LIDIANA DUARTE DE ALMEIDA PAULA

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA E ANÁLOGOS SOBRE A
EXPRESSÃO DE COLINOCEPTORES NICOTÍNICOS EM
MIOTUBOS DE RATO EM CULTURA**

São Paulo

2008

LIDIANA DUARTE DE ALMEIDA PAULA

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA E ANÁLOGOS SOBRE A EXPRESSÃO DE
COLINOCEPTORES NICOTÍNICOS EM MIOTUBOS DE RATO EM CULTURA**

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

São Paulo

2008

LIDIANA DUARTE DE ALMEIDA PAULA

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA E ANÁLOGOS SOBRE A EXPRESSÃO DE
COLINOCEPTORES NICOTÍNICOS EM MIOTUBOS DE RATO EM CULTURA**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Regina Pekelmann
Markus

São Paulo

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lidiana Duarte de Almeida Paula.

Título da Tese: Influência da melatonina e análogos sobre a expressão de colinoceptores nicotínicos em miotubos de ratos em cultura.

Orientador(a): Regina Pekelmann Markus.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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: cap@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **028** nas fls. **3** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus, Coordenadora da Linha de Pesquisa: "**Cronofarmacologia**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Lidiana Duarte de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **20.04.2004**.

São Paulo, 26 de abril de 2004

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

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

DEDICATÓRIA

Ao meu querido marido **Stephen Fernandes de Paula Rodrigues** pelo amor, companheirismo e apoio em todos os momentos;

A minha amada filha **Júlia Duarte de Paula** pelos momentos de carinho e descontração;

A meus pais **Valdemiro G. Almeida Filho e Maria Mirtes Duarte Almeida** pelo exemplo de vida, amor, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos **Leiliane, Vladimir e Victor** pelo amor, carinho e incentivo;

OBRIGADA!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus pela valiosa orientação, que foi imprescindível; pela compreensão, apoio e paciência. Por seu papel não só de orientadora, mas de amiga, mestre e educadora.

AGRADECIMENTOS

A gratidão, virtude entre as virtudes, também frustra a quem a pratica, por ser impossível alcançar a todos a que a merecem. São tantos aqueles a quem neste momento devo ser grata que é impossível a todos nomear.

Assim, começo a agradecer a DEUS por ser o responsável por tudo isto ser possível.

E meus sinceros agradecimentos às pessoas cujo apoio e colaboração foram fundamentais para que eu pudesse concluir este trabalho:

À Profa. Dra. Zulma Ferreira pelas sugestões, críticas construtivas e atenção dispensada.

À profa. Dra. Rosely Godinho pela valiosa contribuição para a realização de técnicas relacionadas ao presente trabalho.

Aos colegas do laboratório de Cronofarmacologia: Daiane, Érica, Gerlândia, Livinstone, Mara, Pedro, pela amizade, colaboração e agradável convivência.

Ao Eduardo pela ajuda na leitura e correção desta tese.

À Amanda pela colaboração na execução de alguns experimentos.

Aos colegas que já saíram do laboratório, mas que são muito queridos: Celina, Daniel, Juliana, Jussara, Lívia.

À Débora, Roberta, Marcelo e Jéssica, técnicos do laboratório, pela ajuda na preparação das culturas.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Farmacologia, Julieta G. dos Santos e Selma Regina Rigonati, pelo auxílio nos assuntos administrativos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas, que possibilitaram a realização de mais esse trabalho de pós-graduação.

À Fapesp, instituição responsável pelo apoio financeiro ao projeto e pela concessão da bolsa, que garantiram o cumprimento dos objetivos propostos nessa tese.

OBRIGADA!

RESUMO

ALMEIDA-PAULA, L. D. **Influência da melatonina e análogos sobre a expressão de colinoceptores nicotínicos em miotubos de rato em cultura.** 2008. 109 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Melatonina, hormônio liberado no período de escuro pela glândula pineal, tem uma ação pleiotrópica podendo atuar por diferentes mecanismos: ativação de receptores de membrana e ações intracelulares. Melatonina é capaz de modular a reatividade e o número de colinoceptores nicotínicos em diferentes modelos biológicos (ducto deferente, cerebelo e retina). A ação da melatonina sobre os colinoceptores nicotínicos é específica para cada modelo e interfere apenas com receptores sensíveis à α -bungarotoxina e, em todos os casos, em doses compatíveis com a concentração plasmática noturna de melatonina. O objetivo deste estudo foi caracterizar a influência da melatonina sobre a atividade de colinoceptores nicotínicos em miotubos de rato em cultura e determinar seu mecanismo de ação. Neste modelo verificamos que a melatonina reduz a densidade de sítios de ligação para α -bungarotoxina e também a produção de AMP cíclico induzida por forskolina, adenosina e CGRP, mas não por isoprenalina. Estes efeitos foram mimetizados por N-acetilserotonina e 4-P-PDOT, mas não por 2-iodomelatonina e 5-MCA-NAT, e foram bloqueados por luzindol. A redução da produção de AMP cíclico não foi inibida por toxina pertussis. O calmidazolium bloqueia tanto a redução da densidade dos colinoceptores nicotínicos quanto à inibição da produção de AMP cíclico. Avaliando a via da guanilil ciclase determinamos que melatonina e calmidazolium inibem a produção de GMP cíclico induzida por KCl. Portanto, podemos concluir que a melatonina não está atuando via receptores de membrana mas, provavelmente, está atuando internamente bloqueando a enzima calmodulina.

Palavras-chave: Melatonina. Colinoceptores nicotínicos. α -Bungarotoxina. Miotubos em cultura. AMP cíclico. Calmodulina.

ABSTRACT

ALMEIDA-PAULA, L. D. **Influence of melatonin and analogues on the nicotinic-colinoceptors expression in myotube culture from rats.** 2008. 109 p. Doctoral thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Melatonin, hormone released during the dark phase of the day by the pineal gland, has a pleiotropic action exerting its effects by different mechanisms as activation of membrane receptors and intracellular actions. Melatonin is able to modulate the reactivity and number of nicotinic colinoceptors in different biologic models (deferens duct, cerebellum and chick retin). The melatonin action on the nicotinic colinoceptors is unique to each experimental model and only interferes with sensitive receptors to α -bungarotoxin and, in all cases, in doses compatible to nocturnal concentration of melatonin. We intended to characterize the melatonin influence on the nicotinic-colinoceptors activity in myotube culture from rat and to determine its action mechanism. In this model we demonstrated that melatonin decreases the binding-sites density to α -bungarotoxin and also the cyclic AMP synthesis induced by forskolin, adenosine and CGRP, but not by isoprenaline. These effects were mimetized by N-acetylserotonin and 4-P-PDOT, but not by 2-iodomelatonin and 5-MCA-NAT, and were blocked by luzindol. Reduction of the cyclic AMP synthesis was not inhibited by pertussis toxin. Calmidazolium, calmodulin antagonist, blocked both the reduction of nicotinic colinoceptors density and the inhibition of AMP cyclic synthesis. After evaluate the guanylyl cyclase via, we determined that melatonin and calmidazolium inhibit the cyclic GMP synthesis induced by KCl. Then we concluded that melatonin does not act via membrane receptors, but probably, acts blocking the calmodulin enzyme.

Key words: Melatonin. Nicotinic Colinoceptors. α -Bungarotoxin. Myotube culture. Cyclic AMP. Calmodulin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Circuito de ativação da produção de melatonina pela Glândula pineal.....	22
Figura 2: Representação da via biossintética da melatonina.....	24
Figura 3: Miogênese.....	40
Figura 4: Dia 1 da cultura.....	47
Figura 5: Dia 3 da cultura.....	48
Figura 6: Dia 5 da cultura.....	48
Figura 7: Curva de saturação média para [125 I] α -bungarotoxina.....	55
Figura 8: Efeito da melatonina sobre a ligação de 2 nM de [125 I] α -bungarotoxina.....	57
Figura 9: Efeito da melatonina e da N-acetilserotonina sobre a ligação de 2 nM de [125 I] α -bungarotoxina.....	58
Figura 10: Efeito do 4-P-PDOT sobre a ligação de 2 nM de [125 I] α -bungarotoxina.....	60
Figura 11: Efeito do antagonista luzindol sobre a ligação de 2 nM de [125 I] α -bungarotoxina.....	61
Figura 12: Efeito da melatonina(MEL), N-acetilserotonina (NAS) e 4-P-PDOT na produção de AMP cíclico induzida por forskolina.....	62
Figura 13: Efeito do antagonista luzindol sobre a capacidade da melatonina de reduzir a produção de AMP cíclico.....	62
Figura 14: Efeito do antagonista luzindol sobre a capacidade da melatonina em reduzir a produção de AMP cíclico induzida por adenosina.....	64

Figura 15: Efeito da melatonina sobre a produção de AMP cíclico induzida por isoprenalina.....	65
Figura 16: Efeito da melatonina sobre a produção de AMP cíclico induzida por CGRP.....	66
Figura 17: Efeito da melatonina na produção de AMP cíclico induzida por forskolina na presença ou ausência da toxina pertussis.....	67
Figura 18: Análise da expressão do RNAm de receptores MT₁ e MT₂ em miotubos de rato (colunas 3 e 5) e glândula pineal (colunas 2 e 4), respectivamente.....	68
Figura 19: Efeito do calmidazolium na produção de AMP cíclico e no número de sítios de ligação para α-bungarotoxina.....	69
Figura 20: Efeito da melatonina (mel, 1 nM) e calmidazolium (cdz, 50 μM) na produção de GMP cíclico induzida por KCl (30 mM) (A), ou nitroprussiato de sódio (SNP, 30 μM) (B).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da 2-Iodomelatonina e 5 MCA-NAT sobre o número de colinoceptores nicotínicos.....59

Tabela 2: Efeito da 2-Iodomelatonina e 5 MCA-NAT sobre a estimulação direta da adenilil ciclase por forskolina.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA – ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT – 5-hidroxitriptamina
5-HTP – 5-hidroxitriptofano
AA-NAT – arilalquilamina N-acetiltransferase
AC – adenilil ciclase
sAC – adenilil ciclase solúvel
AChE – acetilcolinesterase
AMP – monofosfato de adenosina cíclico
ARA-C – citosina arabinose
ARIA – proteína indutora de atividade em receptor de acetilcolina
ATP – trifosfato de adenosina
Bmax – ligação máxima
BCP – 1-bromo-3-cloropropano
cDNA – DNA complementar
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DEPC – dietilpirocarbonato
DMEM – meio essencial de Dulbecco modificado
DMSO – dimetilsulfóxido
dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfato
EIA – enzimaímunoensaio
EPM – erro padrão da média
FRM – fator regulatório da miogênese
GCS – gânglio cervical superior
GDP – difosfato de guanosina
Gs – proteína G estimulatória
GTP – trifosfato de guanosina
HBSS – solução de Hank's
HIOMT – hidroxí-indol-O-metiltransferase
IBMX – isobutilmetilxantina
IL-2 – interleucina -2
IML – intermediolateral
IUPHAR – União Internacional de Farmacologia

JNM – junção neuromuscular
KCl – cloreto de potássio
Kd – constante de dissociação
5-MCA-NAT – 5-metoxycarbonilamino-N-acetil-triptamina
MT₁ – receptor de melatonina do subtipo 1
MT₂ – receptor de melatonina do subtipo 2
MT₃ – receptor de melatonina do subtipo 3
MuSK – tirosina quinase específica para colinoceptor muscular
NAS – N-acetilserotonina
NAT – arilalquilamina-N-acetiltransferase
NMDA – N-metil-D-aspartato
NSQ – núcleo supraquiasmático
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NPV – núcleo paraventricular
PKA – proteína quinase dependente de AMP cíclico
PKC – proteína quinase dependente de cálcio
4-P-PDOT – 4-fenil-2 propiono-amidotetralina
Proteína G – proteína ligante de nucleotídeos de guanina
PTX – toxina pertussis
QR2 – quinona redutase II
ROR – receptor órfão para retinóide
ROR α – receptor órfão para retinóide α
ROR γ – receptor órfão para retinóide γ
RT – transcrição reversa
RZR β – receptor Z para retinóide β
RZR – receptor Z para retinóides
SE – soro eqüino
SFB – soro fetal bovino
SNP – nitroprussiato de sódio
SOD – superóxido dismutase
TPH1 – triptofano hidroxilase 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Melatonina – hormônio temporizador do organismo	20
1.2 Mecanismos de ação da melatonina	25
1.3 Colinoceptores nicotínicos	30
1.4 Regulação de colinoceptores nicotínicos pela adenilil ciclase e guanilil ciclase	35
1.5 Melatonina e colinoceptores nicotínicos	37
1.6 Miotubos de rato em cultura como modelo para o estudo de colinoceptores nicotínicos	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Animais	43
2.2 Drogas e reagentes	43
2.3 Soluções	44
2.4 Preparo das drogas	45
2.5 Cultura primária de células musculares	46
2.6 Desenvolvimento e diferenciação do músculo esquelético de rato em cultura	47
2.7 Determinação do conteúdo protéico	49
2.8 Ensaio com ligante radiativo - [¹²⁵ I] α-bungarotoxina	49
2.9 Dosagem de AMP cíclico	50
2.10 Extração do RNA total e reação de transcrição reversa	51
2.11 Reação de polimerase em cadeia	51
2.12 Clonagem e seqüenciamento dos produtos do PCR	52
2.13 Dosagem de GMP cíclico	52
2.14 Análise de dados	53
3 RESULTADOS	55
3.1 Curva de saturação	55
3.2 Decurso temporal	56
3.3 Efeito de análogos de melatonina sobre o número de colinoceptores nicotínicos	58
3.4 Efeito da melatonina e análogos sobre a estimulação direta da adenilil ciclase por forskolina	61

3.5 Efeito da melatonina sobre a produção de AMP cíclico via estimulação de receptores acoplados à proteína G_s	63
3.6 Efeito da toxina pertussis sobre a redução da produção de AMP cíclico induzida por melatonina.....	66
3.7 Determinação do RNAm para receptores MT_1 e MT_2	67
3.8 Efeito do inibidor de calmodulina sobre a redução do número de colinoceptores nicotínicos e inibição da produção de AMP cíclico induzida por forskolina.....	68
3.9 Efeito da melatonina e do inibidor de calmodulina na produção de GMP cíclico.....	70
4 DISCUSSÃO.....	72
5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO.....	102

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melatonina – hormônio temporizador do organismo

A glândula pineal e seu principal hormônio, melatonina, desempenham um importante papel na sincronização dos ritmos endógenos do organismo. A síntese deste hormônio é dependente da iluminação ambiental, e a melatonina tem uma ação pleiotrópica que visa sincronizar os diferentes órgãos e funções de um organismo multicelular ao ciclo claro-escuro ambiental (CASSONE, 1990).

A glândula pineal foi descrita pela primeira vez há mais de dois mil anos por Herófilo, um anatomista da Universidade de Alexandria que sugeriu ser esta glândula, localizada próximo ao sistema ventricular cerebral, um esfíncter que regula o fluxo do pensamento. Galeno, 450 anos depois, mostrou que a pineal era formada por um tecido diferente do cérebro e Descartes, no século XVII, sugeriu ser a pineal o “centro da alma”. Em 1880 Ahlborn, de Graaf e outros descreveram as propriedades macro-anatômicas, histológicas e embriológicas e mostraram a semelhança com o “terceiro olho” ou o órgão epifiseal fotossensível de aves (TAMARKIN et al., 1985). O nome pineal foi originado do latim *pineale*, significando cone de pinho, forma que este órgão adquire em alguns animais. A pineal de mamíferos não é fotossensível, ao contrário do que ocorre em aves e répteis, no entanto, sua função é traduzir as informações luminosas ambientais para o organismo. No caso em que as pineais são fotossensíveis, a informação luminosa é captada por receptores de membrana, da mesma forma que ocorre na retina, e traduzida em um sinal hormonal, isto é, a produção noturna de melatonina. Quando a pineal não é fotossensível esta também é capaz de informar ao organismo as condições de iluminação ambiental, fazendo a tradução de um sinal de entrada neural que tem origem na retina e finaliza na glândula pineal. Nos dois casos o hormônio sinalizador é a melatonina (REITER, 1993). O nome melatonina decorre da propriedade que tem este hormônio em clarear a pele de girinos por agregar grânulos de melanina presentes nos melanócitos de anfíbios (LERNER et al., 1958).

