constante (ALBARRÁN et al., 2001; PABLOS, 1997), situação onde é sabido que a síntese e secreção de melatonina estão diminuídas.

Tendo em vista estes resultados, nosso trabalho tem como objetivo estudar o efeito da pinealectomia, modelo experimental onde a melatonina circulante é abolida no organismo, na expressão do RNAm e na atividade de quatro enzimas antioxidantes, glutathiona peroxidase, catalase, MnSOD e CuZnSOD.

As enzimas antioxidantes possuem sequências regulatórias em seus promotores e/ou íntrons que são redox-sensíveis e que podem interagir com fatores de transcrição para aumentar a expressão do respectivo gene (ALLEN e TRESINI, 2000). Segundo Ji, 2007 as espécies reativas de oxigênio, principalmente o H_2O_2 , podem estimular a expressão gênica das enzimas antioxidantes, proteínas imunorreativas e fatores de transcrição, sendo que as principais vias ativadas são $NF\kappa\beta$, MAPK, PI_3K/Akt e ativação da p53.

O promotor da MnSOD contém sítios de ligação para $NF\kappa\beta$ e AP-1, os quais são sensíveis a estimulação por espécies reativas de oxigênio, TNF- α e IL-1 (HO; HOWARD; CRAPO, 1991). Além disso, Jones et al. (1997) identificaram uma região de 238 pares de base do íntron 2 responsiva a TNF e IL-1. Este elemento responsivo ao TNF α possui motifs tanto para $NF\kappa\beta$ como para C/EBP, que são ambos necessários e responsáveis pela responsividade ao TNF.

Em relação à ativação do gene da CuZnSOD, Yoo et al. (1999), verificou que a mesma possui um elemento responsivo ao peróxido no promotor que é responsável pela ativação da sua expressão por H_2O_2 , paraquat e choque térmico em células Hep2. Já o promotor da glutathiona peroxidase contém dois elementos responsivos ao oxigênio localizados na região 5' flanqueadora do gene da GPx humana (COWAN et al., 1993).

Ao analisarmos os dados obtidos para córtex pré-frontal, não encontramos diferenças significativas na expressão de RNAm entre os tratamentos. Esses dados diferem dos obtidos por Kotler et al. (1998), que observaram o RNAm aumentado em animais nos quais a

melatonina foi suplementada. Em seu trabalho, Kotler et al. 1998 utilizaram a concentração de 500 µg/kg de melatonina injetada intraperitonealmente e observaram aumento do RNAm das enzimas antioxidantes GPx, CuZnSOD e MnSOD no córtex cerebral ao longo do tempo após a injeção. Os mesmos autores verificaram também que a suplementação crônica de melatonina pela via subcutânea causou aumento maior na expressão das enzimas na concentração de 50 µg/kg do que na concentração de 500 µg/kg.

Uma das principais características do hormônio melatonina é a sua atividade antioxidante, graças aos carbonos 2 e 3 de seu anel pirrólico que possuem uma alta capacidade de doar elétrons e assim conseguem quelar principalmente radicais hidroxila e superóxido (ALLEGRA et al., 2003; CIPOLLA-NETO e AFECHE, 2008). Tendo em vista esta constatação, soma-se o fato de que Butte e Pappas, 2007 verificaram que a pinealectomia provoca estresse oxidativo, nos permitindo dizer que as espécies reativas estariam aumentadas no animal pinealectomizado. Já que os radicais livres acionam vias que agem na regulação das enzimas antioxidantes (JI, 2007), poderíamos assim explicar a não alteração na expressão das mesmas em praticamente todos os tecidos estudados, com exceção da glutathione peroxidase no músculo.

Ainda no córtex, nota-se que o perfil diário da catalase no animal controle apresenta uma queda na imediata transição do claro para o escuro que, apesar de estatisticamente não significante, desaparece nos animais pinealectomizados, independentemente de serem tratados ou não. Essa alteração no perfil pode ser devida a outro produto de origem pineal que não a melatonina, podendo este papel ser dado a serotonina, o principal produto da glândula pineal no horário em questão. Podemos atribuir esta alteração também a uma eventual perda de ritmo diário devida à pinealectomia, situação onde não ocorre a sincronização dos clock genes pela melatonina.

