

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO METIL-PARATION SOBRE AS ENZIMAS DO METABOLISMO DA SEROTONINA EM CÉREBRO DE PACU POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

► Resumo

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorométrica (HPLC-FD) foi utilizada para a determinação das atividades das enzimas responsáveis pelo metabolismo da serotonina em frações de células do cérebro do peixe *Piaractus mesopotamicus* (pacu). O limite de detecção de até 5 pg do detector fluorométrico mostrou-se sensível e específico para as dosagens dos produtos das reações catalisadas pelas enzimas triptofano hidroxilase (TPH), aminoácido aromático descarboxilase (AADC), monoamino oxidase (MAO) e serotonina N-acetiltransferase (SNAT), com resolução satisfatória.

O método foi útil para saber quais destas enzimas poderiam ser afetadas por metil-paration, um pesticida organofosforado utilizado em piscicultura contra artrópodes que predam alevinos em tanques de cultivo. Vinte e quatro horas após ser injetado na cavidade peritoneal dos pacus o metil-paration aumentou a atividade da AADC em cerca de 35%, mas inibiu a SNAT, que chegou a apresentar 90% de sua atividade inibida 48h depois da injeção.

Considerando que a AADC catalisa a biossíntese da serotonina e a SNAT utiliza a serotonina para formar a melatonina, concluímos que o paration pode causar acúmulo de serotonina em cérebro de pacu.

Palavras-chave: HPLC, serotonina, pesticidas, paration

► Summary

A high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FD) was developed for assaying the enzyme activities responsible for serotonin metabolism in brain cellular fractions from the fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu). Detection limits of the fluorimetric detector, up to 5 pg, proved to be highly sensitive and specific for quantifying the products of reactions catalyzed by tryptophan hydroxylase (TPH), amino acid aromatic decarboxylase (AADC), monoamine oxidase (MAO) and serotonin N-acetyltransferase (SNAT) with sufficient resolution.

The method was useful to know which of these enzymes could be affected by methyl-parathion, an organophosphate pesticide largely employed in pisciculture against arthropods that prey on post-larvae fish. Twenty-four hours after being injected into the peritoneal cavity of pacus, methyl-paration increased AADC activity to about 35%, but inhibited SNAT, which activity loss reached up to 90% forty-eight hours after the injection.

Considering that AADC catalyzes serotonin biosynthesis and that SNAT utilizes serotonin to produce melatonin, we concluded that parathion might provoke serotonin accumulation in brain of pacu.

Keywords: HPLC, serotonin, pesticides, parathion

Cristiane Martins C. de Salles
João Bosco de Salles
Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos
Cristina Costa e Silva
**Jayme da Cunha Bastos Neto*

Universidade do Estado
do Rio de Janeiro
Departamento de Bioquímica

* Autor para correspondência:
Prof. Dr. Jayme da Cunha
Bastos Neto
Universidade do Estado
do Rio de Janeiro
Departamento de Bioquímica,
Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes
Av. Professor Manoel
de Abreu, 444
Cep: 20550-170
Rio de Janeiro. RJ
Fone: (21) 587-6429
Fax: (21) 587-6136
E-mail: jbastos@uerj.br

Introdução

Os peixes representam cerca de 50% dos vertebrados, englobando aproximadamente 24.000 espécies atualmente conhecidas (1). Eles são classificados de acordo com o tipo de esqueleto que possuem: peixes sem esqueleto ósseo, os Chondrichthyes ou cartilaginosos e peixes ósseos, os Osteichthyes. Dentre os Osteichthyes, a infraclasse dos teleósteos é a maior e a mais representativa, agrupando 23.400 espécies. Os teleósteos se distribuem por uma variedade de ambientes aquáticos continentais e marinhos, desde grandes altitudes, onde o oxigênio é muito rarefeito, até as profundezas marinhas das fossas abissais de 11.000 m, onde a pressão pode chegar a centenas de atmosferas. Ocorrem em águas com faixa de temperatura entre 6°C, nos Oceanos Ártico e Antártico, até 38°C, em lagos da África Oriental. Mecanismos típicos, apropriados às influências presentes, permitiram-lhes grassar em todos estes ambientes. Esta plasticidade de adaptação a águas com diferenças de dureza, temperatura, pH, velocidade de fluxo, fauna competitiva, pressão e iluminação suscita curiosidade sobre a regulação neuronal das funções fisiológicas dos teleósteos que respondem a estímulos ambientais.

As aminas biogênicas são as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), as indolaminas (serotonina e melatonina), as imidazolaminas (histamina) e as poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) (Fig. 1).

A importância das aminas biogênicas está no fato delas desempenharem importantes papéis fisiológicos no organismo, agindo como neurotransmissores, hormônios e biomoduladores. A serotonina em humanos pode ser encontrada nas células enterocromafins da mucosa intestinal, nos neurônios serotoninérgicos do cérebro, na glândula pineal e nas

plaquetas. Ainda que os estudos realizados sobre o seu papel fisiológico tenham esclarecido algumas de suas funções, o significado da presença de serotonina em alguns tecidos permanece sob intensa investigação (2). Vários estudos têm demonstrado que uma das ações da serotonina é influir sobre o controle do ciclo reprodutivo dos organismos, tanto em mamíferos quanto em espécies não-mamíferas.

A estimulação das gônadas necessária para a reprodução dos vertebrados é realizada por glicoproteínas chamadas de hormônios gonadotrópicos ou gonadotropinas (GtH), que são liberadas pela hipófise no sangue. Em teleósteos existem duas gonadotropinas, a GtH-I, responsável pela iniciação e manutenção do crescimento das gônadas e a GtH-II, responsável pela regulação dos estágios finais da maturação, ovulação e ejaculação (3).

Enquanto as catecolaminas parecem ter efeito inibitório sobre a secreção de GtH (4), o efeito das indolaminas parece ser o de aumentar a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que é um decapeptídeo produzido no hipotálamo responsável pela liberação das formas de GtH pela hipófise. De fato, em algumas espécies de peixes ósseos, foi observado o efeito positivo da serotonina na liberação de GtH (5,6). Sintetizada a partir da serotonina, a melatonina está implicada em uma variedade de funções fisiológicas, desde o controle da coloração da pele de sapos até a regulação do ritmo circadiano (7). Nos animais até aqui estudados, os efeitos da melatonina estão relacionados com a luz. Ela está diretamente envolvida na adaptação a mudanças na intensidade da luz, ambiente pelos fotorreceptores da retina e pelos melanóforos da pele. Em peixes ósseos foi observado um ritmo circadiano da atividade de locomoção denominado ritmo

free-running, que, em certas espécies de peixes, é alterado e até abolido depois da remoção da pineal, a glândula produtora de melatonina (8). Outro papel fisiológico da melatonina parece estar relacionado a termorregulação comportamental. Existe um ritmo de preferência termal, segundo o qual o peixe seleciona temperaturas mais altas à noite e mais baixas durante o dia. Com a retirada da pineal o ritmo é eliminado. Talvez o papel da melatonina mais estudado diga respeito ao controle fotoperiódico da reprodução. Em peixes, o fotoperíodo possui função importante, pois sua reprodução é sazonal. Na maioria das espécies, a reprodução ocorre na primavera e no verão, quando ocorrem fotoperíodos longos (7). No entanto, é curioso no-