A informação fótica é captada pelas células ganglionares da retina que possuem uma opsina denominada melanopsina (PROVENCIO et al., 2000). A via neural que se inicia nas células ganglionares da retina projeta-se para o hipotálamo,

e não para o córtex cerebral, sendo desta forma responsável pela regulação dos ritmos biológicos, e não pela visão. Fibras retinohipotalâmicas projetam-se para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) e estes têm comunicação anatômica com a área retroquiasmática do hipotálamo (núcleo paraventricular, NPV) que, por sua vez, faz conexão com a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal de onde partem fibras pré-ganglionares que inervam o gânglio cervical superior (GCS) simpático (KLEIN; MOORE, 1979; MOORE, 1982). A partir deste gânglio saem fibras simpáticas que inervam a glândula pineal (Figura 1). Na fase de claro os neurônios estão quiescentes e na fase de escuro ocorre ativação da neurotransmissão e liberação de noradrenalina (KLEIN et al., 1983). A estimulação dos terminais simpáticos que inervam os pinealócitos leva à liberação de noradrenalina e trifosfato de adenosina (ATP) (MORTANI et al., 2000). Noradrenalina atua através de adrenoceptores β_1 e α_1 (KLEIN et al., 1983), enquanto ATP age via receptores P2Y1 (FERREIRA et al., 1994; FERREIRA; MARKUS, 2001). A estimulação dos adrenoceptores β_1 resulta na ativação da via de transdução mediada por adenilil ciclase (AC) – monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) – proteína quinase A (PKA), enquanto a estimulação dos adrenoceptores α_1 e os receptores de purinas P2Y1 promovem o aumento da concentração de cálcio intracelular e ativação da via da proteína quinase C (PKC) (FERREIRA et al., 2003; KLEIN et al., 1983). A ativação dos adrenoceptores β_1 é essencial para a síntese noturna de melatonina, enquanto a ativação dos adrenoceptores α_1 e receptores de purinas P2Y1 promove uma potenciação da produção de melatonina induzida por ativação dos adrenoceptores β_1 (FERREIRA et al., 1994; TZAVARA et al., 1996; VANECEK et al., 1985).

Figura 1: Circuito de ativação da produção de melatonina pela glândula pineal. A informação fótica chega a pineal via um circuito polissináptico que se inicia na retina. Fibras retinohipotalâmicas projetam-se para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) e estes têm conexão anatômica com a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal de onde partem fibras pré-ganglionares que inervam o gânglio cervical superior (GCS) simpático. A partir deste gânglio saem fibras simpáticas que inervam a glândula pineal. Adaptado de Schultz; Kay, 2003.

Os núcleos supraquiasmáticos possuem um ritmo endógeno de aproximadamente 24 horas, que pode ser sincronizado pela luz e pela melatonina (MOORE, 1982), e continuam ciclando mesmo quando isolados neuralmente do resto do cérebro (INOUE; KAWAMURA, 1979) ou in vitro em preparações de fatias de hipotálamo (GREEN; GILLETTE, 1982; GROOS; HENDRIKS, 1982; SHIBATA et al., 1982). Estas propriedades rítmicas conferem aos mesmos a função de relógio biológico. Este relógio é passível de ajuste através de, pelo menos, dois processos: o fotoperiodismo ambiental (MOORE; KLEIN, 1974) e a melatonina (CASSONE et al., 1986).

Relógios endógenos são encontrados em praticamente todos os seres vivos, desde cianobactérias, fungos, vegetais, animais invertebrados e vertebrados. Com a descoberta das bases moleculares do funcionamento dos relógios endógenos percebeu-se que existe um mecanismo geral presente em todos os organismos. Em roedores, este mecanismo consiste em fatores de transcrição que atuam positivamente sobre os genes do relógio, levando à síntese de proteínas que irão atuar negativamente sobre os fatores de transcrição, inibindo a transcrição de seus próprios genes (REPPERT; WEAVER, 2002).

A síntese de melatonina ocorre através de uma via bioquímica que se inicia com o aminoácido triptofano, este é hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1) para 5-hidroxitriptofano (5-HTP) que, por sua vez, é descarboxilado pela enzima 5-hidroxitriptofano-decarboxilase para 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina) que é acetilada a N-acetilserotonina (NAS) pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (EC 2.3.1.87, NAT). Posteriormente, a N-acetilserotonina serve de substrato para a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) dando como produto a melatonina (WURTMAN; AXELROD, 1968) (Figura 2).

Além da pineal, a melatonina também pode ser sintetizada em outros tecidos como um hormônio de ação local tais como: estômago de ratos (BUBENIK et al., 1992), linfócitos humanos (CARRILLO-VICO et al., 2004), macrófagos de ratos (MARTINS JR et al., 2004) e fagócitos de colostro humano (PONTES et al., 2006). A produção extra-pineal pode fazer parte de processos fisiológicos, como ocorre em células do trato gastro-intestinal, ou ocorrer apenas quando há necessidade de uma produção de grande concentração local, como ocorre em respostas inflamatórias agudas (MARKUS et al., 2007).

Figura 2: Representação da via biossintética da melatonina. O 5-hidroxitriptofano é formado sob a ação da triptofano hidroxilase 1 (TPH1). O 5-hidroxitriptofano é oxidado a serotonina (5-HT) pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTP descarboxilase). A serotonina é acetilada pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Em seguida, a N-acetilserotonina é metilada pela enzima hidroxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT) formando a melatonina. Adaptado de Reiter et al., 2000.

1.2 Mecanismos de ação da melatonina

A melatonina é uma molécula anfipática (COSTA et al., 1995; SHIDA et al., 1994) e pode penetrar todas as membranas biológicas, incluindo a placenta (OKATANI et al., 1998) e a barreira hemato-encefálica (MENEDEZ-PELAEZ et al., 1993). Devido a essa propriedade a melatonina pode atuar não só sobre receptores de membrana, como modificar diretamente reações que ocorrem no interior das células.

Os primeiros experimentos que tentaram demonstrar a presença de receptores de membrana para melatonina usaram como ligante a [³H] melatonina e sugeriram ligação específica da melatonina em tecido cerebral (CARDINALI et al., 1979) e periférico (COHEN et al., 1978). Porém, a baixa especificidade do ligante radiativo não permitiu uma correlação entre ações fisiológicas e a interação molecular. A partir da síntese da 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina (VAKKURI et al., 1984), que é um ligante de alta especificidade, foram descritos dois sítios de alta afinidade de ligação para melatonina, denominados de ML₁ e ML₂ (DUBOCOVICH, 1988, 1995).

Até o momento foram clonados três subtipos do receptor ML₁ (Mel_{1a}, Mel_{1b} e Mel_{1c}), estes são receptores de sete domínios transmembrânicos com alta afinidade para melatonina. O receptor Mel_{1a} e Mel_{1b}, clonados a partir de mamíferos, foram renomeados para MT₁ e MT₂, respectivamente (REPPERT et al., 1994, 1995). O receptor Mel_{1c}, que foi clonado em *Xenopus laevis*, e não é encontrado em mamíferos, manteve a mesma nomenclatura, visto que a União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) apenas classifica receptores presentes em mamíferos (REPPERT et al., 1996).

Os receptores MT₁ e MT₂ apresentam 60% de homologia na seqüência de aminoácidos (REPPERT et al., 1995) e um perfil farmacológico semelhante, tendo alta afinidade (pM) para melatonina e 2-iodomelatonina, apresentando a seguinte ordem de potência: 2-iodomelatonina > melatonina >> N-acetilserotonina >> serotonina (DUBOCOVICH, 1995). Estes podem ser distinguidos farmacologicamente através do análogo 4-P-PDOT (4-fenil-2 propiono-amidotetralina) (DUBOCOVICH et al., 1997) que foi inicialmente sugerido como antagonista competitivo do receptor MT₂ (DUBOCOVICH, 1995; HUNT et al., 2001) e

posteriormente foi caracterizado como um agonista parcial em ensaios de ligação em fibroblastos de camundongos NIH3T3 (NONNO et al., 1999) e no ensaio de rolamento e adesão de leucócitos sobre o endotélio de ratos (LOTUFO et al., 2001).

Um antagonista de melatonina muito utilizado e conhecido na literatura é o luzindol. Este análogo liga-se aos receptores MT_1 e MT_2 , porém, em linhagens celulares de ovários de hamster chinês (CHO-K1) transfectadas com o receptor MT_1 e MT_2 a potência do luzindol para deslocar a ligação da 2-[125 I]-melatonina do receptor MT_2 ($K_i = 7,3$ nM) foi cerca de 15 vezes maior do que para o receptor MT_1 ($K_i = 180$ nM) (DUBOCOVICH et al., 1998).

Os subtipos de receptores MT_1 e MT_2 foram inicialmente caracterizados como receptores acoplados a proteína G_i , uma vez que a estimulação por melatonina inibe o aumento de AMP cíclico induzido por forskolina, um ativador da enzima AC (ROKA et al., 1999). Posteriormente, foi sugerido que o subtipo MT_1 pudesse acoplar tanto a proteína G_i quanto a G_q (BRYDON et al., 1999). Estes estudos foram feitos em células HEK 293 transfectadas com cDNA para receptor de melatonina MT_1 , nas quais observou-se que a estimulação com melatonina promovia aumento de cálcio e redução da quantidade de AMP cíclico formado por estimulação com forskolina e co-precipitação do receptor com as duas isoformas de proteína G.

O receptor de melatonina do subtipo MT_2 apresenta um perfil farmacológico diferente daquele observado para MT_1 e MT_2 , e passou a ser chamado de receptor MT_3 . Segundo o comitê de nomenclatura IUPHAR este receptor ainda é grafado em letras itálicas por não ter sido clonado (DUBOCOVICH et al., 2000). Este receptor apresenta a seguinte relação de potência: 2-iodomelatonina > 6-cloromelatonina > prazosin = N-acetilserotonina = melatonina. O análogo 5-MCA-NAT (5-metoxycarbonilamino-N-acetil-triptamina) liga-se seletivamente aos sítios MT_3 em rins, testículos e cérebro de hamster (DUBOCOVICH, 1995). Através de purificação por afinidade utilizando-se um derivado do 5-MCA-NAT, foi sugerido que o sítio MT_3 é uma enzima, quinona redutase II (QR2, EC 1.6.99.2), e não um receptor acoplado à proteína G. No mesmo estudo foi demonstrada a existência de uma correlação entre a ligação de agonistas ao sítio MT_3 e a inibição de QR2 humana expressa em células de ovário de hamster, pelos mesmos agonistas. O tecido que apresenta maior discrepância é o músculo esquelético, onde o sinal MT_3 confunde-se com o basal e a atividade enzimática é extremamente alta. Portanto, ainda está sendo

estudada a característica bioquímica deste sítio de ligação (NOSJEAN et al., 2000, 2001).

Na sinalização via receptores acoplados à proteína heterotrimérica ligadora de nucleotídeos de guanina (proteína G), a estimulação dos receptores de sete domínios transmembrânicos por agonistas leva a uma mudança conformacional que resulta na diminuição da afinidade da subunidade α pelo difosfato de guanosina (GDP), o qual é substituído pelo trifosfato de guanosina (GTP). Tanto a subunidade α quanto à subunidade $\beta\gamma$ ativam efetadores, podendo gerar segundos mensageiros via AC ou fosfolipase C. A resposta é finalizada pela subunidade $G\alpha$, que é capaz de hidrolisar o GTP a GDP, restabelecendo o complexo inativo GDP- $G\alpha\beta\gamma$ (JAHANGEER; RODBELL, 1993; MCCUDDEN et al., 2005). Sabe-se que a subunidade $\beta\gamma$ proveniente de proteína G_i é capaz de ativar fosfolipase C, levando a um aumento de cálcio e de diacilglicerol (NEER, 1995). Assim sendo, a melatonina, atuando em um mesmo receptor, poderia ativar simultaneamente as duas vias de segundo mensageiros: a subunidade α_i levaria a uma redução da produção de AMP cíclico e a subunidade $\beta\gamma$ ativaria a fosfolipase C.

Além de atuar através de receptores de membrana, a melatonina se liga com alta afinidade ($K_d = 180$ pM) a calmodulina, atuando como um potente antagonista tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BENITEZ-KING; ANTON TAY, 1993; BENITEZ-KING et al., 1993). A primeira evidência da interação entre a calmodulina e a melatonina em células foi sugerida através de ensaios com linhagens celulares (MDCK e N1E-115), onde foi observado que a adição de melatonina (1 nM) nas células provocava uma diminuição da atividade de uma isoforma da enzima fosfodiesterase dependente de calmodulina (BENITEZ-KING et al., 1991). Além disso, estudos funcionais mostraram um antagonismo entre melatonina e calmodulina em ensaios de crescimento de neuritos e polimerização de microtúbulos (HUERTO-DELGADILLO et al., 1994) e na ativação da enzima calmodulina–quinase II, tanto por inibir a ativação da calmodulina quanto por inibir a autofosforilação da própria enzima (BENITEZ-KING et al., 1996). Por outro lado, melatonina e quinureninas, metabólitos da oxidação da melatonina, são capazes de inibir a óxido nítrico sintase (NOS) em neurônios estriatais (LEON et al., 2000) e em

cerebelo de ratos (POZO et al., 1997), fenômenos estes que foram considerados pelos autores como dependentes da inibição da calmodulina por melatonina. A ligação de [¹²⁵I] melatonina ao núcleo de algumas células, tais como: timo e baço (RAFFI-EL-IDRISSI et al., 1998), células T Jurkat (GUERRERO et al., 2000) e células mononucleares do sangue periférico (GARCIA-MAURINO et al., 1998), sugere que esta indolamina lipossolúvel possa ter um receptor nuclear. Foi inicialmente proposto que este(s) fosse(m) receptor(es) órfão(s) da subfamília dos receptores Z para retinóides (RZR) ou receptores órfãos para retinóides (ROR) (BECKER-ANDRE et al., 1994). Já foram determinados 3 subtipos de receptores (ROR α , RZR β , ROR γ) que são derivados de genes distintos (SMIRNOV, 2001). A expressão destes receptores apresenta especificidade tecidual, sendo alta a expressão de ROR α em linfócitos e neutrófilos, apesar de serem mais fracamente expressos em muitos outros tecidos (BECKER-ANDRE et al., 1993). Interessante notar que o subtipo RZR β é expresso apenas na retina e no cérebro, especialmente em áreas envolvidas na ritmicidade circadiana (núcleos supraquiasmáticos e pineal) (BECKER-ANDRE et al., 1994).

Os achados iniciais destes receptores foram altamente contestados, contudo, alguns autores, utilizando ligantes farmacológicos ditos seletivos para os receptores retinóides, propõem que os mesmos possam ser um sítio de ligação de alta afinidade para a melatonina (GARCIA-MAURINO et al., 1998; GUERRERO et al., 2000). Já foram também propostas ações funcionais resultantes da ativação destes receptores, tais como: indução de interleucina-2 (IL-2) em leucócitos (GARCIA-MAURINO et al., 1997, 1998; GUERRERO et al., 2000) e redução da expressão do gene para 5-lipoxigenase em linfócitos B (STEINHILBER et al., 1995).

Em altas concentrações (μ M – mM) o efeito antioxidante da melatonina pode ser devido a uma ação direta como um “scavenger” ou a uma ação indireta aumentando a quantidade ou atividade de enzimas antioxidantes. Um dos efeitos mais conhecidos e bem estudados de altas concentrações de melatonina é a capacidade de atuar como antioxidante (REITER et al., 2002; BILICI et al., 2002; ZHANG et al., 2004). A melatonina, em altas concentrações, atua como “scavenger” de radicais livres (POEGGELER et al., 2002), como demonstrado por ensaios *in vitro*, através da formação de 3-hidroximelatonina, que resulta da ligação direta, independente de ação enzimática, de radicais hidroxila com a melatonina (TAN et

al., 1998). O fato de 3-hidroxi-melatonina ser um dos metabólitos do hormônio da pineal na urina de humanos levou Tan et al. (1998) a concluir que este processo ocorreria também *in vivo*. Os radicais livres incluem o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), o ânion superóxido (dióxido ou $\text{O}_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO) que são gerados a partir do O_2 . Possuem alta reatividade, o que leva à oxidação de moléculas estruturais e essenciais para a atividade celular. Portanto, o aumento da concentração destes radicais, que são gerados como sub-produto de diferentes reações químicas, causa disfunção ou mesmo morte celular.

Por sua vez, a melatonina pode atuar indiretamente como um poderoso agente antioxidante através do aumento da atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase. A SOD é responsável por converter o $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que apesar de ser uma molécula tóxica para a célula, na presença do ferro (Fe^{2+}), por exemplo, forma o radical $\bullet\text{OH}$. Outra importante molécula antioxidante é a glutathione peroxidase, que converte o H_2O_2 em duas moléculas de H_2O . O H_2O_2 também pode ser convertido em H_2O e O_2 (RODRIGUEZ et al., 2004).

