



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

KLAUSEN OLIVEIRA ABREU

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE A EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DO
GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE RATOS**

FORTALEZA – CEARÁ

2019

KLAUSEN OLIVEIRA ABREU

EFEITOS DA MELATONINA SOBRE A EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DO
GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE RATOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva

FORTALEZA - CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Oliveira Abreu, Klausen.

Efeito da melatonina sobre a excitabilidade de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos [recurso eletrônico] / Klausen Oliveira Abreu. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 100 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Abaiara, 2019.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientação: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva.

1. Melatonina. 2. Excitabilidade neuronal. 3. Gânglio da raiz dorsal. 4. Canais de sódio. 5. Patch clamp. I. Título.

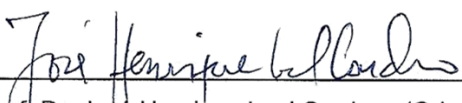
KLAUSEN OLIVEIRA ABREU

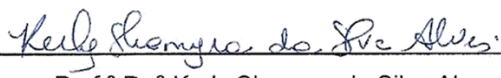
EFEITOS DA MELATONINA SOBRE A EXCITABILIDADE DE NEURÔNIOS DO
GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE RATOS


Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Ciências Fisiológicas.

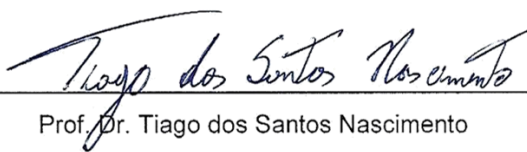
Aprovado em: 18 de fevereiro de 2019.

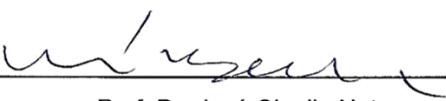
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará - UECE


Prof.^a Dr.^a Kerly Shamyra da Silva Alves
Universidade Estadual do Ceará - UECE


Prof. Dr. Ariclecio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará - UECE


Prof. Dr. Tiago dos Santos Nascimento
Faculdade Vale do Jaguaribe - FVJ


Prof. Dr. José Cipolla Neto
Universidade de São Paulo - USP

Aos meus amados pais, Francisco Nilo e
Izabel Cristina.

Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por ter me mantido firme e persistente mesmo nos momentos onde tudo parecia dar errado.

Aos animais de experimentação que contribuíram de maneira essencial para a execução desse trabalho.

Aos meus pais, Izabel Abreu e Nilo Abreu, por terem me dado o suporte necessário em todos os aspectos possíveis para a conclusão dessa etapa. Por terem sempre me incentivado desde o início e por terem dividido comigo as alegrias e dificuldades encontradas no caminho. Muito obrigado por possibilitarem a realização dos meus sonhos!

Ao prof. Henrique Cardoso por ser um exemplo a ser seguido não só como pesquisador, mas também como pessoa. Uma pessoa que sempre me incentivou a me superar e a encarar os desafios sem medo. Obrigado pela confiança, por todas as oportunidades concedidas e pelos vários ensinamentos. Obrigado também por ser um exemplo de perseverança e de humildade.

Aos meus irmãos, Nícollas Abreu e Andreza Abreu pela paciência e companheirismo durante todo o período e, em especial, nesse último ano.

À Carol Cardoso pela compreensão, especialmente, nos momentos em que mais precisei. Muito obrigado por ajudar a me superar, por apoiar minhas escolhas, pelas revisões dos textos, pela discussão dos dados e por acreditar no meu potencial... muitas vezes mais do que eu mesmo!

Considero que tive vários co-orientadores durante a pós-graduação e gostaria de agradecê-los por isso:

Ao Dr. Walber Ferreira por todos os ensinamentos práticos e teóricos sobre eletrofisiologia. Eu sempre disse que o seu método de ensinar não era dos mais fáceis, mas hoje, certamente, admito que ele funciona muito bem e que pretendo usá-lo quando começar a orientar. Obrigado pela amizade e pelas cervejas compartilhadas.

À Dra. Kerly Shamyra por me orientar desde que eu iniciei na orientação científica. Agradeço por ter me apresentado à melatonina e por ter dado início à ideia que hoje, originou, essa tese. Obrigado pela amizade e pelo companheirismo.

Ao professor Dr. José Cipolla Neto pela co-orientação, por ser motivo de inspiração e pelos vários ensinamentos ao longo da pós-graduação.

À Dra. Kristen O'Connell e à Dra. Catherine Kaczorowski pela co-orientação no Doutorado Sanduíche. Agradeço por terem tornado essa experiência muito mais agradável e produtiva. Obrigado pelas oportunidades concedidas e pela possibilidade de crescimento científico proporcionada.