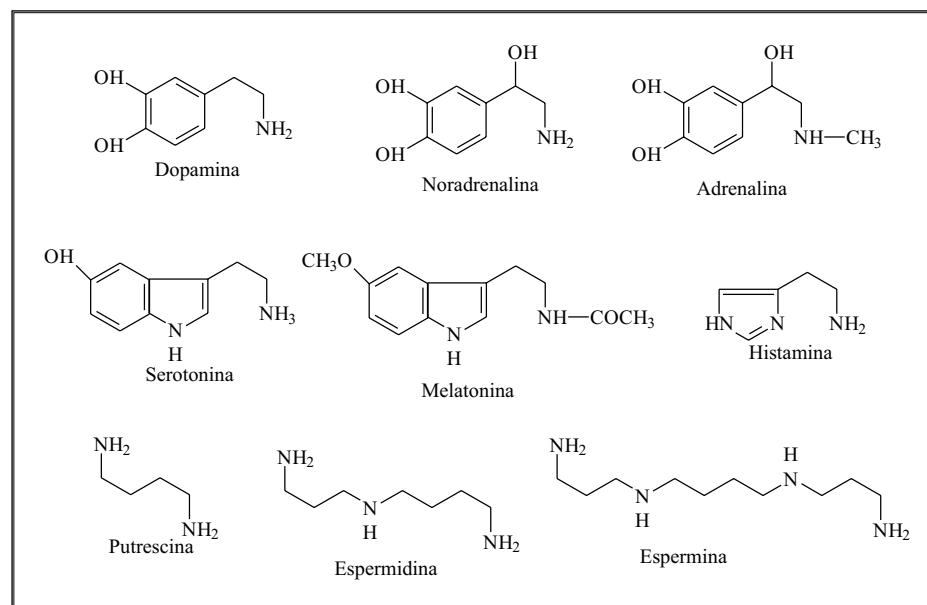


Figura 1. Fórmulas estruturais planas das principais aminas biogênicas

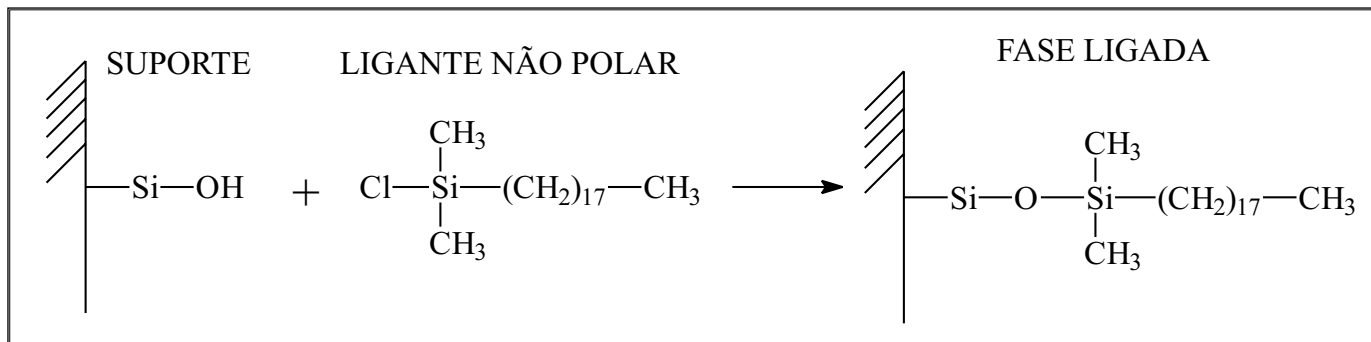


Figura 2. Esquema de formação de uma coluna de fase reversa do tipo-C18

tar que em algumas espécies de peixes um curto período de luz faz com que a melatonina tenha efeito estimulador e em outras espécies tenha efeito inibidor (9) sobre a reprodução. Amano et al. (2000) (10) observaram que em salmão masu (*Onchorhynchus masou*) tratado com melatonina houve um aumento dos níveis de GtH I da pituitária e desenvolvimento testicular. Khan e Thomas (1996) (11) observaram o efeito estimulante de injeções de melatonina sobre os níveis sanguíneos de GtH II em *Micropogonias undulatus*. Para Amano et al. (10), a melatonina é um dos fatores que regula a sinalização fotoperiódica para o desenvolvimento gonadal do salmão masu, sendo que as mudanças sazonais no comprimento dos dias são provavelmente traduzidas no ritmo das mudanças de concentração da melatonina que, em último caso, regula o eixo cérebro-pituitária-gônada nesta espécie.

A utilização do HPLC para a detecção das aminas biogênicas se iniciou em 1975 e deu origem a três aplicações práticas da HPLC para estudar as aminas biogênicas. A primeira é a quantificação dos níveis de aminas biogênicas a partir de extratos de órgãos, como cérebro e glândula pineal, ou em líquidos corporais, como sangue e fluido cérebro-espinhal. A segunda é a dosagem da atividade das enzimas responsáveis por sua síntese e degradação, cujas atividades, por serem baixas, foram originalmente medidas apenas por métodos radioativos, considerados eficientes, mas de alto custo econômico. Como alternativa, a utilização do HPLC possibilita dosagens enzimáticas altamente sensíveis quando associada à detecção dos produtos da catálise por eletroquímica ou por fluorescência. A terceira aplicação da HPLC é a purificação das enzimas do metabolismo das aminas biogênicas, já que estas enzimas são geralmente pouco estáveis, não suportando protocolos de purificação longos (12).

Um dos modos cromatográficos da HPLC mais utilizadas para a separação de aminas biogênicas é a cromatografia de partição de fase reversa, em que a fase estacionária é hidrofóbica e a fase móvel menos hidrofóbica que a fase estacionária. A ordem de eluição relaciona-se ao aumento do caráter hidrofóbico do soluto; uma molécula mais solúvel em água será mais rapidamente eluída que uma molécula menos hidrossolúvel.

As fases móveis mais usadas são formadas por uma mistura de água (ou uma solução tampão com baixa força iônica) e um solvente orgânico, geralmente metanol ou acetonitrila. As fases estacionárias são em geral compostas de sílica mais um ligante não polar formado de cadeias com 4, 8 ou 18 átomos de carbono (Fig. 2). As colunas do tipo ODS (octadecilsilil) são as mais freqüentemente utilizadas para as dosagens por possuírem uma meia-vida longa que pode ser aumentada com a utilização de pré-colunas com fase estacionária equivalente.

Usar a HPLC nas dosagens das enzimas do metabolismo da serotonina, além da mencionada detecção de baixos níveis de atividade enzimática, permite grande economia de reagentes, já que o volume final dos meios de reação, em torno de 50 a 100 μ L, são volumes corriqueiros de injeção em colunas de HPLC.

A detecção das aminas biogênicas pode ser feita pelos sistemas amperométrico, eletroquímico ou fluorométrico. A escolha da detecção fluorométrica para as indolaminas deve-se ao fato de que estas moléculas exibem uma forte fluorescência nativa com limites de detecção que podem chegar a 5 pg. Este valor é semelhante ao observado com a utilização das técnicas de detecção amperométrica e eletroquímica (13). Além disto os comprimentos de onda de excitação e emissão dos indóis são bastante específicos, o que diminui a interferência de substâncias que eventualmente possam contaminar as soluções de dosagem. Geralmente, os estudos relacionados à detecção de indóis por fluorescência utilizam comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) que variam entre 280-290 nm e de emissão (λ_{em}) entre 345-360 nm.