A melatonina exógena aumenta a atividade de moléculas antioxidantes tais como a SOD em diversos tecidos (fígado, rins e cérebro de ratos) e também a atividade da enzima catalase em rins e cérebro de ratos (LIU; NG, 2000). Uma das questões importantes do momento é demonstrar que melatonina pode ser produzida endogenamente em grandes concentrações no próprio local de lesão (MARKUS et al., 2007).

Sabe-se que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas e a eficácia da melatonina na inibição desse estresse foi estudada em doenças cuja patogênese está associada à atividade citotóxica de radicais livres, tais como doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (OLAKOWSKA et al., 2005). Kerman et al. (2005) mostraram que a melatonina protege contra os danos oxidativos induzidos por radicais livres em tecido cerebral de coelhos, através do aumento de enzimas antioxidantes e, particularmente, através da redução dos níveis de peroxidação lipídica. Resultados semelhantes foram observados por Akcay et al. (2005) em modelo experimental de injúria neuronal induzida por ácido caínico, através do estresse oxidativo e liberação de óxido nítrico (NO) em cérebro de ratos. É importante ressaltar que a concentração necessária para o efeito antioxidante da melatonina nestes casos está, em geral, na

faixa de mM, enquanto nos tecidos in vivo, a faixa é de nM (MENEDEZ-PELAEZ et al., 1993).

1.3 Colinoceptores nicotínicos

Os receptores nicotínicos de acetilcolina, pentâmeros compostos por cinco subunidades protéicas, pertencem à superfamília dos canais iônicos ativados por ligantes, onde o elemento de transdução de sinal é um complexo composto por subunidades protéicas que incluem um domínio de ligação do neurotransmissor, exposto ao ambiente extracelular, e um canal iônico que transpõe a membrana. Estes receptores estão envolvidos em comunicações elétricas rápidas, convertendo o sinal químico liberado pelo terminal nervoso em um sinal elétrico inibitório ou excitatório. Os colinoceptores nicotínicos podem ser divididos em dois grandes grupos: os musculares e os neuronais (HOGG et al., 2003).

Os primeiros estudos de caracterização de receptores nicotínicos no sistema nervoso central foram feitos por ensaios de ligação com radioligantes em várias regiões do encéfalo. Com base na ligação de I-[³H]-nicotina e [¹²⁵I] α -bungarotoxina demonstraram-se a presença de duas populações distintas de receptores nicotínicos: uma população que se liga a I-[³H]-nicotina com alta e outra com baixa afinidade (LINDSTROM, 1996; LIPPIELLO; FERNANDES, 1986). Essa população de baixa afinidade possui, por outro lado, alta afinidade à [¹²⁵I] α -bungarotoxina (LINDSTROM et al., 1996). Dessa forma, para efeito de classificação, esses receptores foram divididos em receptores de alta ou de baixa afinidade a I-nicotina.

A partir dessa classificação e com a disponibilidade de anticorpos e DNA complementares, verificou-se que os colinoceptores nicotínicos neuronais apresentam uma grande diversidade de subunidades. Até o momento foram descritas doze subunidades α 2- α 10 e β 2- β 4 (HOGG et al., 2003).

As subunidades dos colinoceptores nicotínicos neuronais dispõem-se simetricamente em torno de um eixo perpendicular à membrana para formar o receptor. As subunidades α 2- α 6 e β 2- β 4 combinam-se formando heteropentâmeros; já as subunidades α 7, α 8, α 9 e α 10 formam homopentâmeros, sendo que, a subunidade α 7 pode formar receptores funcionais sozinhas (cinco subunidades α 7

constitui um receptor) ou juntar-se à subunidade $\alpha 8$, enquanto que a subunidade $\alpha 9$ pode combinar-se com a $\alpha 10$ (LE NOVERE et al., 2002). Estas combinações de subunidades dão origem a múltiplos subtipos de receptores (ROLE, 1992) com diferentes propriedades (ALBUQUERQUE et al., 1995).

Os colinoceptores da musculatura esquelética estão presentes na junção neuromuscular (JNM), sendo formados por um complexo protéico de 290 kDa, composto de 4 tipos de subunidades protéicas com peso molecular entre 50 e 58 kDa (CHANGEUX et al., 1987; LENA; CHANGEUX, 1993). A composição do receptor na musculatura esquelética fetal ou desnervada é diferente daquela observada em musculatura esquelética de animal adulto. Em células da musculatura esquelética fetal onde não há inervação, ou em animais adultos após desnervação, duas subunidades α , uma β , uma γ e uma δ compõem os colinoceptores nicotínicos (WITZEMANN et al., 1990). Nas junções maduras, a subunidade γ é substituída por uma subunidade ϵ . Essa substituição, segundo vários autores, é o que confere as características cinéticas rápidas do canal nicotínico (CAMACHO et al., 1993), tornando-o também mais estável. A estabilidade metabólica desses receptores é regulada pelo nervo, sendo que em músculos desnervados ou inativos a meia-vida dos receptores cai para aproximadamente um dia, enquanto que em músculos ativos a meia vida é de aproximadamente 10 dias (FUMAGALLI et al., 1990; XU; SALPETER, 1995).

Muitos fatores são determinantes na formação das sinapses bem como na manutenção e otimização da comunicação neuromuscular. Desta maneira, a altíssima densidade de colinoceptores nicotínicos nas JNMs (aproximadamente 15.000 receptores / μm^2) (MERLIE; SANES, 1985), decorrente de diversos fatores como a alta atividade de transcrição do núcleo sináptico e o agrupamento desses receptores em espécie de botões (“clustres”, agrupamentos), é essencial para a eficiência desse processo (COLLEDGE; FROEHNER, 1998; SANDROCK Jr et al., 1997). Entre os fatores que controlam a síntese e a inserção dos colinoceptores nicotínicos podemos citar o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a proteína indutora de atividade em receptor de acetilcolina (ARIA), ambos liberados pelo motoneurônio, enquanto que o agrupamento desses receptores em botões estaria relacionado a agrina e rapsina, moléculas que formam um complexo protéico essencial para a localização do receptor.

O CGRP é um neuropeptídeo liberado na fenda sináptica após a deflagração de um potencial nervoso na fibra motora, que ativa receptores pós-sinápticos específicos acoplados à proteína G estimulatória (G_s), promovendo a estimulação da enzima AC e conseqüente produção do segundo mensageiro AMP cíclico (ROA; CHANGEUX, 1991; TAKAMORI; YOSHIKAWA, 1989). Dentre os efeitos pós-sinápticos do CGRP destaca-se a potenciação da contração muscular induzida por estimulação elétrica do nervo motor (TAKAMI et al., 1985; UCHIDA et al., 1990) ao aumentar o tempo de abertura do canal de cátion dos colinoceptores nicotínicos (LU et al., 1993). Além disso, o CGRP aumenta a síntese e a taxa de inserção dos colinoceptores nicotínicos na membrana celular (FONTAINE et al., 1986; NEW; MUDGE, 1986), acelera a dessensibilização do colinoceptor nicotínico (MULLE et al., 1988), e em miotubos de ratos em cultura é co-liberado com a acetilcolina, promovendo também um aumento de AMP cíclico (GODINHO; COSTA Jr, 2003).

A ARIA é uma glicoproteína de 42 KDa secretada pelo motoneurônio, pertence a família das neurogulinas e se liga a receptores do tipo tirosina quinase ERB2, aumentando em até 10 vezes a síntese das subunidades α , δ e γ do receptor nicotínico de músculos esqueléticos (MARTINOU et al., 1991; SANDROCK Jr et al., 1997). O controle do aparecimento da subunidade ε bem como a atividade de transcrição dos núcleos sinápticos estão relacionados com diferentes fatores, em especial com a ARIA, e com a atividade elétrica decorrente da própria ativação dos colinoceptores nicotínicos (MARTINOU et al., 1991). De acordo com Sandroock Jr et al. (1997), camundongos homozigotos com deleção do gene para ARIA morrem no décimo dia de gestação, antes mesmo do início da formação das junções neuromusculares (15º dia de gestação), enquanto que animais heterozigotos possuem uma diminuição do número de colinoceptores nicotínicos proporcional à expressão do gene da ARIA. Desta maneira, a maior concentração de RNA mensageiros que codificam as subunidades de receptores nicotínicos próximo aos núcleos localizados na região sináptica é conseqüência da liberação de ARIA pelo motoneurônio (MERLIE; SANES, 1985).

A agrina é um proteoglicano sulfatado de alto peso molecular sintetizado e secretado pelos motoneurônios e pela fibra muscular esquelética, sendo responsável pelo agrupamento dos colinoceptores nicotínicos. A via de sinalização da agrina envolve a ativação de um receptor do tipo tirosina quinase específica para

colinoceptor muscular (MuSK) e este receptor está colocalizado com o colinoceptor nicotínico na membrana pós-sináptica do músculo (BROMANN et al., 2004; COLLEDGE; FROEHNER, 1998). Agrina rapidamente ativa MuSK em miotubos em cultura (GLASS et al., 1997) e MuSK forma um agregado com o receptor colinérgico (BOWEN et al., 1998), sendo parte essencial do receptor de agrina (GLASS et al., 1997; JENNINGS; BURDEN, 1993).

A rapsina é uma proteína de 43 kDa localizada junto ao colinoceptor nicotínico na membrana pós-sináptica da JNM (YOSHIHARA; HALL, 1993). Esta se associa aos aglomerados durante o período de diferenciação da membrana (PENG; FROEHNER, 1985), agindo juntamente com os colinoceptores nicotínicos como receptor de mensagem, enviada pela região pré-sináptica (BANKS et al., 2003). Foi observado que a ocorrência de mutações no gene da rapsina causa a síndrome miastênica congênita (MASELLI et al., 2003). Inicialmente, acreditava-se que a rapsina era uma proteína periférica de membrana (LAROCHELLE; FROEHNER, 1986; RAMARAO et al., 2001), mas, estudos mais recentes mostram que, na verdade, ela é uma proteína citoplasmática (BROMANN et al., 2004), que chega à membrana via Golgi já conjugada ao colinoceptor nicotínico (MARCHAND et al., 2000).

No processo de formação da JNM existe uma interação de fatores neurais com a região da célula muscular onde se localiza a placa neural para que a mesma seja formada. Os agregados protéicos que incluem os colinoceptores nicotínicos incluem a utrofina, um homólogo da distrofina na sinapse (BEWICK et al., 1992; OHLENDIECK et al., 1991; TINSLEY et al., 1992) e a beta-distroglicana (FALLON; HALL, 1994; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA et al., 1992). Depois de formados, os agregados são estabilizados na membrana por componentes do complexo glicoprotéico distrofina/utrofina (HUH; FUHRER, 2002). O agregado de colinoceptores nicotínicos também contém a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), receptor glutamatérgico do subtipo NMDA, canal de sódio e canal de potássio (LUCK et al., 2000).

Além da ação de moléculas sinalizadoras, é importante considerar a atividade do músculo na manutenção da JNM. A estabilidade metabólica desses receptores é regulada pelo nervo, sendo que em músculos desnervados ou inativos, a meia vida dos receptores cai para aproximadamente um dia, ao passo que em músculos

ativos, essa meia vida é de aproximadamente 10 dias (FUMAGALLI et al., 1990; XU; SALPETER, 1995). A estimulação elétrica de músculos desnervados pode manter os colinoceptores nicotínicos na sua forma estável, mas não é capaz de reverter o processo de desestabilização. Sabe-se que, além da atividade elétrica, outros sistemas estão envolvidos nesse processo de estabilização, principalmente relacionados com o controle do AMP cíclico intracelular (O'MALLEY et al., 1993). O aumento de AMP cíclico intracelular leva à ativação da PKA, estabilizando a forma adulta do colinoceptor nicotínico (que contém a subunidade ϵ), enquanto o ATP extracelular, liberado pelo nervo nos estágios iniciais do desenvolvimento, estabiliza a forma embrionária do receptor, formada pela subunidade γ (O'MALLEY et al., 1997). A modulação funcional destes receptores envolve processos de fosforilação de diferentes maneiras: via PKA dependente de AMP cíclico (HUGANIR, 1987), via PKC (SAFRAN et al., 1990) e via proteína tirosina quinase (HOPFIELD et al., 1988) e esta fosforilação estaria relacionada com a aceleração da dessensibilização desses receptores (HOFFMAN et al., 1994; HOPFIELD et al., 1988).

A internalização desses receptores também está associada à atividade muscular num processo dependente de cálcio, constituindo uma importante forma de regulação do número de receptores na junção. Sabe-se que, uma vez internalizados, os colinoceptores nicotínicos são degradados nos lisossomos, não sendo reciclados, ou seja, não voltam para a membrana (BAMBRICK; GORDON, 1994).

O aparecimento dos receptores maduros bem como o estabelecimento dos aglomerados desses receptores na junção neuromuscular dependem tanto da ativação elétrica da membrana, gerada pela própria ativação com acetilcolina, quanto de fatores tróficos liberados pelo nervo.

1.4 Regulação de colinoceptores nicotínicos pela adenilil ciclase e guanilil ciclase

As AC formam uma família de proteínas associadas à membrana plasmática que catalisam a conversão do ATP em AMP cíclico e desempenham importante papel em vários processos celulares (HANOUNE et al., 1997). Em mamíferos foram identificadas nove isoformas de AC (1 – 9) ligadas à membrana (HANOUNE et al., 1997) e uma isoforma solúvel (sAC), diferente de todas as ciclases de mamíferos e muito similar às ciclases encontradas em cianobactérias (SUNAHARA; TAUSSIG, 2002). No músculo esquelético quatro isoformas (AC2, AC6, AC7 e AC9) foram identificadas (SUZUKI et al., 1998). Todas as isoformas são estimuláveis pela subunidade α da proteína G_s e, com exceção da AC9 e sAC, são ativadas por forskolina (DEFER et al., 2000; HACKER et al., 1998; SUNAHARA; TAUSSIG, 2002). As isoformas AC1, AC3 e AC8 são estimuladas pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina (BEAZELY; WATTS, 2005; CALI et al., 1994; GU; COOPER, 1999; VORHERR et al., 1993; WU et al., 1993). As AC5 e AC6 são seletivamente inibidas pela subunidade $G_{\alpha i}$ (CHEN; IYENGAR, 1993; TAUSSIG et al., 1993). A subunidade $\beta\gamma$ pode modular diferentemente as AC, estimulando as AC2, AC4 e AC7 ou inibindo a AC1 (GAO; GILMANN, 1991). Por sua vez a sAC não é regulada por subunidades da proteína G (SUNAHARA; TAUSSIG, 2002).

O AMP cíclico está envolvido em diversas etapas da regulação do número, da distribuição e da funcionalidade dos colinoceptores nicotínicos em células musculares esqueléticas. Entre os agentes capazes de aumentar a concentração de AMP cíclico no músculo esquelético dois precisam ser destacados: o CGRP (FONTAINE et al., 1986; NEW; MUDGE, 1986) e a adenosina (PITCHFORD et al., 1992). Ambos, atuando via receptores próprios, promovem o aumento de AMP cíclico na fibra muscular esquelética, controlando a atividade dos colinoceptores nicotínicos. É interessante salientar que o CGRP tem origem neuronal, sendo liberado do neurônio motor, enquanto que a adenosina pode ser liberada do próprio músculo quando este entra em atividade. O aumento de AMP cíclico resultante da estimulação de receptores de adenosina sinalizaria uma recuperação mais rápida da resposta nicotínica em sinapses altamente estimuladas (DUBINSKY; FISCHBACH, 1990).

É interessante notar que em um dos primeiros trabalhos que avaliou o efeito do CGRP foi demonstrado que este promovia um aumento de 1,5 vezes no número de colinoceptores nicotínicos na superfície de miotubos de pintos, bem como um aumento de três vezes na quantidade de RNA mensageiro para subunidade alfa dos colinoceptores nicotínicos, sem alterar o RNA mensageiro para alfa-actina (FONTAINE et al., 1987). Os autores mostraram que esta ação do CGRP era dependente da ativação de AMP cíclico.