Baydas et al. (2002), demonstraram que no animal pinealectomizado existe uma redução de atividade da glutathione peroxidase. No entanto, contrastando com os resultados obtidos por Baydas et al. (2002), encontramos um aumento na atividade da glutathione peroxidase no córtex pré-frontal de animais pinealectomizado no ZT24 e no sóleo de animais pinealectomizados no ZT6. Além disso, encontramos RNAm diminuído da GPx no sóleo de animais pinealectomizados no ZT18. Sendo a melatonina um poderoso antioxidante (ALLEGRA et al., 2003), uma atividade aumentada poderia explicar um mecanismo de defesa possivelmente ativado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio nos tecidos em questão devido à ausência da melatonina.

É interessante notar que no fígado não encontramos diferenças significativas entre os tratamentos, nem diferenças similares às encontradas no córtex pré-frontal e no sóleo. O fígado foi um dos órgãos escolhidos para este trabalho pelo fato de ser o órgão responsável pela metabolização da melatonina proveniente do trato gastrointestinal (BUBENIK, 2002), fazendo dele um órgão periférico que recebe melatonina no modelo do animal pinealectomizado, sendo essa uma possível explicação para não encontrarmos diferenças entre os tratamentos.

Podemos sugerir que existe um mecanismo de contrabalanço que está ativado no animal após 60 dias de pinealectomia. Apesar da melatonina circulante estar ausente e ser proclamada por muitos trabalhos como ativadora da expressão gênica das enzimas antioxidantes, o mesmo não foi verificado em plenitude no animal pinealectomizado. Porém, devemos levar em conta que existem diversos fatores e mecanismos que são responsáveis pela regulação de genes tão importantes para a manutenção da homeostase como os das enzimas antioxidantes e que tais mecanismos podem estar ativados no animal pinealectomizado mantendo a expressão gênica normalizada. Para que isso seja verificado de fato, são necessários estudos futuros para avaliar a expressão e atividade de $\text{NF}\kappa\beta$ e outras vias ativadas pelas espécies reativas de oxigênio que sejam também responsáveis pela regulação das enzimas antioxidantes no animal pinealectomizado.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a melatonina modula a expressão gênica e atividade da enzima glutathione peroxidase no músculo sóleo e, além disso, no córtex pré-frontal a ausência da melatonina aumenta a atividade da glutathione peroxidase no ZT24 em ratos pinealectomizados.

REFERÊNCIAS¹

ALBARRÁN, M. T.; LÓPEZ-BURILLO, S.; PABLOS, M. I.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. **Journal of Pineal Research**, v. 30, p. 227-233, 2001.

ALLEGRA, M.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; GENTILE, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 1-10, 2003.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 463-499, 2000.

ANTOLIN, I.; RODRÍGUEZ, C.; SÁINZ, R. M.; MAYO, J. C.; URÍA, H.; KOTLER, M. L.; RODRIGUEZ-COLUNGA, M. J.; TOLIVIA, D.; MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. Neuro hormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, v. 10, p. 882-890, 1996.

BAYDAS, G.; GURSU, M. F.; YILMAZ, S.; CANPOLAT, S.; YASAR, A.; CIKIM, G.; CANATAN, H. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. **Neuro Science Letters**, v. 323, p. 195-198, 2002.

BORGES-SILVA, C. N.; ALONSO-VALE, M. I. C.; FRANZÓI-DE-MORAES, S. M.; TAKADA, J.; PERES, S. B.; ANDREOTTI, S.; SKORUPA, A. L.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 38, p. 278-283, 2005.

BORGES-SILVA, C. N.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; PERES, S. B.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; ANDREOTTI, S.; CIPOLLA-NETO, J.; PHITON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. **Journal of Pineal Research**, v. 43, p. 96-103, 2007.

BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin Localization function and clinical relevance. **Digestive diseases and sciences**, v. 47, p. 2336-2348, 2002.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 980-989.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002.