Os principais metabólitos da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) são o triptofano (Trp), o 5-hidroxitriptofano (5-HTP), o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), a N-acetilserotonina (NAS) e a melatonina (MEL, 5-hidroximetil-N-acetilserotonina). A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido L-aromático triptofano através de duas etapas, uma hidroxilação realizada pela triptofano hidroxilase (TPH) e uma descarboxilação realizada pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase, que é uma aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (14). A degradação da serotonina é catalisada pela monoamino oxidase (MAO), que ao desaminar oxidativamente a serotonina forma o seu produto de excreção, o ácido 5 hidroxin-

dolacético (5-HIAA). Ao invés de serem degradadas as moléculas de serotonina podem seguir uma via alternativa, a qual, como produto final, fornece a melatonina. A melatonina é sintetizada em duas reações: uma acetilação, realizada pela serotonina N-acetiltransferase (SNAT) e uma metilação, realizada pela hidroxindol O-metiltransferase (HIOMT). Estas reações do metabolismo da serotonina em cérebro estão representadas na Figura 3.

A despeito da importância fisiológica que os mecanismos de manutenção de diferentes quantidades de indolaminas em cérebro de peixes tem, quase todos os trabalhos relacionados com serotonina e com melatonina em peixes apenas quantificam os seus níveis, deixando uma lacuna quanto à observação de variações de atividades das enzimas responsáveis pelas suas síntese e degradação. Para examinar em detalhes como essas variações podem ocorrer estamos estudando as principais propriedades bioquímicas das enzimas do metabolismo de serotonina em cérebro de pacu, uma espécie neotropical economicamente importante para a aqüicultura nacional.

Os compostos químicos utilizados na agricultura são provavelmente o grupo de substâncias mais disseminado pelo ambiente. Para atender a crescente demanda por alimentos e outros produtos faz-se uso de pesticidas no controle de pragas da lavoura. Embora a utilização de pesticidas garanta a produção agrícola

em escala comercial, ela causa poluição do meio ambiente. Segundo dados já publicados (15) o metil-paration (O,O-dimetil O-[p-nitrofenil] fosforotionato), que está disponível desde 1949, é um dos organofosforados mais amplamente usados para o controle de pestes em ambientes agrícolas. O metil-paration mostrou-se melhor que o etil-paration devido a sua mais baixa toxicidade para humanos e animais domésticos e por seu amplo espectro de ação sobre os insetos. Sua mais curta vida residual também contribuiu para que seja mais desejável em certas ocasiões (16). O mecanismo de ação dos organofosforados baseia-se na inibição da acetilcolinesterase do sistema nervoso central, do sistema nervoso periférico e das junções neuromusculares, causando assim, uma síndrome colinérgica derivada do acúmulo do neurotransmissor acetilcolina (17). Os efeitos sobre o sistema nervoso central podem ser representados por excitação inicial, que pode resultar em convulsões, seguidas de depressão, perda da consciência e insuficiência respiratória (17).

Organismos aquáticos, principalmente os peixes, têm sido cada vez mais afetados por pesticidas usados em ambientes rurais e domésticos. Os peixes sofrem intoxicações agudas, que podem levar à morte, e crônicas que geralmente implicam na redução do desenvolvimento de determinadas espécies por deficiência de reprodução. Neste artigo, considerando as alterações neurológicas provocadas pelos organofosforados, relatamos resultados de experimentos feitos para aprender se as enzimas do metabolismo cerebral da serotonina em peixes podem ser afetadas por poluição ambiental causada por pesticidas organofosforados.

■ Materiais e Equipamentos

Preparo das frações celulares cerebrais

Pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) de ambos os sexos, com peso médio de 198,59 g ± 43,80 e comprimento médio de 19,5 cm ± 1,46, foram sacrificados por secção da coluna vertebral. Os pacus foram divididos em grupos controle, que receberam apenas óleo de milho, e ensaio, que foram inoculados com metil-paration dissolvido em óleo de milho comercial em uma concentração de 20 mg/kg de peso corporal. Os peixes controle e ensaios foram mantidos juntos em aquários de 1000 L com aeração constante. Os controles foram marcados na barbatana superior. De cada grupo foram sacrificados animais 24 e 48 h após a injeção. Nenhum animal do grupo controle ou ensaio foi perdido durante o experimento. Os cérebros foram retirados, secos em papel absorvente e pesados. Para cada grama de tecido foram acrescentados 4,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,25 M de sacarose. Os órgãos foram picados com tesoura e submetidos à homogeneização em aparelho do tipo Potter-Elvehjem. Todo este procedimento foi realizado a 4 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 700 x g por 10 min. O sobrenadante foi então

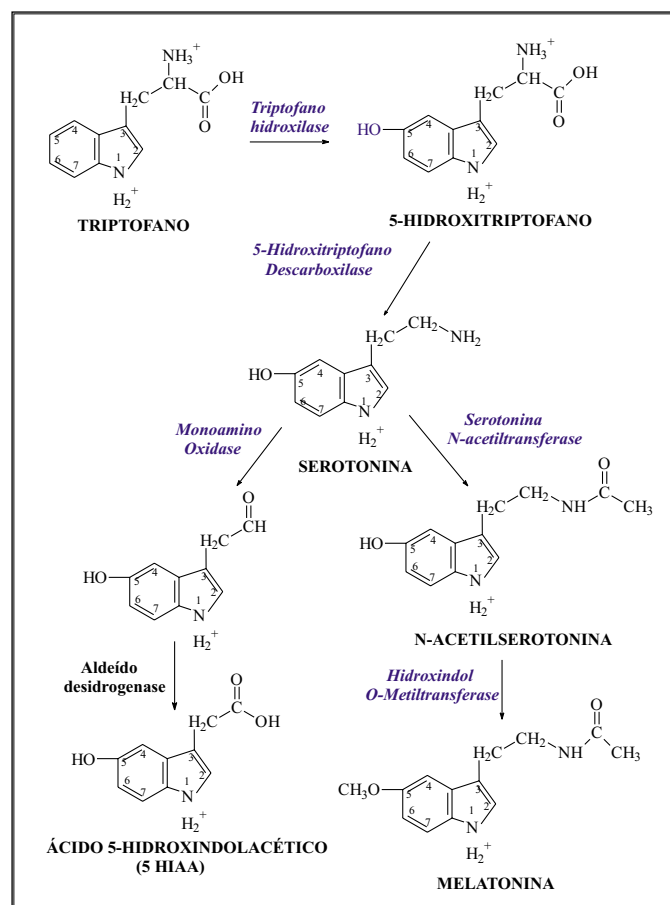


Figura 3. As reações e os metabólitos do metabolismo da serotonina

submetido a uma segunda centrifugação de 20.000 x g por 20 min. O sobrenadante da centrifugação de 20.000 x g foi submetido à nova centrifugação de 100.000 x g por 60 min. Para os ensaios da SNAT foi usado o sobrenadante de 20.000 x g (sem a presença de mitocôndrias). Para os ensaios da MAO foi utilizado o sedimento de 20.000 x g (enriquecido de mitocôndrias), suspenso no mesmo tampão de homogeneização na proporção de 1 : 1 (peso do órgão : volume de tampão). Para os estudos da TPH e da AADC foram usados os sobrenadantes de 100.000 x g. Todas as frações foram alíquotadas e congeladas em nitrogênio líquido até seu uso.