Em condições basais, músculos esqueléticos possuem níveis detectáveis de GMP cíclico, que aumentam na presença de doador de NO (ABRAHAM et al., 1998). A ativação de colinoceptores nicotínicos pode promover a produção de NO, via ativação da enzima NOS dependente de Ca^{2+} /calmodulina. Esta ativação ocorre através da entrada de cálcio pelos próprios canais colinérgicos (2%) e através de canais de cálcio dependentes de voltagem (DECKER; DANI, 1990). A entrada de cálcio pode, em curto prazo, ser importante sinal na transmissão sináptica, mas em longo prazo resulta em miopatias induzidas por agonistas (LEONARD; SALPETER, 1979, 1982). O NO formado pode ter diferentes ações, como a ativação da guanilil ciclase e formação de GMP cíclico (STAMLER; MEISSNER, 2001). Resumidamente teríamos a seguinte via de transdução: entrada de Ca^{2+} → ativação da Ca^{2+} /calmodulina → ativação da NOS → produção de NO → ativação da guanilil ciclase → produção de GMP cíclico.

A NOS do subtipo neuronal está concentrada na placa motora terminal, co-localizada com $\alpha 1$ -sintrofina, uma proteína associada a distrofina e ao colinoceptor nicotínico (BRENMAN et al., 1996). Esta associação entre nNOS e $\alpha 1$ -sintrofina é perdida em pacientes com distrofia muscular de Duchene. Portanto, a ativação prolongada de colinoceptores nicotínicos pode resultar em miopatias (LEONARD; SALPETER, 1982) e estas poderiam estar associadas à produção de NO.

1.5 Melatonina e colinoceptores nicotínicos

A melatonina é capaz de temporizar a resposta funcional e a expressão de colinoceptores nicotínicos em diferentes modelos estudados.

A melatonina modula colinoceptores nicotínicos localizados nos terminais simpáticos que inervam o ducto deferente de rato. Nestas preparações a estimulação de colinoceptores nicotínicos localizados em terminais nervosos simpáticos leva à liberação de noradrenalina e ATP. Estes dois transmissores agem sobre receptores localizados na musculatura lisa e promovem contração muscular (CARNEIRO; MARKUS, 1990). A melatonina, endógena e exógena, é capaz de aumentar a contração induzida pela estimulação dos colinoceptores nicotínicos, isto é, contração induzida pela noradrenalina e ATP (CARNEIRO et al., 1991). A resposta contrátil máxima induzida pela acetilcolina apresenta uma variação diária, sendo a resposta máxima menor entre 15:00 e 18:00 horas. Tanto a melatonina endógena, quanto a exógena (em concentrações de pM) são capazes de potenciar a resposta máxima induzida por acetilcolina. Esta potenciação provavelmente envolve síntese protéica, uma vez que sua atividade pode ser inibida pela cicloheximida (CARNEIRO et al., 1994). Este efeito potenciador da melatonina é devido ao aparecimento de sítios de ligação de baixa afinidade pela [³H]-nicotina que seria responsável pelo aumento da sensibilidade deste órgão a esse transmissor (MARKUS et al., 1996). Posteriormente, foi sugerido que estes são receptores do subtipo $\alpha 7$ (ZAGO; MARKUS, 1999), que tem baixa afinidade por nicotina e alta sensibilidade à α -bungarotoxina.

O mesmo perfil da indução de uma variação diária na resposta funcional e no número de colinoceptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina foi observado em cerebelo de rato. Em fatias de cerebelo de rato a estimulação de colinoceptores nicotínicos é capaz de liberar [³H]-glutamato atuando em receptores sensíveis a α -bungarotoxina. O glutamato liberado, por sua vez, atuando em receptores NMDA e AMPA-kainato libera uma quantidade adicional deste aminoácido excitatório (RENO et al., 2004). Esta resposta é maior no período noturno do que no período diurno e esta ritmicidade é decorrente da produção noturna de melatonina pela glândula pineal, podendo ser abolida por inibição da síntese de melatonina através da manutenção dos ratos em claro constante ou por injeção de propranolol (MARKUS

et al., 2003). Estes dados funcionais foram acompanhados de alterações do número de receptores medidos através da ligação de [125 I]- α -bungarotoxina.

Um outro modelo estudado foram células de retina de pinto em cultura. A atividade da acetilcolina nessas células foi medida por microfisiometria, portanto, por técnica funcional. Neste caso, pudemos observar que culturas de quatro dias têm uma baixa resposta a acetilcolina e esta aumenta 2,7 vezes em culturas de cinco dias. Esta resposta aumentada observada no quinto dia de cultura é bloqueada por α -bungarotoxina. Por outro lado, o número máximo de sítios de ligação para α -bungarotoxina é reduzido entre o dia 4 e o dia 5. Em outras palavras, entre o dia 4 e o dia 5 observamos um aumento da resposta funcional e uma redução no número de receptores presentes na membrana das células (SAMPAIO et al., 2005).

Os padrões de atividade locomotora de algumas espécies também parecem ser modulados pela melatonina. Injeções de melatonina em ratos, na mesma hora do dia, mantêm esses animais com características locomotoras de escuro constante (CASSONE et al., 1986; REDMAN; ARMSTRONG, 1988). Vale ressaltar que o pico da melatonina circulante ocorre no período de escuro, independente do ciclo de atividade dos animais. A atividade locomotora é controlada por várias regiões do cérebro. No caso da nicotina, esta afeta os padrões de atividade locomotora de ratos apenas quando injetada durante o dia, indicando uma participação diferente entre dia e noite de colinoceptores nicotínicos no controle desse comportamento (BOVET et al., 1975). Além disso, foi demonstrado que há um aumento no número de sítios de ligação para α -bungarotoxina no hipotálamo durante o período claro do ciclo de iluminação ambiental, determinando uma maior sensibilidade à nicotina nesse período (MORLEY; GARNER, 1990).

Estudos realizados com músculos dependentes de andrógenos como o bulbo cavernoso e o elevador do ânus mostram que o desenvolvimento destes está relacionado com a duração do dia. Em animais mantidos em fotoperíodos curtos (ciclo 8:16 horas claro/escuro), o desenvolvimento destes músculos é retardado em comparação com animais submetidos a fotoperíodos longos (16:8 horas claro/escuro) (HEGSTROM; BREEDLOVE, 1998). Esses autores atribuem esse retardo no desenvolvimento à diminuição da concentração plasmática de andrógeno.

Lamosova et al. (1997) demonstraram que a melatonina em doses fisiológicas (100 pg a 10 ng/mL) estimula a proliferação celular em células musculares em

cultura, aumentando o conteúdo de DNA, RNA e proteína destas células. Já em concentrações maiores (20 ng/mL) ou tratamento por longos períodos (120 horas), causam efeito inverso sobre essas células. Entretanto, esses estudos ficaram restritos a ação da melatonina sobre a proliferação celular, sem considerar a funcionalidade dessas células.

Barajas-Lopez et al. (1996) realizaram experimentos com plexo submucoso de cobaia, mostrando que a melatonina modula a transmissão colinérgica, bloqueando os colinoceptores nicotínicos pré-sinápticos. Esse efeito só foi observado em concentrações muito altas (30-300 μ M), e os autores propõem que, uma vez que a melatonina é sintetizada pelas células da parede do intestino, esta possa funcionar como mediador local (PANG et al., 1993).

1.6 Miotubos de rato em cultura como modelo para o estudo de colinoceptores nicotínicos

Células extraídas de músculos esqueléticos de ratos recém-nascidos mantidas em cultura são capazes de se estruturar formando um tecido contrátil. A primeira indicação de miogênese (formação muscular) é o alongamento dos núcleos e dos corpos celulares das células mesenquimais ao se diferenciarem em mioblastos. Logo após, essas células primordiais se fundem para formar estruturas cilíndricas, alongadas e multinucleadas – os miotubos. O crescimento muscular durante o desenvolvimento resulta da fusão de mioblastos e miotubos. Os miofilamentos desenvolvem-se no citoplasma dos miotubos. Logo depois se desenvolvem as miofibras e outras organelas características das células musculares e estriadas. Por serem longas e estreitas, as células musculares são comumente denominadas fibras musculares (SANES; LITCHMAN, 1999) (Figura 3).

No nível molecular esses eventos são precedidos pela ativação gênica e pela expressão de fatores regulatórios da miogênese, formados por quatro fatores de transcrição das famílias de proteínas básicas hélice-alça-hélice (bHLH: myoD, myf-5, miogenina e MRF4), as quais se ligam ao DNA através do sítio de ligação conhecido como E-box, onde controlam os eventos de miogênese (OLSON et al., 1990). Estes fatores estão divididos em primários, (myoD e myf-5) responsáveis pela determinação dos mioblastos, e secundários (miogenina e MRF4) envolvidos na

diferenciação bioquímica e morfológica do tecido muscular esquelético (PERRY; RUDNICK, 2000).

Figura 3: Miogênese. Os mioblastos alinham-se para formar o miotubo multinucleado. Seus núcleos estão localizados na região central da fibra e, com a continuidade do desenvolvimento, os mionúcleos se deslocam para a região periférica do miotubo, caracterizando a fibra muscular madura (SANES; LITCHMAN, 1999).

As culturas de miotubos de ratos apresentam três estágios de desenvolvimento (COSTA et al., 2001). Inicialmente, os mioblastos se deslocam pela matriz de colágeno e se fundem em miotubos (dia 3). Estes, por sua vez, se unem formando as miofibras (dia 4). As miofibras, por serem células multinucleadas, se ramificam formando os aglomerados. No sexto dia de cultura as miofibras sofrem contrações rítmicas espontâneas, completando assim, o seu desenvolvimento. Estas culturas expressam colinoceptores nicotínicos que são funcionais e passíveis de fosforilação por forskolina e AMP cíclico (MILES et al., 1987).

Os colinoceptores em cultura de miotubos podem estar na forma dispersa, microagregados e de agregados (KRIKORIAN; DANIELS, 1989). Como comentado anteriormente a agrina é uma molécula da matriz extracelular relevante na formação de agregados de receptores nicotínicos na zona de formação da JNM (WALLACE,

1989). A incubação de culturas de miotubos com agrina favorece a formação destes aglomerados protéicos.

Pelo exposto, esta cultura é homogênea e expressa colinoceptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina, tornando-a um modelo interessante para comparar o efeito da melatonina previamente observado em colinoceptores nicotínicos de terminações simpáticas do ducto deferente e cerebelo de rato, bem como retina de pinto.

O objetivo deste projeto é caracterizar o mecanismo de ação pelo qual a melatonina, em concentrações encontradas no plasma noturno, altera a densidade dos colinoceptores nicotínicos que ligam [125 I]- α -bungarotoxina. Para tanto foi avaliado o perfil farmacológico do efeito da melatonina e análogos, bem como a presença de receptores de membrana para esta indolamina, sua ação sobre possíveis vias de transdução destes e sobre a calmodulina, que é considerada um alvo para o hormônio da pineal.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos usados neste estudo foram aprovados e realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo colégio brasileiro de experimentação animal – COBEA – e empregados pela comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) (protocolo número 012/2002).

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar recém-nascidos (12 - 24 horas após o nascimento) de ambos os sexos, gentilmente cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo e pelo Centro de Bioterismo da FMUSP. Os ratos foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação (22 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas).

2.2 Drogas e reagentes

- Adenosina (Sigma Chemical Co, St Louis, USA);
- Albumina de Soro Bovino (Sigma Chemical Co);
- α -bungarotoxina (Sigma Chemical Co);
- Calmidazolium (Sigma Chemical Co);
- α CGRP (Sigma Chemical Co);
- Colagenase Tipo IA (Sigma Chemical Co);
- Colágeno extraído da cauda de ratos;
- Cloreto de Potássio (KCl, Merck S.A. Indústrias Químicas do Brasil, São Paulo);
- 4-P-PDOT (Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
- Forscolina (Tocris Bioscience)
- Gentamicina (Gibco, Life Technologies, USA);
- Inibidor de mitose citosina arabinose (ARA-C, ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA);
- 2-Iodomelatonina (Tocris Bioscience)

- Isoprenalina (Sigma Chemical Co);
- 3-[¹²⁵I] iodotirosil α -bungarotoxina (atividade específica 2000 Ci/mmol, NEN[®] Life Sciences Products Inc., Boston, USA);
- Isobutilmetilxantina (IBMX, Sigma Chemical Co);
- Kit AMP cíclico (cAMP Enzymeimmunoassay Biotrak System, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK);
- Kit GMP cíclico (cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak System, Amersham Biosciences);
- Kit de proteína (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, San Diego, USA);
- Luzindol (Sigma Chemical Co);
- Melatonina (Sigma Chemical Co);
- 5-MCA-NAT (Tocris Bioscience);
- NAS (Sigma Chemical Co);
- SNP (Sigma Chemical Co);
- Solução azul de Tripan 0,4 % (Sigma Chemical Co, St Louis, USA);
- PTX (Calbiochem, Darmstadt, Germany).

2.3 Soluções

Para preparação das soluções foram utilizados os seguintes sais: bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico, sulfato de magnésio (Merck S.A., Indústrias Químicas do Brasil, Rio de Janeiro, RJ), cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio (Labsynth, Produtos para laboratórios LTDA, Diadema, SP), glicose e fosfato de potássio monobásico (Reagen, Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, RJ). Para acertar o pH das soluções em 7,4 foi utilizado HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N. Todos os sais foram diluídos em água destilada, deionizada e filtrada em sistema Milli-Q (poro de 0,22 μ m, Millipore, Q-Gard[®], Billerica, USA).

Para preparação dos meios de cultura foram utilizados:

- Meio essencial de Dulbecco modificado (DMEM, Gibco, Life Technologies);
- Soro de cavalo (Soro equino –SE, Gibco, Life Technologies);
- Soro fetal bovino (Soro fetal bovino – SFB, Gibco, Life Technologies).

2.3.1 Solução de Hanks (HBSS): NaCl 136,8 mM; KCl 5,4 mM; MgSO₄.7H₂O 0,45 mM; MgCl₂.6H₂O 0,49 mM; Na₂HPO₄ 0,63 mM; KH₂PO₄ 0,44 mM; CaCl₂ 0,95 mM; NaHCO₃ 4,16 mM. O pH da solução foi ajustado para 7,4 utilizando NaOH 1 mM.

2.3.2 Solução Nutritiva (Krebs): NaCl 116 mM; KH₂PO₄ 0,8 mM; MgCl₂.6H₂O 1,5 mM; MgSO₄.7H₂O 1 mM; CaCl₂ 2,5 mM; NaHCO₃ 25 mM; KCl 4,6 mM; glicose 11 mM, pH 7,4.

2.4 Preparo das drogas

2.4.1 Solução estoque de adenosina: A solução estoque de adenosina na concentração de 10 mM foi preparada em HCl 0,01 N e mantida em alíquotas a -20 °C por até 30 dias.

2.4.2 Solução estoque de CGRP: A solução estoque de CGRP na concentração de 0,1 mM foi preparada em água deionizada e mantida em alíquotas a -20 °C por até 30 dias.

2.4.3 Solução estoque de Forscolina: A solução estoque de forscolina (10 mM) foi preparada em etanol e mantida a -20 °C por até 30 dias.

2.4.4 Solução estoque de (IBMX): A solução estoque de IBMX (100 mM) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantida em alíquotas a -20 °C por até 3 meses.

2.4.5 Solução estoque de isoprenalina: A solução estoque de isoprenalina na concentração de 10 mM foi preparada em HCl 0,01 N e as diluições seguintes foram feitas em solução salina e ácido ascórbico 50 mg/mL.

2.4.6 Solução estoque de melatonina e NAS: As soluções estoque de melatonina e NAS, ambos na concentração de 10 mM foram preparada em água deionizada contendo 10% de etanol e mantidas em alíquotas a -20 °C por até 3 meses.

2.4.7 Solução estoque de 2-Iodomelatonina, Luzindol, 5-MCA-NAT e 4-P-PDOT: As soluções estoque de 2-iodomelatonina, luzindol, 5-MCA-NAT e 4-P-PDOT, todos na concentração de 10 mM foram preparadas em etanol e mantidas em alíquotas a -20 °C por até 3 meses.

2.5 Cultura primária de células musculares

Ratos recém-nascidos de ambos os sexos foram sacrificados por decapitação e imersos em solução de etanol 70%. Os músculos dos membros inferiores foram retirados do animal, dissecados e as células dissociadas por incubação com collagenase tipo IA (200 UI/mL), diluída em HBSS acrescida de CaCl₂ 3 mM (37 °C, 5% CO₂, 2 horas). As células dispersas foram centrifugadas (900 g, 3 min) e ressuspensas em meio DMEM enriquecido com 10% soro fetal bovino (SFB), 10% soro eqüino (SE) e gentamicina 40 mg/L, filtradas sequencialmente em membranas de *nylon* com poros de 100 µm e 60 µm. Após a filtração as células foram quantificadas em câmara de Neubauer utilizando-se azul de tripan 0,4% para identificar as células mortas. Os mioblastos viáveis foram plaqueados (5.10⁵ células/placa de 48 cavidades, 10⁶ células/placa de 24 cavidades ou 6.10⁶ células/placa de 12 cavidades) sobre camada de colágeno.