À Nathalia Maria pelo apoio inestimável na realização dos experimentos, por ser uma pessoa dedicada, empenhada e compromissada a fazer o que se propõe e pela companhia durante essa árdua caminhada.

Aos professores da banca examinadora por aceitaram o convite de participar da mesma, contribuindo, dessa maneira, para o enriquecimento dessa pesquisa. As sugestões propostas certamente ajudarão na melhoria dessa tese e na publicação de mais artigos.

Aos membros do Laboratório de Eletrofisiologia, em especial a: profa. Andreлина Noronha, Felipe Gomes e Pedro Militão.

À Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto Superior de Ciências Biomédicas e seus funcionários.

Ao Programa Ciência sem Fronteiras pela oportunidade de qualificação e amadurecimento científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo suporte financeiro das pesquisas do Laboratório de Eletrofisiologia e pelas bolsas concedidas.

“Todas as vitórias ocultam uma
abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A melatonina é um neuro-hormônio produzido principalmente pela glândula pineal e possui diversos efeitos biológicos já relatados, como: antioxidante, antinociceptivo, efeito inibitório sobre a excitabilidade neuronal no sistema nervoso central (SNC) e sobre correntes de cálcio dependentes de voltagem no gânglio da raiz dorsal (GRD). O GRD representa um conjunto de corpos celulares que conduz informações sensoriais da periferia para o SNC. Esse tecido apresenta um alto grau de heterogeneidade neuronal e várias classificações já foram propostas para agrupar essas células. Embora haja relatos da ação da melatonina no GRD, não há dados sobre o efeito desse hormônio sobre a excitabilidade dos neurônios desse gânglio, que representa uma estrutura importante da fisiologia sensorial. Assim, investigou-se o efeito da melatonina sobre a excitabilidade de diferentes subpopulações (N_0 e N_{inf}) de neurossomas do GRD de ratos e o respectivo mecanismo de ação. Para tal foram utilizados ratos Wistar machos com massa corpórea compreendida entre 200-300 gramas. Os animais foram submetidos a um ciclo de 12 horas claro/escuro. Após o sacrifício, por inalação do CO_2 , foram dissecados os GRDs localizados nos segmentos lombares L4 e L5. Foram realizados experimentos com as técnicas do microeletrodo intracelular, patch clamp e RT-PCR em tempo real. A melatonina (10.0 – 1000.0 nM) causou uma redução da excitabilidade nos neurônios N_0 . Essa redução pôde ser observada pelo bloqueio do potencial de ação (PA) bem como pelo aumento da reobase. Em relação aos parâmetros passivos da membrana, a melatonina causou uma hiperpolarização do potencial de repouso (PR) e aumento da resistência de entrada (R_{in}). Esses efeitos foram bloqueados na presença do luzindol, um antagonista inespecífico dos receptores de membrana da melatonina. Além disso, foi encontrado que o GRD expressa o gene que codifica o receptor de melatonina do tipo MT_1 , o que sugere que os efeitos observados foram do tipo hormonal e foram mediados pelo receptor MT_1 . Em relação aos neurônios N_{inf} , a melatonina (0,1 nM – 1000.0 nM) também exerceu uma redução na excitabilidade, mas apresentou uma potência farmacológica bem maior, onde a partir de 100.0 pM, já foram observados bloqueios do PA, enquanto nos neurônios N_0 os bloqueios só foram observados a partir de 1.0 nM. Houve neurônios N_{inf} em que o efeito inibitório da excitabilidade não foi observado (*neurons with sensitivity of excitability to melatonin absent* - NSEMA) e outros em que houve bloqueio do PA e aumento da reobase (*neurons with sensitivity*