Determinação da concentração de proteínas

Utilizamos o método de Peterson (18) para a determinação da concentração de proteínas. Padrões contendo 10 µg e 100 µg de albumina bovina foram processados da mesma forma que os ensaios e os brancos.

Determinação da atividade da Triptofano hidroxilase (TPH)

A atividade da TPH foi dosada através da detecção do 5-HTP pelo método de Friedman et al. (19), com modificações. O ensaio consistia de tampão tris-acetato 0,1 M, pH 9,0, sulfato ferroso de amônio 40 µM, 2-mercaptoetanol 4,0 mM, fração solúvel (1,0 mg/mL), catalase 1000 U e L-triptofano 1,0 mM. Então, para inibir a AADC, foi adicionada m-benzilhidrazina para 5,0 mM final, seguindo-se uma pré-incubação a 37 °C por 10 minutos. A reação foi disparada com a adição de 6-MePH₄ para 0,2 mM dissolvida em HCl 10 mM. Após 30 minutos, com a adição de ácido perclórico para 3,5%, a reação foi paralisada. Os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 2 minutos e 90 µL dos sobrenadantes foram alíquotados em frascos tipo Eppendorf.

Determinação da atividade da Aminoácido Aromático Descarboxilase (AADC)

A atividade da AADC foi dosada através da detecção da serotonina pelo método padronizado em nosso laboratório. O ensaio consistia de tampão fosfato de potássio 30 µM, pH 7,5, piridoxal-5-fosfato (PLP) 10 µM e fração solúvel 1,5 mg/mL. Após isto, para inibir a monoamino oxidase, foi adicionado pargilina para 1,0 mM, deixando-se a mistura durante 10 minutos a 40 °C. A reação foi disparada com a adição de 5-hidroxitriptofano para 0,2 mM, transcorrendo durante 30 minutos a 40 °C. A adição de ácido perclórico para 3,5% paralisou a reação. A seguir, os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 2 minutos. Após esta centrifugação 180 µL dos sobrenadantes foram alíquotados em frascos tipo Eppendorf.

Determinação da atividade da Monoamino Oxidase (MAO)

A atividade da MAO foi dosada através da detecção do 5-HIAA pelo método padronizado em nosso laboratório. O meio

de ensaio consistia de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, e 50 µg/mL de proteínas de fração mitocondrial. A reação foi disparada com a adição de serotonina para 0,1 M dissolvida em tampão de dosagem, transcorrendo a 40 °C por 10 minutos. O volume total da reação foi de 400 µL. A reação foi paralisada com a adição de ácido tricloroacético (TCA) para 0,2 M. Nos brancos a serotonina foi adicionada imediatamente antes da adição de TCA. Os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 2 minutos. Após esta centrifugação 300 µL dos sobrenadantes foram alíquotados em frascos tipo Eppendorf.

Determinação da atividade da Serotonina N-Acetiltransferase (SNAT)

A atividade da SNAT foi dosada através da detecção do NAS pelo método padronizado em nosso laboratório. O ensaio consistia de tampão tris/HCl 0,1 M, pH 9,0, serotonina para concentração final de 0,6 mM e 0,75 mg/mL de proteínas do sobrenadante cerebral. Disparamos a reação com a adição de acetil-coenzima A dissolvido em tampão de dosagem para 1,0 mM final, transcorrendo por 30 minutos a 35 °C. A reação foi paralisada com a adição de ácido perclórico para 3,5%. Os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 2 minutos. Após esta centrifugação 40 µL dos sobrenadantes foram alíquotados em frascos tipo Eppendorf.

Cromatografia de alta eficiência - HPLC

Utilizamos um conjunto para HPLC Shimadzu (Solvente Delivery Module modelo LC10AD) agrupado com um espectrofotômetro de fluorescência modelo RF-535 e um processador de dados modelo Chromatopac CR6A.

As amostras de análise foram os sobrenadantes dos meios reacionais das enzimas guardadas nos frascos Eppendorf. As separações cromatográficas foram realizadas usando dois modelos de colunas de fase reversa: tipo C-18 (ODS Hypersyl, 200 mm x 4,6 mm, 5 µ) ou do tipo C-8 (Phenomenex 250 mm x 4,6 mm, 10 m). Para todas as separações cromatográficas foi utilizada uma pré-coluna (60 x 5 mm) do mesmo tipo da coluna principal.

A fase móvel consistia de acetato de sódio 10 mM, pH 4,82, ou fosfato de potássio 20 mM, pH 2,2, contendo metanol ou acetonitrila. A fase móvel foi desgaseificada por vácuo antes da utilização. O fluxo de solvente foi de 1,5 mL/min e as separações foram realizadas à 25 °C.

Os comprimentos de onda do espectrofotômetro de fluorescência foram 285 nm (excitação) e 350 nm (emissão) ou, no caso da dosagem da TPH, 300 nm (excitação) e 330 nm (emissão).

Cálculo da resolução da separação dos indóis

Calculamos a resolução (Rs) das corridas cromatográficas de acordo com Mant e Hodges (20).

Cálculo estatístico

Os cálculos estatísticos foram realizados com a ajuda do programa de computador Graph Pad InStat versão 3.01 da GraphPad Software Inc. usando o teste t de Student e a análise de variância de medidas repetidas a um nível de significância $\alpha = 0,05$.

Resultados e Discussão

Não há necessidade de extrair os indóis para sua quantificação, pois eles podem ser identificados diretamente por fluorometria em homogeneizados brutos cerebrais (21, 22, 23). A maioria dos indóis, incluindo aqueles derivados do metabolismo de serotonina, possui uma intensa fluorescência natural que pode ser aumentada quando são acrescentados ácidos. Mesmo que a detecção por fluorescência permita uma grande seletividade quanto aos indóis devido à escolha de comprimentos de onda de excitação e de emissão para cada um deles, para quantificar os produtos formados nas dosagens das enzimas de seu metabolismo, precisamos separar, nos meios de reação, os substratos dos produtos formados. Para isto empregamos a HPLC de amostras dos sobrenadantes ácidos dos meios de dosagem.