As células plaqueadas foram mantidas em estufa de cultura (37 °C, 5% CO₂) por 48 horas, sendo então o meio substituído por DMEM contendo 2% SFB, 8% SE, gentamicina 40 mg/L e o inibidor de mitose citosina arabinose 1 mM (ARA-C), com a finalidade de inibir a proliferação de fibroblastos e iniciar a diferenciação celular. Após 24 horas, as células foram incubadas em um meio sem ARA-C enriquecido com 2% SFB, 8% SE e gentamicina 40 mg/L. As células foram utilizadas no quinto dia de cultura.

2.6 Desenvolvimento e diferenciação do músculo esquelético de rato em cultura

Durante os dois primeiros dias de cultivo mioblastos mononucleados proliferaram e a partir do terceiro dia tornou-se evidente o processo de fusão celular com a formação dos miotubos multinucleados. Estes miotubos passaram a contrair espontaneamente a partir do quinto dia de cultivo, indicando a maturação da cultura. As figuras abaixo ilustram o desenvolvimento da cultura. Podemos observar que no primeiro dia existem apenas células arredondadas (miócitos) (Figura 4) e a partir do terceiro dia observa-se o alongamento dos miócitos e formação dos miotubos (Figura 5). No sexto dia podemos ver claramente a fusão das células formando os miotubos (Figura 6).

Figura 4: Dia 1 da cultura. Presença de miócitos (células arredondadas) e fibroblastos. Aumento de 200 X.

Figura 5: Dia 3 da cultura. Alongamento dos miócitos e formação dos miotubos. Aumento de 200 X.

Figura 6: Dia 5 da cultura. Miotubos formados apresentando contração *in vitro*. Aumento 200 x.

2.7 Determinação do conteúdo protéico

A determinação do conteúdo protéico das culturas foi determinada de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Alíquotas de 10 μL das amostras foram incubadas com 200 μL do reagente Protein Assay (Bio-Rad®) em microplacas de 96 cavidades, conforme as especificações do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em 570 nm utilizando-se leitor de ELISA (Spectra Max 250, Molecular Devices, GMI, Inc., Ramsey, MN, USA). A concentração protéica das amostras foi calculada através da interpolação das absorbâncias obtidas na curva-padrão de albumina de soro bovino (1 mg/mL), aplicando-se fator de correção referente à diluição das amostras. As determinações foram realizadas em duplicata e a concentração protéica expressa em mg de proteína.

2.8 Ensaio com ligante radiativo - [^{125}I] α -Bungarotoxina

Os ensaios de ligação foram feitos utilizando cultura de células de músculos esqueléticos com o objetivo de avaliar o efeito da melatonina sobre o número total de receptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina.

Inicialmente determinamos a curva de saturação da ligação para [^{125}I] α -bungarotoxina em miotubos de rato mantidos em cultura por 5 dias. As curvas de saturação foram obtidas incubando [^{125}I] α -bungarotoxina em diferentes concentrações (1, 2, 4 e 8 nM) isoladamente (ligação total) ou simultaneamente com 0,1 μM de α -bungarotoxina para obtenção da ligação não específica. A ligação específica foi calculada a partir da diferença entre a ligação total e a ligação não específica.

Para o ensaio temporal com melatonina (0,1 - 30 nM), miotubos de rato em cultura foram tratados durante 8 ou 48 horas e em seguida foi feito o ensaio de ligação. Para os demais ensaios com melatonina (0,1 - 100 nM) e análogos NAS (0,1 μM - 1 nM), 2-iodomelatonina (0,1 - 10 nM), 5-MCA-NAT (1 - 10 nM), 4-P-PDOT (1 e 10 nM) e do antagonista competitivo do receptor de melatonina, luzindol (10 μM), os miotubos foram tratados por dez horas.

Nestes ensaios, após o tratamento das culturas com as drogas acima descritas, as células foram lavadas duas vezes com Krebs e incubadas por 1 hora em Krebs, com 2 nM de [125 I]- α -bungarotoxina na ausência ou presença de 0,1 μ M de α -bungarotoxina não marcada. Em seguida as células foram lavadas três vezes com Krebs sem [125 I]- α -bungarotoxina, raspadas e suspensas em 1 mL de água deionizada. Uma alíquota desta suspensão (600 μ L) foi transferida para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade lida em contador de cintilação líquido (Packard, Tricarb 2100TR, Downers Grove, Illinois, USA) e a outra alíquota foi utilizada para dosar proteína.

2.9 Dosagem de AMP cíclico

Culturas entre o quinto e sétimo dias de cultivo foram utilizadas para avaliar a produção de AMP cíclico. No dia do ensaio o meio de cultura foi substituído por uma solução salina (NaHCO₃ 25 mM; NaCl 116 mM; KH₂PO₄ 0,8 mM; KCl 4,6 mM; MgCl₂.6H₂O 1,5 mM; MgSO₄.7H₂O 1 mM; CaCl₂ 2,5 mM; glicose 11 mM, pH 7.4), utilizada também como veículo para dissolução dos fármacos. Culturas incubadas por 15 minutos com o inibidor de fosfodiesterase, IBMX (1 mM) foram estimuladas por mais 5 minutos com os demais fármacos. A produção de AMP cíclico foi estimulada com forskolina (10 μ M), tendo sido testados o efeito de melatonina (0,1 - 1 nM), dos análogos 5-MCA-NAT (1 nM), 4-P-PDOT (0,1 - 100 nM), 2-iodomelatonina (0,1 nM) e NAS (0,1 - 1 nM) e do antagonista competitivo do receptor de melatonina, luzindol (1 μ M).

Foram realizados ensaios com a PTX (0,5 μ g/mL), e nestes a cultura foi pré-incubada com PTX "overnight" em meio de cultura sem soro e subsequentemente com IBMX (1 mM, 15 minutos), forskolina (10 μ M) e melatonina (3 nM) por mais 5 minutos, ainda na presença de PTX.

Foram também realizados ensaios com o inibidor da calmodulina, calmidazolium. Nestes ensaios as células foram pré-incubadas com calmidazolium (10 e 50 μ M) e IBMX (1 mM) por 30 minutos e posteriormente com forskolina (10 μ M) por mais 5 minutos.

Após o período de incubação das drogas, foi feita a dosagem de AMP cíclico no sobrenadante das amostras por enzima imunoensaio (EIA) (Amersham, UK).

2.10 Extração do RNA total e reação de transcrição reversa

O RNA total foi extraído tanto de cultura de miotubos quanto de glândula pineal utilizando o reagente TrizolTM. Às amostras foram adicionados 134 µL de 1-bromo-3-cloropropano (BCP) e, após centrifugação (12000 g, 15 minutos, 4 °C), o RNA presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol. O precipitado formado foi lavado duas vezes em etanol, ressuspenso em água tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC, 0,01%) e digerido com DNase (Ambion, Austin, TX, USA) para remoção de DNA contaminante. A síntese de cDNA (DNA complementar) – reação de transcrição reversa (RT) – foi realizada utilizando 1 µg do RNA total, 0,5 µL de solução contendo “random primers” 0,2 µg/µL, 1 µL de solução contendo a mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP) 10 mM, 4 µL do tampão próprio da enzima 5x, 2 µL de ditioneitol 10 mM, 1 µL de inibidor de ribonuclease 20 U/µL e 1 µL da enzima transcriptase reversa Superscript II (200 U, Invitrogen) e água DEPC para o volume final de 20 µL.

2.11 Reação de polimerase em cadeia

Os “primers” (oligonucleotídeos) foram desenhados utilizando o “software” Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi), baseado nas seqüências obtidas do banco de dados GenBank cujos números de acesso são AF130341 (MT1) e AF141863 (MT2) (de acordo com o “National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine National Institutes of Health”, www.ncbi.nlm.nih.gov), como segue: receptor MT1: 5'-AAC.CTG.CTG.GTC.ATC.CTG.TC-3' (sense) e 5'-GAC.ACT.CAG.GCC.CAT.TAG.GA-3' (anti-sense); receptor MT2: 5'-CAT.CCA.CTT.CTT.CTT.TCC.AA-3' (sense) e 5'-TGC.AAG.GCC.AAT.ACA.GTT.GA-3' (anti-sense). Para a reação de polimerase em cadeia (PCR) foram utilizados: 1 µL de cDNA, 0,3 µL da enzima DNA polimerase AmpliTaq Gold (5 U/µL, Amersham Biosciences), 4 µL da mistura contendo dNTPs, 2 µL de cada “primer” (10 pmol/µL), 2,5 µL do tampão para PCR 10x e 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM (todos adquiridos da Invitrogen), para um volume final de 25 µL. As seguintes condições foram utilizadas para a reação de PCR: 6 minutos de desnaturação a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95

°C, 45 segundos de anelamento a 60 °C, 1 minuto de extensão a 72 °C e ciclo final de 10 minutos a 72 °C. O PCR foi realizado utilizando o sistema iCYCLER (Biorad, Hercules, CA, USA). O tamanho dos produtos do PCR foi verificado em gel de agarose 1,5% contendo 0,2% de brometo de etídio. Os tamanhos dos produtos são: 201 pares de base (pb) para MT1 e 202 pb para MT2. A imagem do gel foi capturada e digitalizada utilizando o sistema GEL PRO IMAGE (Fotodyne Inc., Hartland, USA).

2.12 Clonagem e seqüenciamento dos produtos do PCR

Os produtos do PCR foram purificados utilizando as colunas Millipore, diluídos em tampão para PCR e clonados utilizando o vetor pCR II TOPO (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen). As células competentes foram transfectadas com o vetor que apresenta sítios marcadores de seletividade, os quais determina a resistência a ampicilina e a sequência do primer T7, o qual foi utilizado para reação. O DNA purificado (Mini-Prep kit, Promega, Madison, WI, USA) foi quantificado e seqüenciado no seqüenciador Prism ABI (modelo 310, ABI, Foster City, CA, USA). As seqüências de nucleotídeos foram comparadas às do banco de dados contidos no endereço eletrônico do “National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine National Institutes of Health (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando o “software” BLAST.

2.13 Dosagem de GMP cíclico

A dosagem de GMP cíclico foi realizada nas mesmas condições descritas para AMP cíclico, isto é, culturas entre o quinto e o sétimo dias, incubadas com a mesma solução salina descrita acima. As células foram previamente incubadas com o inibidor de fosfodiesterase, IBMX (1 mM), por 15 minutos, e então com as demais drogas (KCl 30 mM ou SNP 30 µM) na presença ou na ausência de melatonina 1 nM ou calmidazolium 50 µM por mais 5 minutos.

Após o período de incubação das drogas, foi feita a dosagem de GMP cíclico no sobrenadante das amostras por EIA (Amersham, UK).

2.14 Análise de dados

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, conforme indicado. Diferenças estatísticas entre duas médias foram determinadas através do teste “*t*” de Student. Para comparações entre três ou mais médias, foi aplicada a análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0,05$). Estas análises foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Curva de saturação

Com o objetivo de caracterizar a ligação de [125 I] α -bungarotoxina a miotubos de ratos, foram utilizadas culturas de 5 dias. As curvas de saturação foram obtidas incubando [125 I] α -bungarotoxina em diferentes concentrações (1, 2, 4 e 8 nM) isoladamente (ligação total) ou simultaneamente com 0,1 μ M de α -bungarotoxina não marcada para obtenção da ligação não específica. A ligação específica foi calculada a partir da diferença entre a ligação total e a ligação não específica. A ligação específica apresenta um valor de Bmax de 645 ± 164 fmol/mg de proteína e valor de Kd de $3,2 \pm 1,9$ nM (Figura 7).

Figura 7: Curva de saturação média para [125 I] α -bungarotoxina. As células foram semeadas em placas de 48 cavidades na densidade de $(5 \cdot 10^5)$ células/cavidade) e mantidas em cultura por 5 dias como descrito nos materiais e métodos. As curvas de saturação foram obtidas incubando o ligante marcado isoladamente (ligação total) ou simultaneamente a 0,1 μ M de α -bungarotoxina não marcada para a obtenção da ligação não específica. A ligação específica foi calculada a partir da diferença entre a ligação total e a não específica. Os símbolos representam a média $\pm$ erro padrão da média de 3 culturas. Bmax = 645 ± 164 fmol/mg de proteína e o valor de Kd = $3,2 \pm 1,9$ nM.

3.2 Decurso temporal

Para verificar o envolvimento da melatonina na regulação da expressão de colinoceptores nicotínicos musculares, miotubos de rato em cultura foram tratados com melatonina (0,1 - 30 nM) durante 8 ou 48 horas e em seguida foi feito o ensaio de ligação. Os miotubos de rato em cultura apresentaram uma redução no número de sítios de ligação para α -bungarotoxina (2 nM) (Figura 8A). A incubação por 8 horas resultou em uma redução concentração-dependente, enquanto a incubação por 48 horas produziu redução máxima já na menor concentração testada. Independente do tempo de incubação ou da concentração utilizada, a redução máxima do número de colinoceptores nicotínicos induzida por melatonina foi de 50%.

Em vista do longo decurso temporal, foi testado a possibilidade do efeito da melatonina induzir uma cadeia de eventos, que poderia ser finalizada mesmo que o agente indutor tivesse sido retirado no início do processo. Para tanto, foi feita uma incubação com melatonina (1 nM) por 4 ou 6 horas e no tempo restante para completar 10 horas (6 ou 4 horas, respectivamente) as culturas foram mantidas na ausência de melatonina. Como pode ser observado na figura 8B a melatonina não reduziu o número de colinoceptores nicotínicos com este protocolo, sugerindo a necessidade da manutenção constante do estímulo.

Figura 8: Efeito da melatonina sobre a ligação de 2 nM de $[^{125}\text{I}]$ α -bungarotoxina. O ensaio de ligação foi feito segundo materiais e métodos e figura 7. A) Diferentes concentrações de melatonina foram incubadas por 8 (quadrado) ou 48 (triângulo) horas antes do ensaio de ligação. Dados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 placas de cultura. B) As células foram incubadas com 1 nM de melatonina por 4 ou 6 horas e deixadas na ausência de melatonina até completar 10 horas (6 ou 4 horas, respectivamente).

3.3 Efeito de análogos de melatonina sobre o número de colinoceptores nicotínicos

A melatonina (0,1 – 100 nM) e seu precursor, NAS (0,1 nM – 1 μ M), reduziram de maneira concentração-dependente o número de colinoceptores nicotínicos em miotubos de rato em cultura após um período de 10 horas de incubação. O efeito induzido pela melatonina foi 20 vezes mais potente do que o efeito induzido pela NAS (Figura 9).

Figura 9: Efeito da melatonina e da N-acetilserotonina sobre a ligação de 2 nM de [125 I] α -bungarotoxina. Dez horas de incubação com melatonina (quadrado) ($IC_{50} = 1,93 \cdot 10^{-10}$ M; $LC = 3,02 \cdot 10^{-11} - 1,24 \cdot 10^{-9}$) induziu um efeito 20 vezes mais potente do que com a N-acetilserotonina (triângulo) ($IC_{50} = 4,7 \cdot 10^{-9}$; $LC = 3,6 \cdot 10^{-9} - 3,64 \cdot 10^{-8}$). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3 culturas.

Além da ação da melatonina e de seu precursor, NAS, descritos acima, também foi avaliado o efeito da 2-iodomelatonina (0,1 – 10 nM), um clássico agonista de receptor MT_1 e MT_2 ; e 5-MCA-NAT (1 – 10 nM), agonista do sítio ligante MT_3 . Estes agonistas incubados por 10 horas não foram capazes de reduzir o número de colinoceptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina (Tabela 1).

Em seguida avaliou-se o efeito de 4-P-PDOT (1 e 10 nM), que foi inicialmente classificado como um antagonista seletivo de receptor MT_2 (DUBOCOVICH, 1995; DUBOCOVICH et al., 1997), mas que posteriormente foi descrito como agonista parcial (NONNO et al., 1999; LOTUFO et al., 2001). Esta droga não teve ação antagonista, no entanto, quando foi incubada por 10 horas teve um efeito semelhante ao da melatonina, isto é, foi capaz de reduzir o número de colinoceptores nicotínicos em miotubos de rato em cultura (Figura 10).