of excitability to melatonin present - NSEMP). Em relação aos parâmetros passivos, a melatonina causou uma hiperpolarização do PR em ambos os subtipos, mas o aumento da R_{in} só foi observado nos neurônios NSEMA. Em relação aos parâmetros ativos, a melatonina causou uma redução na $(dV/dt)_{max}$ ascendente, o que corrobora o efeito inibitório na excitabilidade. Esse parâmetro não foi alterado nas células NSEMA. Visando elucidar o mecanismo de ação desse hormônio sobre a excitabilidade, seu efeito dele sobre as correntes iônicas dependentes de voltagem foi investigado. A melatonina (1000.0 nM) reduziu a corrente de entrada, mas não alterou a corrente de saída, que são provavelmente compostas, principalmente, pelos íons sódio e potássio respectivamente. Após esse conjunto de experimentos, a corrente de sódio foi isolada por meio de bloqueadores farmacológicos, para caracterizar o efeito da melatonina sobre esses canais, que são essenciais para a geração do PA e o controle da excitabilidade. A melatonina reduziu a condutância ao sódio em torno de 20% dos valores controle e desviou a curva de ativação corrente-voltagem (I-V) para valores mais hiperpolarizados. Além disso, a melatonina causou um desvio da curva de inativação para valores mais hiperpolarizados, que pode resultar na redução da condutância ao sódio e, conseqüentemente, uma redução da excitabilidade. Assim, sugere-se que o efeito desempenhado pela melatonina nesse tecido ocorre por meio da ligação ao seu receptor de membrana MT_1 , desencadeando uma via de segundos mensageiros, que culmina na inibição da corrente de Na^+ e, conseqüentemente, redução da excitabilidade.

Palavras-chave: Melatonina. Excitabilidade neuronal. Gânglio da raiz dorsal. Canais de sódio. Patch clamp.

ABSTRACT

Melatonin is a neurohormone produced mainly by the pineal gland and has several biological effects, such as: antioxidant, antinociceptive, inhibitory effect on neuronal excitability in the central nervous system (CNS) and on voltage-dependent calcium currents in the dorsal root ganglia (DRG). The DRG represents a collection of cell bodies that conveys sensory information from the periphery to the CNS. This tissue presents a high degree of neuronal heterogeneity and several classifications have already been proposed to group these cells. Although there are reports of the action of melatonin on the DRG, there are no report on the effect of this hormone on the excitability of the neurons of this ganglion, which represents an important structure of sensory physiology. Thus, we decided to investigate the effect of melatonin on the excitability of different subpopulations (N_0 and N_{inf}) of rat DRG neurosomes and their mechanism of action. Male Wistar rats weighting 200-300 grams were used. The animals were submitted to a light/dark cycle of 12 hours. After the sacrifice, by CO_2 inhalation, the DRGs located in the lumbar segments L4 and L5 were dissected. Experiments were carried out using sharp microelectrode technique, patch clamp and real-time RT-PCR. Melatonin (10.0 - 1000.0 nM) caused a reduction in excitability in N_0 neurons. This reduction could be observed by blocking action potential (AP) as well as by increased reobase. Regarding the passive membrane parameters, melatonin caused a hyperpolarization of the resting membrane potential (RMP) and increase of the input resistance (R_{in}). These effects were blocked in the presence of luzindole, a nonspecific antagonist of melatonin membrane receptors. Furthermore, it has been found that DRG expresses the gene coding for the MT_1 melatonin receptor, which suggests that the observed effects were of the hormonal type and were mediated by the MT_1 receptor. Regarding N_{inf} neurons, melatonin (0.1 nM - 1000.0 nM) also exerted a reduction in excitability, but showed a much higher pharmacological potency, where from 100.0 pM, AP blockades were already observed, while in neurons N_0 the blockades were only observed from 1.0 nM. There were N_{inf} neurons in which the inhibitory effect of excitability was not observed (neurons with sensitivity of melatonin absent - NSEMA) and others which there was AP blockade and rheobase increase (neurons with sensitivity of excitability to melatonin present – NSEMP). Regarding the passive parameters, melatonin caused a hyperpolarization of RMP in both subtypes, but the increase of R_{in} only was observed in NSEMA neurons. Regarding the active

parameters, melatonin caused a decrease in the $(dV/dt)_{max}$ ascending, which corroborates the inhibitory effect on excitability. This parameter was not changed in NSEMA cells. Aiming to elucidate the mechanism of action of this hormone on excitability, we investigated its effect on voltage-dependent ion currents. Melatonin (1000.0 nM) reduced the inward current but did not change the outward current, which are probably composed mainly of the sodium and potassium ions, respectively. After this set of experiments, we isolated the sodium current through pharmacological blockers to characterize the effect of melatonin on these channels, which are essential for the generation of AP and the control of excitability. Melatonin reduced sodium conductance by about 20% of the control values and shifted the current-voltage (I-V) activation curve to more hyperpolarized values. In addition, melatonin caused a shift from the inactivation curve to more hyperpolarized values, which may result in reduced sodium conductance and, consequently, a reduction in excitability. Thus, it is suggested that the effect of melatonin on this tissue occurs through binding to its membrane receptor MT_1 , triggering a second messenger pathway, culminating in the inhibition of Na^+ current and, consequently, reduction of excitability.

Keywords: Melatonin. Neuronal excitability. Dorsal root ganglion. Sodium channels. Patch clamp.