Neste trabalho obtivemos a maior eficiência de separação dos indóis usando uma coluna de fase reversa do tipo C-18, exceto para a separação da 5-HT do 5-HIAA quando da dosagem da MAO, que teve uma melhor resolução com a utilização de uma coluna de fase reversa do tipo C-8. Cromatogramas típicos das separações dos indóis para as dosagens das enzimas do metabolismo de serotonina são mostrados nas figuras

Tabela I. Dados cromatográficos. 1- acetato de sódio 10 mM pH 4,82 e 20% de metanol; 2- acetato de sódio 10 mM pH 4,82 e 23% de metanol; 3- fosfato de potássio 20 mM pH 2,2 e 15% de acetonitrila; 4 - acetato de sódio 10 mM pH 4,82 e 17% de metanol e 1% de acetonitrila. O fluxo em todas as corridas cromatográficas foi de 1,5 mL/min. TR- tempo de retenção; R - resolução

Enzima	Indol	Condição cromatográfica	TR (min)	R
TPH	Trp	1	5,0	2,1
TPH	5-HTP	1	2,5	2,1
AADC	5-HTP	2	2,0	1,6
AADC	5-HT	2	7,0	1,6
MAO	5-HT	3	6,0	1,9
SNAT	5-HT	4	9,0	0,7
MAO	5-HIAA	3	9,0	1,9
SNAT	NAS	4	5,5	0,7

4 (Trp e 5-HTP para a dosagem de TPH), 5 (5-HTP e 5-HT para a dosagem de AADC), 6 (5-HT e 5-HIAA para a dosagem da MAO) e 7 (5-HT e NAS para a dosagem de SNAT). A letra A representa a separação de padrões e a letra B a dosagem das enzimas em frações de células de cérebro de pacu. Na tabela 1 estão listados os tempos de retenção de cada indol.

Para a dosagem das enzimas que metabolizam serotonina em cérebro de pacu, utilizamos um $\lambda_{\text{excitação}} = 285 \text{ nm}$ e um $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$. Para a dosagem de TPH, nós observamos que os melhores comprimentos de onda foram 300 nm (excitação) e 330 nm (emissão). Moran e Fitzpatrick (24) observaram que triptofano e 5-hidroxitriptofano possuem diferentes características espectrais e que a fluorescência máxima destas duas moléculas fica em torno de 278 nm. Pela comparação dos espectros de absorvância destes compostos, observar-se que em presença de triptofano o 5-hidroxitriptofano pode ser seletivamente excitado por comprimentos de onda entre 300 e 320 nm. Um exemplo que os autores descrevem é que no comprimento de onda de excitação de 300 nm o 5-hidroxitriptofano possui uma fluorescência total 11,9 vezes maior do que o triptofano. Com base nestas diferenças, padronizamos o método de dosagem da TPH sem que tivéssemos a interferência da fluorescência do triptofano.

Lee Chin (25) conseguiu separar com eficiência a serotonina do 5-HIAA em uma coluna C-18 (ODS-2, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm). Além de possuir uma coluna com um comprimento maior que a utilizada em nossos estudos, Lee Chin utilizou uma fase móvel mais elaborada, composta de uma parte polar (ácido cítrico 14,4 mM, acetato de sódio 10 mM, octilsulfonato de sódio 4 mM, EDTA 1 mM e fosfato de dibutilamina 0,25 mM) e os solventes apolares metanol e acetonitrila na proporção de 8:1:1. Nestas condições, o tempo de retenção do 5-HIAA ficou em torno de 6 minutos e o da serotonina, em 17 minutos. Wolf e Kuhn (26) utilizaram condições bem semelhantes às nossas, (fase móvel composta de acetato de sódio 10 mM, pH 4,82, contendo 15% de metanol com fluxo de 1,4 mL/min) e, usando uma coluna do tipo C-18 (Spherisorb ODS, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm), conseguiram separar todos os indóis (Trp, 5-HTP, 5-HT, NAS e 5-HIAA) em uma faixa de tempo entre 4 e 18 minutos.

Mannens et al. (27) desenvolveram um método semelhante ao do nosso laboratório para a dosagem da SNAT. A coluna utilizada foi uma ODS 2 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm) com uma fase móvel constituída de acetato de sódio 0,1 M, pH 4,75 contendo 25% de metanol. Nestas condições, a serotonina eluiu com 3,2 min e a NAS com 5,3 min. Nas condições desenvolvidas em nosso laboratório observamos a inversão da saída dos dois compostos, com a NAS saindo em 5,6 min e a serotonina em 8,8 min. Dois fatores podem estar influenciando esta inversão, o primeiro diz respeito à concentração de metanol, menor do que o utilizado por Mannens

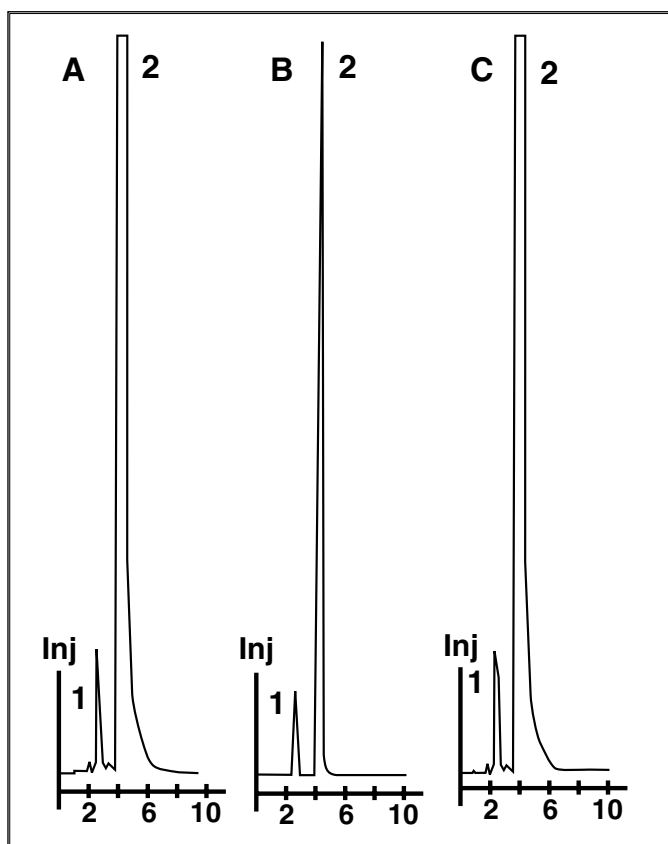


Figura 4. Cromatograma típico da separação de 5-HTP (pico 1) e de Trp (pico 2) detectados a (A) $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ 285 nm/350 nm e (B) 300 nm/330 nm em padrões e na dosagem (C) da TPH em fração solúvel de cérebro de pacu, após a padronização das melhores condições de dosagem

(27) e o segundo está relacionado à coluna utilizada pelos pesquisadores. Embora não tenhamos conseguido separar todos os indóis com uma única metodologia, determinamos um método eficiente e de baixo custo para a dosagem das enzimas do metabolismo de serotonina.

Thomas et al. (28) compararam a dosagem da SNAT, utilizando dois métodos de detecção, o fluorométrico (FL) e o eletroquímico (EC). Tanto o FL quanto o EC foram altamente sensíveis e economicamente mais viáveis do que os métodos que utilizam acetil-coenzima A radioativa. A desvantagem do EC é a necessidade de extração orgânica antes da injeção da amostra. Assim como em nossos estudos com cérebro de pacu, os pesquisadores também observaram a presença de N-acetilserotonina endógena, necessitando da utilização de um branco.

Pelo cálculo da resolução da separação dos indóis observamos que a eficiência de separação ficou entre 0,7 e 2,1. De acordo com Mant e Hodges (20) resoluções maiores do que 0,6 são consideradas satisfatórias, indicando que nossa metodologia de separação tem eficiência comparável à de outras separações de indóis por HPLC.