Tabela 1 – Efeito da 2-Iodomelatonina e 5 MCA-NAT sobre o número de colinoceptores nicotínicos

Condição	Média	EPM	n
Controle	162,2	36,7	4
Melatonina 10 nM *	59,4	10,7	6
2-iodomelatonina 0,1 nM	165,2	28,9	5
2-iodomelatonina 1 nM	157,2	27,1	6
2-iodomelatonina 10 nM	149,3	23,6	6
5-MCA-NAT 1 nM	129,5	12,6	6
5-MCA-NAT 10 nM	171,2	30,9	5

*Significativamente diferente do controle ($p < 0,01$). Análise de variância.

Figura 10: Efeito do 4-P-PDOT sobre a ligação de 2 nM de [¹²⁵I] α-bungarotoxina. Os dados representam a média ± erro padrão da média de 4 placas de cultura. * p < 0,05 quando comparado com miotubos de rato em cultura não estimulados.

A redução do número de colinoceptores nicotínicos em miotubos de rato em cultura induzida por melatonina 1 nM foi parcialmente revertida por 10 μM de luzindol (Figura 11). Nesta concentração o luzindol bloqueia os três subtipos de receptores de melatonina descritos (DUBOCOVICH, 1995).

Figura 11: Efeito do antagonista luzindol sobre a ligação de 2 nM de [125 I] α -bungarotoxina. As culturas foram incubadas com melatonina 1 nM na presença e ausência de luzindol 10 μ M. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 5 placas de cultura. $p < 0,01$ quando comparado com culturas não estimuladas. $p < 0,05$ quando comparado com culturas incubadas com melatonina e luzindol.

3.4 Efeito da melatonina e análogos sobre a estimulação direta da adenilil ciclase por forskolina

A melatonina em vários sistemas é capaz de ativar receptores acoplados à proteína G_i . Neste ensaio avaliamos a capacidade da melatonina em inibir a produção de AMP cíclico induzida por forskolina.

Melatonina, NAS e 4-P-PDOT promoveram uma redução concentração-dependente no aumento da produção de AMP cíclico induzida por forskolina (Figura 12). O efeito da melatonina foi bloqueado pelo antagonista competitivo luzindol (Figura 13). Os análogos, 2-iodomelatonina e 5-MCA-NAT, a exemplo do que ocorreu em

relação à redução do número de colinoceptores nicotínicos, não foram capazes de reduzir a produção de AMP cíclico induzida por forskolina (Tabela 2).

Figura 12: Efeito da melatonina (MEL), N-acetilserotonina (NAS) e 4-P-PDOT na produção de AMP cíclico induzida por forskolina. As culturas foram incubadas na presença de IBMX (1 mM, 15 minutos). Subseqüentemente foi adicionado MEL (0,1-100 nM), NAS (0,1-1 nM) ou 4-P-PDOT (0,1-100 nM) na presença de forskolina (10 μ M) por 5 minutos. Os dados representam a porcentagem de redução da produção de AMP cíclico induzida por forskolina ($7,7 \pm 1,3$ pmol/cavidade) $\pm$ erro padrão da média de 6 placas de cultura.

Figura 13: Efeito do antagonista luzindol sobre a capacidade da melatonina de reduzir a produção de AMP cíclico. As culturas foram incubadas na presença de IBMX (1 mM, 15 minutos). Posteriormente foi adicionado melatonina (1 nM) na presença de forskolina (10 μ M) e luzindol (1 μ M) por 5 minutos. Os dados representam a porcentagem de redução em relação à produção induzida por forskolina ($9,0 \pm 2,3$ pmol/cavidade) $\pm$ erro padrão da média de 4 placas de cultura. * $p < 0,001$ quando comparado com culturas não estimuladas; # $p < 0,01$ quando comparado com culturas incubadas apenas com forskolina; ** $p < 0,001$ quando comparado com culturas incubadas com forskolina e melatonina.

Tabela 2 – Efeito da 2-Iodomelatonina e 5-MCA-NAT sobre a estimulação direta da adenilil ciclase por forskolina.

Condição	Média	EPM	n
Forskolina 10 nM	9,0	2,3	3
2-iodomelatonina 0,1 nM	6,36	2,1	3
5-MCA-NAT 1 nM	10,56	1,8	3

3.5 Efeito da melatonina sobre a produção de AMP cíclico via estimulação de receptores acoplados à proteína G_s

No músculo esquelético estão presentes 4 isoformas de adenilil ciclases, AC2, AC6, AC7 e AC9. Estas isoformas são estimuláveis pela subunidade α da proteína G_s e por forskolina (DEFER et al., 2000). A subunidade α estimulará a AC quando um receptor acoplado a G_s for estimulado, como é o caso dos receptores P1 (ou receptores de adenosina) e receptores β -adrenérgicos.

Os miotubos de rato em cultura foram estimulados com um agonista de receptores P1, a adenosina (0,1 mM), promovendo o aumento da produção de AMP cíclico. Este efeito foi reduzido pela melatonina (3 nM). Quando a cultura foi tratada com o antagonista luzindol (1 nM) na presença de adenosina e melatonina, observamos a inibição do efeito da melatonina (Figura 14).

Figura 14: Efeito do antagonista luzindol sobre a capacidade da melatonina em reduzir a produção de AMP cíclico induzida por adenosina. As culturas foram incubadas com IBMX (1 mM, 15 minutos). Posteriormente, a melatonina (3 nM) foi adicionada na presença de adenosina (0,1 mM) ou de adenosina (0,1 mM) mais luzindol (1 nM) por 5 minutos. Os dados representam a porcentagem de redução da produção de AMP cíclico induzida por adenosina ($2,8 \pm 0,2$ pmol/cavidade) $\pm$ erro padrão da média de 4 placas de cultura. * $p < 0,001$ quando comparado com culturas estimuladas apenas com adenosina. # $p < 0,01$ quando comparado com culturas estimuladas com adenosina e melatonina.

Também realizamos ensaios com a isoprenalina, agonista de adrenocetores β . Neste ensaio, o agonista foi capaz de aumentar a produção de AMP cíclico de maneira dependente da concentração, porém, a melatonina não reduziu esse efeito (Figura 15).

Figura 15: Efeito da melatonina sobre a produção de AMP cíclico induzida por isoprenalina. As culturas foram incubadas com IBMX (1 mM, 15 minutos). Posteriormente melatonina foi adicionada (3 nM, $\circ$ n = 6) na presença de isoprenalina (0,1 – 10 μ M, $\diamond$ n = 6) por 5 minutos. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 4 placas de cultura.

O CGRP, outro estimulante da produção de AMP cíclico que é liberado juntamente com a acetilcolina quando o motoneurônio é estimulado, teve seu efeito reduzido por melatonina (0,01 - 1 nM) somente na concentração mais elevada (Figura 16).

Figura 16: Efeito da melatonina sobre a produção de AMP cíclico induzido por CGRP. As culturas foram incubadas com IBMX (1 mM, 15 minutos). Posteriormente melatonina (0,01 – 1 nM) foi adicionada na presença de CGRP (10 nM) por 5 minutos. Os dados representam a porcentagem de redução da produção de AMP cíclico induzida por CGRP ($11,5 \pm 1,9$ pmol/cavidade) $\pm$ erro padrão da média de 4 placas de cultura. * $p < 0,001$ quando comparado com culturas não estimuladas; # $p < 0,001$ quando comparado com culturas estimuladas apenas com CGRP.

3.6 Efeito da toxina pertussis sobre a redução da produção de AMP cíclico induzida por melatonina

Para verificar se o efeito da melatonina era resultante da estimulação de receptor acoplado à proteína G_i foram feitos experimentos com PTX, que é capaz de inibir o efeito da proteína G . Na figura 17 mostramos que a resposta a melatonina não foi bloqueada por PTX, sugerindo que a mesma pode estar atuando por outro mecanismo. Vale ressaltar que estes experimentos foram repetidos com toxina de dois lotes diferentes, para podermos certificar que o resultado negativo não era decorrente de uma perda de ação desta toxina.

Figura 17: Efeito da melatonina na produção de AMP cíclico induzido por forskolina na presença ou ausência da toxina pertussis. As culturas foram incubadas previamente com PTX (0,5 $\mu\text{g/mL}$) “overnight”. Posteriormente foram incubadas com IBMX (1 mM, 15 minutos) e em seguida com melatonina (3 nM) na presença de forskolina (10 μM) por 5 minutos. Os dados representam a porcentagem de redução em relação à produção induzida por forskolina (na presença de PTX $36,4 \pm 11,2$ pmol/cavidade; na ausência de PTX $31,0 \pm 9,8$ pmol/cavidade) $\pm$ erro padrão da média de 3 placas de cultura. * $p < 0,001$ quando comparado com culturas estimuladas com forskolina.

3.7 Determinação do RNAm para receptores MT_1 e MT_2

O perfil farmacológico do efeito da melatonina sobre o número de colinoceptores nicotínicos, bem como sobre a redução na produção de AMP cíclico não sugere a presença de receptores para melatonina. Além disso, a PTX, que sabidamente bloqueia receptores acoplados à proteína G_i , não produziu efeito. Desta forma, temos um forte indicativo de que os efeitos aqui observados não são decorrentes da ativação de receptores de membrana acoplados à proteína G_i . Considerando que estes receptores já foram clonados, verificamos a presença dos genes para receptores MT_1 e MT_2 . Como pode ser observado na figura 18, apenas genes para receptores MT_1 foram identificados nesta preparação.

Figura 18: Análise da expressão do RNAm de receptores MT_1 e MT_2 em miotubos de rato (colunas 3 e 5) e glândula pineal (colunas 2 e 4), respectivamente. Coluna 1 – peso molecular padrão; Coluna 6 – controle negativo.

3.8 Efeito do inibidor de calmodulina sobre a redução do número de colinoceptores nicotínicos e inibição da produção de AMP cíclico induzida por forskolina

Os dados anteriores mostraram que a melatonina não está atuando via receptores de membrana. Considerando que a melatonina pode atuar intracelularmente, inibindo a atividade da calmodulina (BENITEZ-KING; ANTON TAY, 1993; BENITEZ-KING et al., 1993; HUERTO-DELGADILLO et al., 1994) e que, algumas isoformas de AC podem ser moduladas por esta via de sinalização, passamos a investigar o efeito de inibidores de calmodulina sobre a produção de AMP cíclico e o número de colinoceptores nicotínicos em culturas de miotubos de ratos.

Como pode ser observado na figura 19 o inibidor de calmodulina (calmidazolium) reduz o número de colinoceptores nicotínicos e inibe a produção de AMP cíclico induzida por forskolina.

Assim, os nossos dados mostram uma semelhança entre o efeito da melatonina e da inibição da calmodulina sobre os dois fenômenos avaliados.

Figura 19: Efeito do calmidazolium na produção de AMP cíclico e no número de sítios de ligação para α -bungarotoxina. O eixo da esquerda apresenta a porcentagem da produção de AMP cíclico induzida por forskolina ($167,8 \pm 9,8$ pmol/cavidade) na presença ou ausência de calmidazolium $50 \mu\text{M}$ ($n = 4$). O eixo da direita representa o número de sítios de ligação para α -bungarotoxina expresso como fmol/cavidade ($n = 5$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$.

3.9 Efeito da melatonina e do inibidor de calmodulina na produção de GMP cíclico

Em miotubos de rato em cultura a calmodulina ativa NOS formando NO e este por sua vez promove a ativação da guanilil ciclase e formação de GMP cíclico (STAMLER; MEISSNER, 2001). Melatonina (1 nM) e calmidazolium (50 μ M), inibidor clássico de calmodulina, inibiram a produção de GMP cíclico induzido por KCl (30 mM), mas não bloquearam o efeito induzido por nitroprussiato de sódio (SNP) (30 μ M), doador de NO que estimula a guanilil ciclase independente de NOS (Figura 20).

Figura 20: Efeito da melatonina (mel, 1 nM) e calmidazolium (cdz, 50 μ M) na produção de GMP cíclico induzida por KCl (30 mM) (A), ou nitroprussiato de sódio (SNP, 30 μ M) (B). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 3 placas de cultura. * $p < 0,05$ quando comparado com o basal.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o mecanismo de ação pelo qual a melatonina modifica os colinoceptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina em cultura de miotubos de ratos. Estes estudos foram feitos utilizando uma concentração de [125 I] α -bungarotoxina (2 nM) próxima da concentração que ocupa 50% dos sítios de ligação. A melatonina incubada por 8 horas reduziu de maneira dependente da concentração (0,1 - 30 nM) o número de sítios de ligação para [125 I] α -bungarotoxina. Por outro lado, o estudo do decurso temporal deste fenômeno mostrou que um grande aumento do tempo de incubação (48 horas) faz com que qualquer concentração de melatonina reduza em cerca de 50% o número de sítios de ligação para α -bungarotoxina 2 nM, sugerindo que este seja um efeito cumulativo e que não admite recuperação enquanto o hormônio estiver presente. Por outro lado, o efeito da melatonina só se estabelece após um longo tempo de incubação (aproximadamente 8 horas) e este efeito só é detectado na presença da indolamina, visto que incubações de 4 ou 6 horas não são suficientes para disparar o fenômeno. Portanto, pelos dados obtidos até o momento concluímos que a melatonina é capaz de reduzir o número de colinoceptores que ligam α -bungarotoxina e que o decurso temporal deste fenômeno sugere que este é resultante de uma cadeia de reação.

Estes resultados vêm a se somar aos obtidos em outros modelos experimentais (ducto deferente e cerebelo de rato, e retina de pinto em cultura) nos quais também foi demonstrado que a melatonina é capaz de modificar o número e a função de colinoceptores nicotínicos. Em ducto deferente de rato a melatonina promove um aumento do número de receptores e da resposta funcional, o primeiro medido através da ligação com α -bungarotoxina (MARKUS et al., 1996) e o segundo através da liberação de noradrenalina (CARNEIRO et al., 1993; ZAGO et al., 1999). No caso do cerebelo foi visto que a estimulação de colinoceptores nicotínicos do subtipo α -7, isto é, sensíveis à α -bungarotoxina, resulta em aumento da liberação de glutamato e em redução no número de colinoceptores nicotínicos. Nos dois modelos experimentais testados esta variação do número de receptores colinérgicos é observada *in vivo* na

dependência da liberação noturna de melatonina. Em ambos os modelos citados, bem como no caso dos miotubos de rato, o efeito é de longo prazo.

Assim sendo, fica claro que nas concentrações utilizadas, que são compatíveis com as concentrações plasmáticas noturnas de melatonina, este hormônio interfere na função nicotínica de forma indireta, isto é, não podemos supor uma ação direta da melatonina sobre os colinoceptores nicotínicos. No deferente de rato foi demonstrado que a cicloheximida, mas não a actinomicina D, bloqueava o efeito da melatonina (CARNEIRO et al., 1993). Portanto, esta ação parecia ser dependente da fase de tradução da síntese protéica.

No estudo em miotubos, é provável que o efeito da melatonina também seja dependente da síntese protéica, visto o longo decurso temporal para a obtenção da resposta. Estudos em cultura de células musculares esqueléticas de pinto mostraram que, em concentrações fisiológicas, a melatonina estimula a proliferação celular, aumentando seu conteúdo de DNA, RNA e proteína. No entanto, em concentrações supra-fisiológicas o efeito observado foi o inverso, isto é, houve uma inibição da proliferação celular. O tempo de tratamento com o hormônio também interferiu no efeito, pois em concentração de 400 ng, quando o tempo de incubação aumentou de 48 horas para 120 horas, o efeito observado foi invertido (LAMOSOVA et al., 1997). Os autores atribuíram esses efeitos à ativação de vários mecanismos intracelulares diferentes, relacionados à inibição ou à estimulação de fatores nucleares que regulam a transcrição.