CONWAY, S. J. E.; DREW, E.S.; MOWAT, P.; BARRET, P.; DELAGRANGE, P. J. MORGAN. Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 20602–20609, 2000.

COWAN, D. B.; WEISEL, R. D.; WILLIAMS, W. G.; MICKLE, D. A. Identification of oxygen responsive elements in the 5''-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 26904–26910, 1993.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

GENOVA, M. L.; PICH, M. M.; BIONDI, A.; BERNACCHIA, A.; FALASCA, A.; BOVINA, C.; FORMIGGINI, G.; CASTELLI, G. P.; LENAZ, G. Mitochondrial production of oxygen radicals species and the role of coenzyme Q as an antioxidant. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p. 506-513, 2003.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 418, n. 3, p. 291–296, 1997.

GIULIVI, C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. **Biochemical Journal**, v. 332, pt. 3, p. 673–679, 1998.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Biosciences, 2007.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 313-316, 2006.

HO, Y. S.; HOWARD, A. J.; CRAPO, J. D. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 278–286, 1991.

Jl, L. L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 582-593, 2007.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 340-352, 2005.

JONES, P. L.; PING, D.; BOSS, J. M. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. **Molecular and Cell Biology**, v. 17, p. 6970–6981, 1997.

KOTLER, M.; RODRÍGUEZ, C.; SÁINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; MENÉNDEZ-PELÁEZ, A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. **Journal of Pineal Research**, v. 24, p. 83-89, 1998.

LEDOUX, S. P.; DRIGGERS, W. J.; HOLLENSWORTH, B. S.; WILSON, G. L. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. **Mutation Research**, v. 434, p. 149–159, 1999.

LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M. F.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. M.; SAAD, M. J. A.; CARVALHO, C. R. O.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 235, p. 934-941, 1998.

LENAZ, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **IUBMB Life**, v. 52, p. 159–164, 2001.

LIU, F.; NG, T.B. Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 78, p. 447-453, 2000.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; REITER, R. J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. **Journal of Pineal Research**, v. 15, p. 59–69, 1993.

OZTURK, G.; COSKUN, S.; ERBAS, D.; HASANOGLU, E. The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. **Japanese journal of physiology**, v. 50, p. 149-153, 2000.

PABLOS, M. I.; REITER, R. J.; ORTIZ, G. G.; GUERRERO, J. M.; AGAPITO, M. T.; CHUANG, J. I.; SEWERYNEK, E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. **Neurochemistry International**, v. 32, p. 69-75, 1998.

PICINATO, M. C.; HABER, E. P.; CARPINELLI, A. R.; CIPOLLA-NETO, J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. **Journal of Pineal Research**, v. 33, p. 172-177, 2002.

POEGGELER, B.; THUERMAN, S.; DOSE, A.; SCHOENKE, M.; BURKHARDT, S.; HARDELAND, R. Melatonin's unique radical scavenging properties – Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. **Journal of Pineal Research**, v. 33, p. 20-30, 2002.

REITER, R. J.; TAN, D. X. What constitutes a physiological concentration of melatonin? **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 79-80, 2003.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; LEON, J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 1129-1146, 2003.

REPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, p. 100-102, 1996.

RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 26066–26075, 1994.

SCHRADER M.; FAHIMI H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1755-1766, 2006.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 325-395, 2003.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 191–208, 2000.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redoxactivated forms. **Science**, v. 258, p. 1898-1902, 1992.

STOYTICHEVA, Z. R.; BERRY, M. J. **Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 1429-1440, 2009.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A.; MARTÍNEZ-FRAGA, J.; RODRÍGUEZ-COLUNGA, M. J.; TOLIVIA, D. Effects of continuous light exposure on antioxidant enzymes, porphyrin enzymes and cellular damage in the Harderian gland of Syrian Hamster. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 60-68, 2003.

VOLLRATH, L. The pineal organ. In: OKSCHE, A.; VOLLRATH, L. **Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen**. Berlin: Springer, 1981. v. 6/7.

YOO, H. Y.; CHANG, M. S.; RHO, H. M. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 23887–23892, 1999.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 347-349, 2002.