Das 4 enzimas de metabolismo de serotonina estudadas

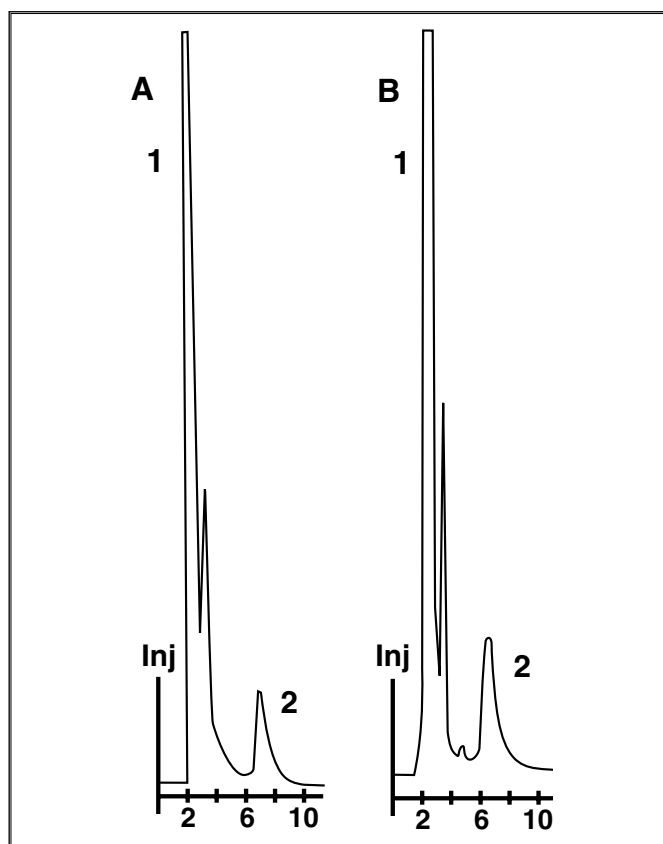


Figura 5. Cromatograma típico da separação de 5-HTP (pico 1) e de 5-HT (pico 2) determinados em (A) padrões e na (B) dosagem da AADC em fração solúvel de cérebro de pacu, após a padronização enzimática

em cérebro de pacu, em nosso trabalho, tanto a AADC (8-B) quanto a SNAT (8-D) sofreram alterações nas suas atividades depois da injeção de 20 mg/kg de peso corporal de metil-paration. TPH e MAO não sofreram efeitos significativos em suas atividades (Gráficos 8-A e 8-C).

Observamos um aumento de cerca de 35% na atividade da AADC cerebral de pacu 24 e 48 horas depois da injeção com 20 mg de metil-paration/kg de peso corporal. O paration é um organofosforado que aumenta os níveis circulantes de dopamina e noradrenalina (29). Recentemente foi mostrado que alguns compostos que afetam os receptores dopaminérgicos podem ocasionar mudanças na atividade de AADC. Em retinas de ratos, Hadjiconstantinou et al. (30) mostraram que um aumento da atividade de AADC foi mediado pela ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D_{11} , pois foi abolido com a utilização de antagonistas seletivos para estes receptores. Zhu et al. (31) mostraram que estas mudanças também ocorrem em cérebro de ratos. A regulação pelas catecolaminas deve estar associada à síntese de novo de proteínas, pois Hadjiconstantinou et al. (32) constataram que o aumento de atividade de AADC era abolido por cicloheximida, um inibidor de síntese protéica.

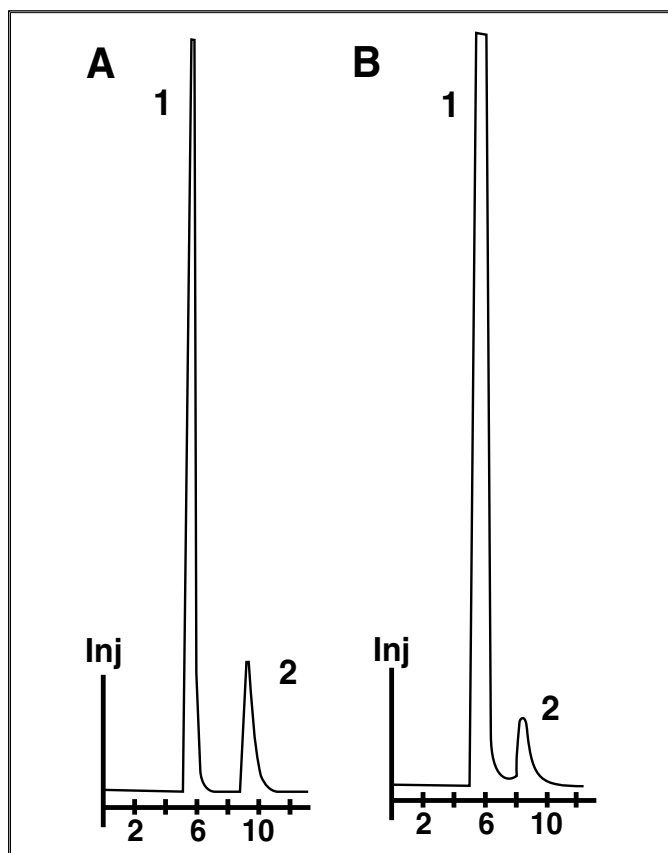


Figura 6. Cromatograma típico da separação de 5-HT (pico 1) e de 5-HIAA (pico 2) determinados em (A) padrões e na (B) dosagem da MAO em fração mitocondrial de cérebro de pacu, após a padronização enzimática

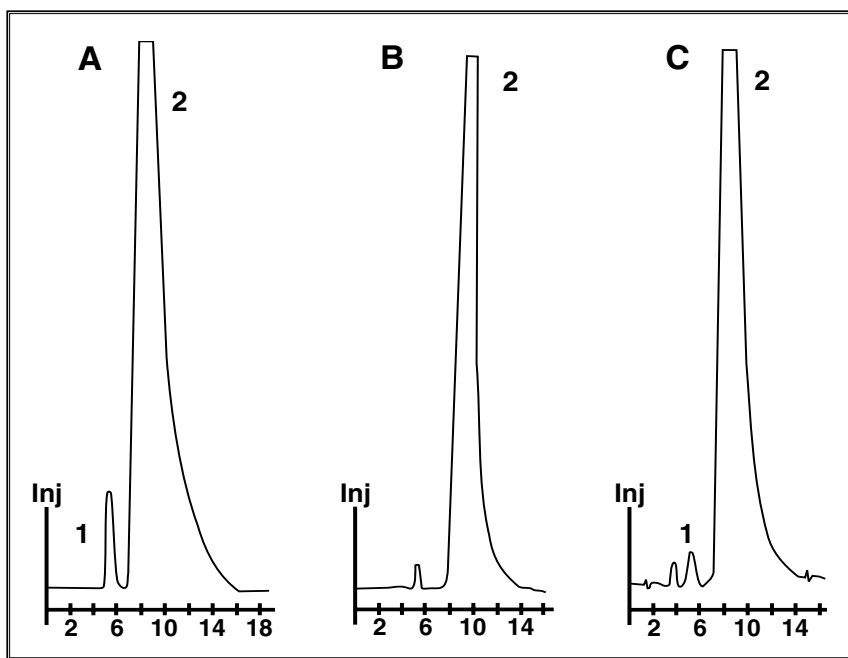


Figura 7. Cromatograma típico da separação de NAS (pico 1) e de 5-HT (pico 2) em (A) padrões e determinados na dosagem da SNAT em cérebro de pacu, após a padronização das melhores condições de dosagem. B representa o branco da reação e C representa o ensaio da reação.