Para avaliar o mecanismo de ação da melatonina analisamos o perfil farmacológico de seus análogos na redução do número de sítios de ligação para [¹²⁵I] α -bungarotoxina e na inibição da produção de AMP cíclico induzida por forskolina. O efeito da melatonina foi comparado ao de análogos que agem seletivamente nos diferentes subtipos de receptores de melatonina. O precursor da melatonina, N-acetilserotonina, tem alta afinidade pelo receptor MT_3 , e baixa afinidade pelos receptores MT_1 e MT_2 (POPOVA; DUBOCOVICH, 1995). A 2-iodomelatonina é um agonista de alta afinidade para os três receptores, tendo maior afinidade pelos receptores MT_1 e MT_2 , do que para o receptor MT_3 . Este ligante é usado para determinar o número de receptores de membrana de melatonina pela técnica de ligante

radiativo (DUBOCOVICH, 1995). A melatonina radioativa não é adequada para estes estudos, pois marca tanto sítios de ligação na membrana, como sítios intracelulares. Desta forma, podemos inferir que os efeitos da 2-iodomelatonina são mediados por interação com sítios ativos expostos para o meio extracelular. O 4-P-PDOT é um agonista parcial que se liga com alta seletividade em receptores do subtipo MT_2 (NONNO et al., 1999) e o 5-MCA-NAT é um ligante seletivo para receptor de melatonina MT_3 (DUBOCOVICH, 1995).

O perfil farmacológico dos análogos de melatonina foi semelhante quando foi estudada a redução do número de colinoceptores nicotínicos e da produção de AMP cíclico induzida por forskolina. O fato da melatonina e da N-acetilserotonina terem alta afinidade nos dois processos sugeriria a mediação através de receptores MT_3 . Por outro lado, a resposta obtida pelo 4-P-PDOT indicaria a presença de receptores MT_2 . No entanto, os dados obtidos com 2-iodomelatonina e 5-MCA-NAT refutam estas sugestões. O fato de não haver resposta a 2-iodomelatonina sugere que a ação da melatonina esteja sendo mediada por sítio de ligação intracelular, ao qual este análogo não tem acesso. Assim, fica comprometida a hipótese de ação nos receptores MT_1 , MT_2 e MT_3 . Reforçando que a ação da melatonina não ocorre através de receptores MT_3 , como indicaria a ação da NAS, o análogo 5-MCA-NAT não promoveu qualquer efeito nesta preparação.

Colinoceptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina são modulados por AMP cíclico em miotubos de rato (PITCHFORD et al., 1992). Existem pelo menos 10 isoformas de AC, enzima que promove a transformação de ATP em AMP cíclico (SUNAHARA et al., 1997). No músculo esquelético estão presentes 4 isoformas de adenilil ciclases; AC2, AC6, AC7 e AC9. O AMP cíclico está envolvido em diversas etapas da regulação do número, da distribuição e da funcionalidade dos colinoceptores nicotínicos em células musculares esqueléticas. O CGRP, liberado do motoneurônio, é um dos fatores que controlam a síntese e a inserção dos colinoceptores nicotínicos na JNM, exercendo seus efeitos a partir da ativação de receptores de sete domínios transmembrânicos que ativam a proteína Gs levando ao aumento de AMP cíclico (FONTAINE et al., 1987; LAUFER; CHANGEUX, 1987; MULLE et al., 1988; NEW; MUDGE, 1986). Para avaliarmos o efeito da melatonina através da estimulação indireta

da AC via receptores acoplados à proteína Gs, tratamos os miotubos de rato em cultura com CGRP (10 nM) por 5 minutos e verificamos que apenas na maior concentração testada, a melatonina foi capaz de reduzir a produção de AMP cíclico. Este resultado está de acordo com dados da literatura que mostram que o CGRP causa aumento de AMP cíclico na fibra muscular (LAUFER; CHANGEUX, 1987), e em miotubos de rato em cultura é co-liberado com a acetilcolina promovendo também um aumento de AMP cíclico (GODINHO; COSTA Jr, 2003).

Além do CGRP já foi demonstrado em culturas de músculo esquelético que a estimulação destes, via colinoceptores nicotínicos, leva a liberação de adenosina para o meio de cultura e que esta, atuando sobre receptores de membrana do tipo P1, resulta em aumento de AMP cíclico no músculo. Seguindo esta linha de raciocínio o aumento da produção de AMP cíclico resultaria, em longo prazo, em uma recuperação mais rápida da resposta nicotínica em sinapses altamente estimuladas (DUBINSKY; FISCHBACH, 1990). Em miotubos de rato em cultura a produção de AMP cíclico foi aumentada quando a cultura foi estimulada com um agonista de receptor P1, adenosina (0,1 mM). Este efeito foi inibido na presença de melatonina (3 nM).

Outro estimulante da produção de AMP cíclico utilizado foi a isoprenalina, um agonista de receptores β -adrenérgicos. Neste caso verificamos que o agonista foi capaz de aumentar a produção de AMP cíclico de maneira dependente da concentração, porém, a melatonina não foi capaz de inibir esse efeito.

É interessante notar que a melatonina não atua igualmente sobre o efeito produzido pela ativação de diferentes receptores acoplados à proteína Gs (CGRP, adenosina e isoprenalina), indicando que pode haver uma especificidade no subtipo de AC estimulada por cada tipo de receptor.

Os dados obtidos com PTX, que é capaz de inibir o efeito da proteína transdutora, e os dados de clonagem dos receptores acoplados à proteína Gi, foram decisivos para que se descartasse uma ação via receptor de membrana.

O agregado de colinoceptores nicotínicos presentes em miotubos de rato em cultura, mesmo na ausência de agrina (KUMMER et al., 2004), inclui a MuSK (HOCH, 2003), proteínas ancoradoras tais como PSD-95 e rapsina, receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), canal de sódio e óxido nítrico sintase (LUCK et al., 2000). A ativação da NOS

é, pelo menos parcialmente, dependente da ativação de calmodulina (FULTON et al., 2001), e a presença de colinoceptores nicotínicos na superfície da membrana para formar agregados requer a participação de calmodulina (PENG, 1984; TAI; CONNOLLY, 1986).

A melatonina se liga com alta afinidade a calmodulina (BENITEZ-KING et al., 1993), promovendo rearranjos do citoesqueleto (BENITEZ-KING et al., 1990), inibição da NOS cerebelar e a produção de GMP cíclico (POZO et al., 1997).

A calmodulina tem um papel na manutenção de agrupamentos (clusters) de colinoceptores nicotínicos e pode ativar algumas isoformas de AC. Foi demonstrado que miotubos de rato contêm a AC do subtipo AC6, que é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina (BEAZELY; WATTS, 2005).

Em vista do exposto acima foi testada a possibilidade de um inibidor de calmodulina, calmidazolium, exercer os mesmos efeitos da melatonina e análogos. Este experimento descrito na figura 19 demonstra que o calmidazolium induz redução do número de colinoceptores nicotínicos e inibição do aumento de AMP cíclico produzido por forskolina. Portanto, este último dado sugere que a melatonina poderia estar atuando em miotubos de rato em cultura através da inibição da calmodulina e, com isto, levando a uma inibição da AC do tipo 6.

Considerando que a melatonina se liga com alta afinidade a calmodulina (BENITEZ-KING et al., 1993), reduzindo o número de colinoceptores nicotínicos e inibindo o aumento da produção de AMP cíclico induzido por forskolina (de ALMEIDA-PAULA et al., 2005), levantamos a hipótese de que em miotubos de rato em cultura a calmodulina ativaria a NOS, formando NO e este, por sua vez, promoveria a ativação da guanilil ciclase e formação de GMP cíclico. Para testar nossa hipótese bloqueamos a produção de GMP cíclico induzido por KCl 30 mM com melatonina (1 nM) e calmidazolium (50 μ M) (Figura 20A). Por outro lado, nem a melatonina nem o calmidazolium bloquearam o efeito do SNP (30 μ M), um doador de NO, que estimula a guanilil ciclase de maneira independente da ativação da enzima NOS (Figura 20B).

Em resumo, foi detectada uma coerência entre formação de NO, GMP cíclico e resposta funcional. Assim, à semelhança do observado para a via da adenilil ciclase, a inibição da via da guanilil ciclase pode ser explicada através de um mecanismo

independente da ativação de receptores de membrana, e apenas dependente de um bloqueio direto da calmodulina (BENITEZ-KING et al., 1993).

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que:

- 1) A redução do número de sítios de ligação para a [125 I] α -bungarotoxina induzida pela melatonina é concentração e tempo dependente;
- 2) A melatonina, NAS e o 4-P-PDOT reduzem de maneira concentração dependente o número de colinoceptores nicotínicos e a produção de AMP cíclico induzida por forskolina;
- 3) Luzindol bloqueia parcialmente a resposta da melatonina na redução de colinoceptores sensíveis à α -bungarotoxina, e bloqueia totalmente a resposta da melatonina à produção de AMP cíclico induzida por forskolina, em concentração acima da que confere seletividade para os receptores MT₂,
- 4) A isoprenalina estimula AC que não depende de cálcio-calmodulina, enquanto que o receptor de adenosina e o receptor de CGRP podem estar atuando sobre AC dependentes da interação com o complexo cálcio-calmodulina;
- 5) A inibição de calmodulina reduz o número de colinoceptores nicotínicos e inibe o aumento da produção de AMP cíclico induzido por forskolina;
- 6) A melatonina e o calmidazolium inibem a produção de GMP cíclico induzida por KCl, mas não bloqueiam o efeito induzido por SNP.

Portanto, o mecanismo de ação da melatonina sobre os miotubos de rato em cultura não está atuando via receptores de membrana acoplados à proteína Gi, mas provavelmente, está atuando internamente por interação com o complexo cálcio-calmodulina inibindo a ativação da(s) AC dependente(s) de cálcio-calmodulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHAM, R. Z.; KOBZIK, L.; MOODY, M. R.; REID, M. B.; STAMLER, J. S. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, v. 119, n. 1, p. 177-183, 1998.

AKCAY, Y. D.; YALCIN, A.; SOZMEN, E. Y. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. **Cell Mol. Biol. Lett.**, v. 10, n. 2, p. 321-329, 2005.

ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F.; CASTRO, N. G.; ALKONDON, M.; REINHARDT, S.; SCHRODER, H.; MAELICKE, A. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 757, p. 48-72, 1995.

de ALMEIDA-PAULA, L. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; SILVA FERREIRA, Z.; MONTEIRO, A. E.; ISOLDI, M. C.; GODINHO, R. O.; MARKUS, R. P. Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 525, n. 1-3, p. 24-31, 2005.

BAMBRICK, L.; GORDON, T. Neurotoxins in the study of neural regulation of membrane proteins in skeletal muscle. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 32, n. 3, p. 129-138, 1994.

BANKS, G. B.; FUHRER, C.; ADAMS, M. E.; FROEHNER, S. C. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. **J. Neurocytol.**, v. 32, n. 5-8, p. 709-726, 2003.

BARAJAS-LOPEZ, C.; PERES, A. L.; ESPINOSA-LUNA, R.; REYES-VASQUEZ, C. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, n. 3, p. 319-325, 1996.

BEAZELY, M. A.; WATTS, V. J. Galphaq-coupled receptor signaling enhances adenylate cyclase type 6 activation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, n. 1, p. 113-120, 2005.

* De acordo com:

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

BECKER-ANDRE, M.; ANDRE, E.; DeLAMARTER, J. F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 194, n. 3, p. 1371-1379, 1993.

BECKER-ANDRE, M.; WIESENBERG, I.; SCHAREN-WIEMERS, N.; ANDRE, E.; MISSBACH, M.; SAURAT, J. H.; CARLBERG, C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 46, p. 28531-28534, 1994. Published erratum appears in *J. Biol. Chem.*, v. 272, n. 26, p. 16707, 1997.

BENÍTEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F. Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. **J Pineal Res.**, v. 9, n. 3, p. 209-220, 1990.

BENITEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTON-TAY, F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. **Brain Res.**, v. 557, n. 1-2, p. 289-292, 1991.

BENITEZ-KING, G.; ANTON-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 635-641, 1993.

BENITEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTON-TAY, F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. **Life Sci.**, v. 53, n. 3, p. 201-207, 1993.

BENITEZ-KING, G.; RIOS, A.; MARTINEZ, A.; ANTON-TAY, F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1290, n. 2, p. 191-196, 1996.

BEWICK, G. S.; NICHOLSON, L. V.; YOUNG, C.; O'DONNELL, E.; SLATER, C. R. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. **Neuroreport**, v. 3, n. 10, p. 857-860, 1992.

BILICI, D.; SÜLEYMAN, H.; BANOĞLU, Z. N.; KIZILTUNÇ, A.; AVCI, B.; CİFTÇİOĞLU, A.; BILICI, S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, n. 4, p. 856-861, 2002.

BOVET, D.; BOVET-NITTI, F.; OLIVERIO, A. Action of nicotine on spontaneous and acquired behavior in rats and mice. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 142, n. 1, p. 261-267, 1975.

BOWEN, D. C.; PARK, J. S.; BODINE, S.; STARK, J. L.; VALENZUELA, D. M.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; LINDSAY, R. M.; GLASS, D. J.; DISTEFANO, P. S. Localization and regulation of MuSK at the neuromuscular junction. **Dev. Biol.**, v. 199, n. 2, p. 309-319, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENNAN, J. E.; CHAO, D. S.; GEE, S. H.; MCGEE, A. W.; CRAVEN, S. E.; SANTILLANO, D. R.; WU, Z.; XIA, H.; PETERS, M. F.; FROEHNER, S. C.; BRETT, D. S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, v. 84, n. 5, p. 757-767, 1996.

BROMANN, P. A.; ZHOU, H.; SANES, J. R. Kinase- and rapsyn-independent activities of the muscle-specific kinase (MuSK). **Neuroscience**, v. 125, n. 2, p. 417-426, 2004.

BRYDON, L.; ROKA, F.; PETIT, L.; COPPET, P.; TISSOT, M.; BARRETT, P.; MORGAN, P. J.; NANOFF, C.; STROSBERG, A. D.; JOCKERS, R. Dual signaling on human Mel 1a melatonin receptors via G_{i2}, G_{i3} and G_{q11} proteins. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, n. 12, p. 2025-2038, 1999.

BUBENIK, G. A.; BALL, R. O.; PANG, S. F. The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 12, n. 1, p. 7-16, 1992.

CALI, J. J.; ZWAAGSTRA, J. C.; MONS, N.; COOPER, D. M.; KRUPINSKI, J. Type VIII adenylyl cyclase. A Ca²⁺/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 16, p. 12190-12195, 1994.

CAMACHO, P.; LIU, Y.; MANDEL, G.; BREHM, P. The epsilon subunit confers fast channel gating on multiple classes of acetylcholine receptors. **J. Neurosci.**, v. 13, n. 2, p. 605-613, 1993.

CARDINALI, D. P.; VACAS, M. I.; BOYER, E. E. Specific binding of melatonin in bovine brain. **Endocrinology**, v. 105, n. 2, p. 437-441, 1979.

CARNEIRO, R. C.; MARKUS, R. P. Presynaptic nicotinic receptors involved in release of noradrenaline and ATP from the prostatic portion of the rat vas deferens. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 255, n. 1, p. 95-100, 1990.

CARNEIRO, R. C.; CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R. P. Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal fuction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 259, n. 2, p. 614-619, 1991.

CARNEIRO, R. C.; MARKUS, R. P.; DUBOCOVICH, M. L. Presynaptic modulation by melatonin of the nicotine-induced calcium-dependent release of norepinephrine from rat vas deferens. **Biol. Signals**, v. 2, n. 4, p. 199-206, 1993.

CARNEIRO, R. C. G.; TOFFOLETO, O.; CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R. P. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 257, n. 1-2, p. 73-77, 1994.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.**, v. 8, n. 3, p. 537-539, 2004.

CASSONE, V. M.; CHESWORTH, M. J.; ARMSTRONG, S. M. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. **Physiol. Behav.**, v. 36, n. 6, p. 1111-1121, 1986.

CASSONE, V. M. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. **TINS**, v. 13, n. 11, p. 457-464, 1990.

CHANGEUX, J. P.; GIRAUDAT, J.; DENNIS, M. The nicotinic acetylcholine receptor: molecular architecture of a ligand-regalated ion channel. **TIPS**, v. 8, p. 459-464, 1987.

CHEN, J.; IYENGAR, R. Inhibition of cloned adenylyl cyclases by mutant-activated Gi-alpha and specific suppression of type 2 adenylyl cyclase inhibition by phorbol ester treatment. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 17, p. 12253-12256, 1993.

COHEN, M.; ROSELLE, D.; CHABNER, B.; SCHMIDT, T. J.; LIPPMAN, M. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. **Nature**, v. 274, n. 5674, p. 894-895, 1978.

COLLEDGE, M.; FROEHNER, S. C. Signals mediating ion channel clustering at the neuromuscular junction. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 8, n. 3, p. 357-363, 1998.

COSTA, E. J.; LOPES, R. H.; LAMY-FREUND, M. T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 19, n. 3, p. 123-126, 1995.