Também Cho et al. (33), reportaram que o efeito da dopamina sobre a AADC ocorre pelo aumento dos níveis de RNA mensageiro e não diretamente sobre a atividade da enzima. Outra explicação para o envolvimento das catecolaminas no mecanismo regulador da AADC pode ser via proteínas quinases, através de reações de fosforilação e desfosforilação da molécula enzimática, como ocorre para a tirosina hidroxilase e, provavelmente, também para a triptofano hidroxilase (34). Nossos resultados em cérebro de pacu indicam que, provavelmente, o aumento dos níveis de dopamina devido à injeção de metil-paration podem estar influenciando a síntese de AADC, visto que não observamos efeito direto *in vitro* da dopamina sobre a atividade desta enzima.

Além do aumento da atividade de AADC, observamos inibição de 90% da atividade da SNAT cerebral de pacu, 48h depois do tratamento com paration. A causa mais provável deste efeito pode ter sido o aumento das catecolaminas circulantes. Em mamíferos, a SNAT é controlada pela liberação de noradrenalina de terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares. Depois da liberação pela fibra pós-ganglionar, a noradrenalina interage com receptores β -adrenérgicos na membrana dos pinealócitos. O resultado desta interação leva à síntese de novas moléculas de SNAT (29).

Sendo o principal centro produtor de melatonina, as células da pineal mostram diferenças funcionais quando comparamos os diferentes grupos de vertebrados. Em peixes, a síntese de melatonina ocorre em células fotorreceptoras que são estruturalmente e funcionalmente análogas aos fotorreceptores da retina. Durante a evolução, estas células foram gradualmente sendo trocadas por fotorreceptores modificados, encontrados em lagartos e aves, e por pinealócitos típicos, encontrados em cobras e mamíferos (35). Por causa desta variedade de tipos celulares, existem diferentes mecanismos que influenciam a produção da melatonina. O princípio geral é que o controle direto pela luz em pineais não-mamíferas vai sendo trocado por um controle químico indireto (36). Os dois controles, luminoso e químico, podem ser vistos para a pineal de galinha (37). Os estudos sobre os efeitos de agentes químicos sobre a atividade de SNAT foram durante muito tempo negligenciados por causa das características fotorreceptoras das células da pineal. Nos teleostes estudados até aqui, parece que o controle da atividade de SNAT é multifatorial, podendo ocorrer de maneira direta ou indireta pela luz e também pela presença de catecolaminas, da adenosina e de peptídeos (36).

Dentre as catecolaminas reguladoras da atividade de SNAT, as principais são a noradrenalina, a adrenalina e o dopa. Os dados da literatura trazem informações sobre receptores adrenérgicos presentes na pineal de duas espécies de peixes do hemisfério Norte: a truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) e o lúcio (*Esox lucius*). Fálcon e colaboradores observaram o efeito de vários agonistas catecolaminérgicos sobre a atividade de SNAT tanto na truta quanto no lúcio. Para truta não observaram qualquer efeito sob a atividade de SNAT. Para lúcio, foi demonstrado que a SNAT foi estimulada por noradrenalina e por agonistas α - e β -adrenérgicos. Para os agonistas dos receptores α_1 - e α_2 -adrenérgicos foi observado um efeito inibitório. Adrenalina, dopamina e agonistas dopaminérgicos não tiveram efeito sobre a atividade da SNAT das duas espécies de peixes estudadas.

É provável que dentro do grupo dos teléosteos, ocorra um processo evolucionário no qual o controle adrenérgico da atividade de SNAT possa ser progressivamente modificado para um controle luminoso, observado em alguns, mas não em todos os teleósteos. É interessante notar que na pineal de lúcio, as células da pineal possuem características de fotorreceptores modificados, semelhantes àqueles de répteis e aves, o que não ocorre na pineal da truta.

Apesar de nossos estudos terem sido realizados em cérebro, o efeito do metil-paration sobre a atividade de SNAT foi observado. Uma hipótese para a inibição da SNAT cerebral pode ter ocorrido devido à ativação de receptores α_2 -adrenérgicos, já que foi observado que estes receptores possuem um controle inibitório da atividade de SNAT (37). Além disso, a noradrenalina age de maneira antagonista em α - e β -adrenoceptores de teleósteos (36).

Não há nada descrito sobre receptores catecolaminérgicos em cérebro de peixes neotropicais, mas, tendo em vista nossos resultados, levantamos a hipótese de que a presença de paration em ambientes aquáticos possa provocar mudanças em pacu de vários de seus processos fisiológicos dependentes de serotonina e melatonina, como reprodução, migração, hierarquia social, locomoção, imunomodulação e alimentação.

Conclusão

Estabelecemos metodologias de separação por HPLC, com detecção fluorométrica dos indóis de cérebro de pacu para a dosagem das enzimas triptofano hidroxilase (TPH), aminoácido aromático descarboxilase (AADC), monoamino oxidase (MAO) e serotonina N-acetiltransferase (SNAT). Através do cálculo da resolução determinamos separações satisfatórias entre as misturas contendo as duplas de compostos Triptofano e 5-hidroxitriptofano, 5-hidroxitriptofano e serotonina, serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético e serotonina e N-acetilserotonina.

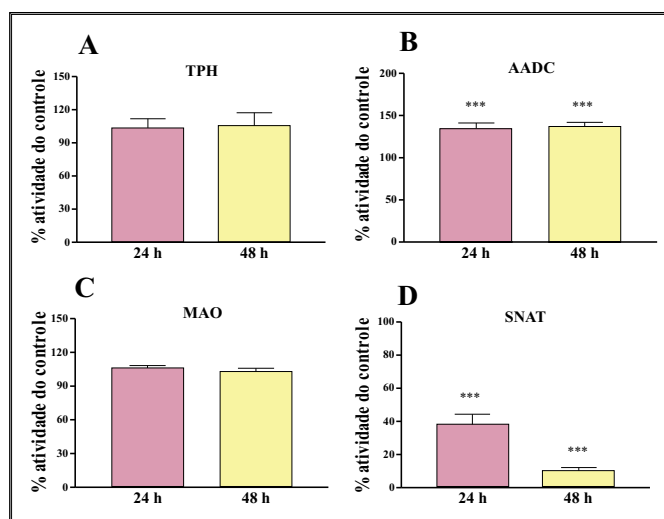


Figura 8. Efeito da inoculação de 20 mg de metil-paration/kg peso corporal sobre as atividades das enzimas do metabolismo de serotonina em cérebro de pacu

A- triptofano hidroxilase. B- aminoácido aromático descarboxilase C- monoamino oxidase D- serotonina N-acetiltransferase. No gráfico, cada barra representa a média \pm desvio padrão de 5 experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabela II. Atividades das enzimas de metabolismo de serotonina de cérebro de pacu em dosagens por HPLC com detecção fluorométrica

Enzima	Atividade ($\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg ptn}^{-1}$)
Triptofano hidroxilase	$5,67 \pm 0,33$
Aminoácido aromático descarboxilase	$92,31 \pm 5,57$
Monoamino oxidase	$610,0 \pm 20,0$
Serotonina N-acetiltransferase	$117,52 \pm 10,24$

Mostramos que pacus expostos ao pesticida metil-paration podem vir a sofrer alterações dos seus níveis cerebrais de serotonina e melatonina, já que duas enzimas envolvidas nas reações do metabolismo destas duas indolaminas tiveram sua atividade afetada 24h e 48h depois que metil-paration foi injetado nos peixes.

Agradecimentos

Agradecemos a Fazenda Morro Grande localizada em Cachoeiras de Macacu, RJ, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

Referências

- Vazzoler AEM. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: **Eduem**; São Paulo, SBI, 1996, 3-8.
- Kema IP, De Vries EG, Muskiet FA. J. *Clinical chemistry of serotonin and metabolites*. **J. Chromatogr.** 2000, 747B, 33-48.
- Hernández-Rauda R, Rozas G, Rey P, et al. *Changes in the pituitary metabolism of monoamines (dopamine, norepinephrine and serotonin) in female and male rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) during gonadal recrudescence*. **Physiol. Biochem. Zool.** 1999, 72, 352-359.
- Subhedhar N, Cerdá J, Calman BG, et al. *Changes in forebrain and pituitary dopamine and serotonin contents of female *Fundulus* during its biweekly reproductive cycle*. **Comp. Biochem. Physiol.** 1997, 118A, 577-584.
- Somoza GM, Peter RE. *Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish pituitary fragments*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 1991, 82, 103-110.
- Khan IA, Thomas P. *Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 1992, 88, 388-396.
- Mayer I, Bornstaf C, Borg B. *Melatonin in non-mammalian vertebrates: physiological role in reproduction?* **Comp. Biochem. Physiol.** 1997, 118A, 515-531.
- Fálcon J. *Cellular circadian clocks in the pineal*. **Prog. Neurobiol.** 1999, 58, 121-162.
- Carter DS, Goldman BD. *Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): Duration is the critical parameter*. **Endocrinology.** 1983, 113, 1261-1267.
- Amano M, Iigo M, Ikuta K, et al. *Roles of melatonin in gonadal maturation of underyearling precocious male masu salmon*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 2000, 120, 190-197.
- Khan IA, Thomas P. *Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 1996, 104, 231-242.
- Nagatsu T. *Application of high performance liquid chromatography to the study of biogenic amine-related enzymes*. **J. Chromatogr.** 1991, 566, 287-307.
- Anderson GM, Young JG, Batter DK, et al. *Determination of indoles and catechols in rat brain and pineal using liquid chromatography with fluorimetric and amperometric detection*. **J. Chromatogr.** 1986, 223, 315-320.
- Hamon M, Glowinski J. *Regulation of serotonin synthesis*. **Life Sci.** 1975, 15, 1533-1548.
- Kadlec MC, Benson WH. *Relationship of aquatic natural organic material characteristics to the toxicity of selected insecticides*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 1995, 31, 84-97.
- Casarett LJ, Doull J. **Toxicology. The Basic Science of Poisons**. MO Amdur, J Doull and CD Klaassen (Eds), 4^a ed. New York: Pergamon Press Inc. 1996.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. **Farmacologia**. 4^a ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001.
- Peterson GL. *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. **Anal. Biochem.** 1977, 83, 346-356.
- Friedman PA, Kappelman AH, Kaufman S. *Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain*. **J. Biol. Chem.** 1972, 247, 4165-4173.
- Mant CT, Hodges RS. *HPLC terminology: practical and theoretical*. In **High-performance liquid chromatography of peptides and proteins - Separation, analysis and conformation**. 1991, CRC Press Inc., USA, 69-94.
- Anderson GM, Young JG, Batter DK, et al. *Determination of indoles and catechols in rat brain and pineal using liquid chromatography with fluorimetric and amperometric detection*. **J. Chromatogr.** 1981, 223, 315-320.
- Flatmark T, Jacobsen SW, Haavik J. *Fluorimetric detection of tryptophan, 5-hydroxytryptophan and 5-hydroxytryptamine (serotonin) in high performance liquid chromatography*. **Anal. Biochem.**, 1980, 107, 71-74.
- Yamada J, Sugimoto Y, Horisaka K. *Simultaneous determination of tryptophan and its metabolites in mouse brain by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. **Anal. Biochem.** 1983, 129, 460-463.
- Moran GR, Fitzpatrick PF. *A continuous fluorescence assay for tryptophan hydroxylase*. **Anal. Biochem.** 1999, 266, 148-152.
- Lee Chin JR. *Determination of six indolic compounds, including melatonin, in rat pineal using high-performance liquid chromatography with serial fluorimetric-electrochemical detection*. **J. Chromatogr.** 1990, 528, 111-121.
- Wolf WA, Kuhn DM. *Simultaneous determination of 5-hydroxytryptamine, its amino acid precursors and acid metabolite in discrete brain regions by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. **J. Chromatogr.** 1983, 275, 1-9.
- Mannens G, Slegers G, Claeys A. *Assay for acetyl-CoA: arylamine N-acetyltransferase by high-performance liquid chromatography applied to serotonin N-acetylation*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1990, 1037, 1-6.
- Thomas KB, Zawilska J, Iuvone PM. *Arylalkylamine (serotonin) N-acetyltransferase assay using high-performance liquid chromatography with fluorescence or electrochemical detection of N-acetyltryptamine*. **Anal. Biochem.** 1990, 184, 228-234.
- Attia AM. *Possible involvement of beta-adrenergic receptors in the enhancement of nocturnal pineal N-acetyltransferase activity due to parathion administration*. **Toxicology.** 2000, 142, 79-86.
- Hadjiconstatinou M, Rossetti Z, Silvia C, et al. *Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the rat retina is modulated in vivo by environmental light*. **J. Neurochem.** 1988, 51, 1560-1564.
- Zhu MY, Juorio AV, Paterson IA, et al. *Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase by dopamine receptors in the rat brain*. **J. Neurochem.**, 1992, 58, 636-641.
- Hadjiconstatinou M, Wernlinger TA, Silvia C, et al. *Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the mouse striatum is modulated via dopamine receptors*. **J. Neurochem.** 1993, 60, 2175-2180.
- Cho S, Duchemin A, Neff NH, et al. *Tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine metabolism after chronic treatment with dopaminergic drugs*. **Brain Res.** 1999, 830, 237-245.
- Zhu MY, Juorio AV. *Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role*. **Gen. Pharmac.** 1995, 26, 681-696.
- Bolliet V, Ali MA, Lapointe FJ, et al. *Rhythmic melatonin secretion in different teleost species: an in vivo study*. **J. Comp. Physiol.** 1996, 165-B, 677-683.
- Fálcon J, Thibault C, Martin C, et al. *Regulation of melatonin production by catecholamines and adenosine in a photoreceptive pineal organ. An in vitro study in the pike and the trout*. **J. Pineal Res.** 1991, 11, 123-134.
- Voisin P, Collin JP. *Regulation of chicken pineal arylalkylamine N-acetyltransferase by postsynaptic α_2 -adrenoergic receptor*. **Life Sci.** 1986, 39, 2025-2032.