COSTA, V. L. Jr.; LAPA, A. J.; GODINHO, R. O. Short- and long-term influences of calcitonin gene-related peptide on the synthesis of acetylcholinesterase in mammalian myotubes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, n. 2, p. 229-236, 2001.

DECKER, E. R.; DANI, J. A. Calcium permeability of the nicotinic acetylcholine receptor: the single-channel calcium influx is significant. **J. Neurosci.**, v. 10, n. 10, p. 3413-3420, 1990.

DEFER, N.; BEST-BELPOMME, M.; HANOUNE, J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, n. 3, p. 400-416, 2000.

DUBINSKY, J. M.; FISCHBACH, G. D. A role for cAMP in the development of functional neuromuscular transmission. **J. Neurobiol.**, v. 21, n. 3, p. 414-426, 1990.

DUBOCOVICH, M. L. Pharmacology and function of melatonin receptors. **FASEB J.**, v. 2, n. 12, p. 2765-2773, 1988.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, n. 2, p. 50-56, 1995.

DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; IACOB, S.; SAURI, D. M. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel 1a and Mel 1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 355, n. 3, p. 365-375, 1997.

DUBOCOVICH, M. L.; YUN, K.; AL-GHOUL, W. M.; BENLOCIF, S.; MASANA, M. I. Selective MT₂ melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p. 1211-1220, 1998.

DUBOCOVICH, M. L.; CARDINALI, D. P.; DELAGRANGE, P.; KRAUSE, A. D.; STROSBERG, A. D.; SUDGEN, D.; YOCCA, F. D. **The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification**. 2. ed. Londres: IUPHAR Media, 2000. p. 187-193.

FALLON, J. R.; HALL, Z. W. Building synapses: agrin and dystroglycan stick together. **Trends Neurosci.**, v. 17, n. 11, p. 469-473, 1994.

FERREIRA, Z. S.; CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R. P. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, n. 1, p. 107-110, 1994.

FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Characterisation of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 415, n. 2-3, p. 151-156, 2001.

FERREIRA, Z. S.; GARCIA, C. R.; SPRAY, D. C.; MARKUS, R. P. P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. **Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 33-37, 2003.

FONTAINE, B.; KLARSFELD, A.; HOKFELT, T.; CHANGEUX, J. P. Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. **Neurosci. Lett.**, v. 71, n. 1, p. 59-65, 1986.

FONTAINE, B.; KLARSFELD, A.; CHANGEUX, J. P. Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor α - subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. **J. Cell Biol.**, v. 105, n. 3, p. 1337-1342, 1987.

FULTON, D.; GRATTON, J. P.; SESSA, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 299, n. 3, p. 818-824, 2001.

FUMAGALLI, G.; BALBI, S.; CANGIANO, A.; LOMO, T. Regulation of turnover and number of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. **Neuron**, v. 4, n. 4, p. 563-569, 1990.

GAO, B. N.; GILMAN, A. G. Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 22, p. 10178-10182, 1991.

GARCIA-MAURINO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 574-581, 1997.

GARCIA-MAURINO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. **J. Neuroimmunol.**, v. 92, n. 1-2, p. 76-84, 1998.

GLASS, D. J.; DECHIARA, T. M.; STITT, T. N.; DISTEFANO, P. S.; VALENZUELA, D. M.; YANCOPOULOS, G. D. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** v. 61, p. 435-444, 1996.

GLASS, D. J.; APEL, E. D.; SHAH, S.; BOWEN, D. C.; DECHIARA, T. M.; STITT, T. N.; SANES, J. R.; YANCOPOULOS, G. D. Kinase domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) is sufficient for phosphorylation but not clustering of acetylcholine receptors: required role for the MuSK ectodomain? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 16, p. 8848-8853, 1997.

GODINHO, R. O.; COSTA, V. L. JR. Regulation of intracellular cyclic AMP in skeletal muscle cells involves the efflux of cyclic nucleotide to the extracellular compartment. **Br. J. Pharmacol.**, v. 138, n. 5, p. 995-1003, 2003.

GREEN, D. J.; GILLETTE, R. Circadian rhythms of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. **Brain Res.**, v. 254, n. 1, p. 198-200, 1982.

GROOS, G.; HENDRIKS, J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. **Neurosci. Lett.**, v. 34, n. 3, p. 283-288, 1982.

GU, C.; COOPER, D. M. Calmodulin-binding sites on adenylyl cyclase type VIII. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 12, p. 8012-8021, 1999.

GUERRERO, J. M.; POZO, D.; GARCIA-MAURINO, S.; CARRILLO, A.; OSUNA, C.; MOLINERO, P.; CALVO, J. R. Nuclear receptors are involved in the enhanced IL-6 production by melatonin in U937 cells. **Biol. Signals Recept.**, v. 9, n. 3-4, p. 197-202, 2000.

HACKER, B. M.; TOMLINSON, J. E.; WAYMAN, G. A.; SULTANA, R.; CHAN, G.; VILLACRES, E.; DISTECHE, C.; STORM, D. R. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). **Genomics**, v. 50, n. 1, p. 97-104, 1998.

HANOUNE, J.; POUILLE, Y.; TZAVARA, E.; SHEN, T.; LIPSKAYA, L.; MIYAMOTO, N.; SUZUKI, Y.; DEFER, N. Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 128, n. 1-2, p. 179-194, 1997. Review.

HEGSTROM, C. D.; BREEDLOVE, S. M. Short day lengths delay development of the SNB neuromuscular system in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*. **J. Neurobiol.**, v. 35, n. 4, p. 355-360, 1998.

HOCH, W. Molecular dissection of neuromuscular junction formation. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 335-337, 2003.

HOFFMAN, P. W.; RAVINDRAN, A.; HUGANIR, R. L. Role of phosphorylation in desensitization of acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 7, p. 4185-4195, 1994.

HOGG, R. C.; RAGGENBASS, M.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 147, p. 1-46, 2003.

HOPFIELD, J. F.; TANK, D. W.; GREENGARD, P.; HUGANIR, R. L. Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 677-680, 1988.

HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F.; BENÍTEZ-KING, G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. **J. Pineal Res.**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1994.

HUGANIR, R. L. Regulation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein phosphorylation. **J Recept Res.**, v. 7, n. 1-4, p. 241-256, 1987.

HUH, K. H.; FUHRER, C. Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. **Mol. Neurobiol.**, v. 25, n. 1, p. 79-112, 2002.

HUNT, A. E.; AL-GHOUL, W. M.; GILLETTE, M. U.; DUBOCOVICH, M. L. Activation of MT₂ melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. **Am. J. Cell Physiol.**, v. 280, n. 1, p. 110-118, 2001.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O.; ERVASTI, J. M.; LEVEILLE, C. J.; SLAUGHTER, C. A.; SERNETT, S. W.; CAMPBELL, K. P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**, v. 355, n. 6362, p. 696-702, 1992.

INOUE, S. I.; KAWAMURA, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5962-5966, 1979.

JAHANGEER, S.; RODBELL, M. The disaggregation theory of signal transduction revisited: further evidence that G proteins are multimeric and disaggregate to monomers when activated. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 19, p. 8782-8786, 1993.

JENNINGS, C. G.; BURDEN, S. J. Development of the neuromuscular synapse. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 3, n. 1, p. 75-81, 1993.

KERMAN, M.; CIRAK, B.; OZGUNER, M. F.; DAGTEKIN, A.; SUTCU, R.; ALTUNTAS, I.; DELIBAS, N. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? **Exp. Brain Res.**, v. 163, n. 3, p. 406-410, 2005.

KLEIN, D. C.; MOORE, R. Y. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and suprachiasmatic nucleus. **Brain Res.**, v. 174, n. 2, p. 245-262, 1979.

KLEIN, D. C.; SUGDEN, D.; WELLER, J. L. Postsynaptic α adrenergic receptors potentiates the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, n. 2, p. 599-603, 1983.

KRIKORIAN, J. G.; DANIELS, M. P. Reorganization and stabilization of acetylcholine receptor aggregates on rat myotubes. **Dev. Biol.**, v. 131, n. 2, p. 524-538, 1989.

KUMMER, T. T.; MISGELD, T.; LICHTMAN, J. W.; SANES, J. R. Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. **J. Cell. Biol.**, v. 164, n. 7, p. 1077-1087, 2004.

LAMOSOVA, D.; ZEMAN, M.; JURANI, M. Influence of melatonin on chick skeletal muscle cell growth. **Com. Biochem. Physiol.**, v. 118, n. 3, p. 375-379, 1997.

LAROCHELLE, W. J.; FROEHNER, S. C. Determination of the tissue distributions and relative concentrations of the postsynaptic 43-kDa protein and the acetylcholine receptor in Torpedo. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 12, p. 5270-5274, 1986.

LAUFER, R.; CHANGEUX, J. P. Calcitonin gene-related peptide elevates cyclic AMP levels in chick skeletal muscle: possible neurotrophic role for a coexisting neuronal messenger. **EMBO J.**, v. 6, n. 4, p. 901-906, 1987.

LENA, C.; CHANGEUX, J. P. Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor. **Trends Neurosci.**, v. 16, n. 5, p. 181-186, 1993.

LE NOVERE, N.; CORRINGER, P. J.; CHANGEUX, J. P. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. **J. Neurobiol.**, v. 53, n. 4, p. 2587-2591, 2002.

LEON, J.; MACIAS, M.; ESCAMES, G.; CAMACHO, E.; KHALDY, H.; MARTÍN, M.; ESPINOSA, A.; GALLO, M. A.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. **Mol. Pharmacol.**, v. 58, n. 5, p. 967-975, 2000.

LEONARD, J. P.; SALPETER, M. M. Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. **J. Cell Biol.**, v. 82, n. 3, p. 811-819, 1979.

LEONARD, J. P.; SALPETER, M. M. Calcium-mediated myopathy at neuromuscular junctions of normal and dystrophic muscle. **Exp. Neurol.**, v. 76, n. 1, p. 121-138, 1982.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 80, p. 2587-2591, 1958.

LINDSTROM, J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Ion Channels**, v. 4, p. 377-450, 1996.

LINDSTROM, J.; ANAND, R.; GERZANICH, V.; PENG, X.; WANG, F.; WELLS, G. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Prog. Brain Res.**, v. 109, p. 125-137, 1996.

LIPPIELLO, P. M.; FERNANDES, K. G. The binding of L-[3H]nicotine to a single class of high affinity sites in rat brain membranes. **Mol. Pharmacol.**, v. 29, n. 5, p. 448-454, 1986.

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. **Biochem. Cell Biol.**, v. 78, n. 4, p. 447-453, 2000.

LOTUFO, C. M.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H.; MARKUS, R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 430, n. 2-3, p. 351-357, 2001.

LU, B.; FU, W. M.; GREENGARD, P.; POO, M. M. Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction. **Nature**, v. 363, n. 6424, p. 76-79, 1993.

LUCK, G.; HOCH, W.; HOPF, C.; BLOTTNER, D. Nitric oxide synthase (NOS-1) coclustered with agrin-induced AChR-specializations on cultured skeletal myotubes. **Mol. Cell Neurosci.**, v. 16, n. 3, p. 269-281, 2000.

MARCHAND, S.; BIGNAMI, F.; STETZKOWSKI-MARDEN, F.; CARTAUD, J. The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 2, p. 521-528, 2000.

MARKUS, R. P.; ZAGO, W. M.; CARNEIRO, R. C. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rats vas deferens. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 279, n. 1, p. 18-22, 1996.

MARKUS, R. P.; SANTOS, J. M.; ZAGO, W.; RENO, L. A. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [3H] glutamate release in rat cerebellum slices. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, n. 2, p. 525-530, 2003.

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; CECON, E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007.

MARTINOU, J. C.; FALLS, D. L.; FISCHBACH, G. D.; MERLIE, J. P. Acetylcholine receptor-inducing activity stimulates expression of the epsilon-subunit gene of the muscle acetylcholine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 17, p. 7669-7673, 1991.

MARTINS, E. Jr.; FERREIRA, A. C.; SKORUPA, A. L.; AFECHÉ, S. C.; CIPOLLANETO, J.; COSTA ROSA, L. F. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 6, p. 1116-1121, 2004.

MASELLI, R. A.; DUNNE, V.; PASCUAL-PASCUAL, S. I.; BOWE, C.; AGIUS, M.; FRANK, R.; WOLLMANN, R. L. Rapsyn mutations in myasthenic syndrome due to impaired receptor clustering. **Muscle Nerve**, v. 28, p. 293-301, 2003.

MCCUDDEN, C. R.; HAINS, M. D.; KIMPLE, R. J.; SIDEROVSKI, D. P.; WILLARD, F. S. G protein signaling: back to the future. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 62, n. 5, p. 551-577, 2005.

MENEDEZ-PELAEZ, A.; POEGGELER, B.; REITER, R. J.; BARLOW-WALDEN, L.; PABLOS, M. I.; TAN, D. X. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. **J. Cell Biochem.**, v. 53, n. 4, p. 373-382, 1993.

MERLIE, J. P.; SANES, J. R. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. **Nature**, v. 317, n. 6032, p. 66-68, 1985.

MILES, K.; ANTHONY, D. T.; RUBIN, L. L.; GREENGARD, P.; HUGANIR, R. L. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor phosphorylation in rat myotubes by forskolin and cAMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 18, p. 6591-6595, 1987.

MOORE, R. Y.; KLEIN, D. C. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Brain Res.**, v. 71, n. 1, p. 17-33, 1974.

MOORE, R. Y. The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. **Trends Neurosci.**, v. 5, p. 404-407, 1982.

MORLEY, B. J.; GARNER, L. L. Light-Dark variation in response to chronic nicotine treatment and the density of hypothalamic α -bungarotoxin receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 37, n. 2, p. 239-245, 1990.

MORTANI, E. J.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 401, n. 1, p. 59-62, 2000.

MULLE, C.; BENOIT, P.; PINSET, C.; ROA, M.; CHANGEUX, J. P. Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 15, p. 5728-5732, 1988.

NEER, E. J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 999-1000, 1995.

NEW, H. V.; MUDGE, A. W. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. **Nature**, v. 323, n. 6091, p. 809-811, 1986.

NONNO, R.; PANNACCI, M.; LUCINI, V.; ANGELONI, D.; FRASCHINI, F.; STANKOV, B. M. Ligand efficacy and potency at recombinant human MT2 melatonin receptors: evidence for agonist activity of some mt1-antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 5, p. 1288-1294, 1999.

NOSJEAN, O.; FERROS, M.; COGÉ, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J.; LEFOULON, F.; FAUCHÈRE, J.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J. A. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 40, p. 31311-31317, 2000.

NOSJEAN, O.; NICOLAS, J. P.; KLUPSCH, F.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BAUTIN, J. A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, n. 11, p. 1369-1379, 2001.

OHLENDIECK, K.; ERVASTI, J. M.; MATSUMURA, K.; KAHL, S. D.; LEVEILLE, C. J.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. **Neuron**, v. 7, n. 3, p. 499-508, 1991.

OKATANI, Y.; OKAMOTO, K.; HAYADHI, K.; WAKATSUKI, A.; TAMURA, S.; SAGAR, Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. **J. Pineal Res.**, v. 25, n. 3, p. 129-134, 1998.

OLAKOWSKA, E.; MARCOL, W.; KOTULSKA, K.; LEWIN-KOWALIK, J. The role of melatonin in the neurodegenerative diseases. **Bratisl. Lek. Listy**, v. 106, n. 4-5, p. 171-174, 2005.

OLSON, E.; EDMONDSON, D.; WRIGHT, W. E.; LIN, V. K.; GUENET, J. L.; SIMON-CHAZOTTES, D.; THOMPSON, L. H.; STALLINGS, R. L.; SCHROEDER, W. T.; DUVIC, M. Myogenin is in an evolutionarily conserved linkage group on human chromosome 1q31-q41 and unlinked to other mapped muscle regulatory factor genes. **Genomics**, v. 8, n. 3, p. 427-434, 1990.

O'MALLEY, J. P.; RUBIN, L. L.; SALPETER, M. M. Two populations of AChR in rat myotubes have different degradation rates and responses to cAMP. **Exp. Cell Res.**, v. 208, n. 1, p. 44-47, 1993.

O'MALLEY, J. P.; MOORE, C. T.; SALPETER, M. M. Stabilization of acetylcholine receptors by exogenous ATP and its reversal by cAMP and calcium. **J. Cell Biol.**, v. 138, n. 1, p. 159-165, 1997.

PANG, S. F.; DUBOCOVICH, M. L.; BROWN, G. M. Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research. **Biol. Signals**, v. 2, n. 4, p. 177-180, 1993.

PENG, H. B. Participation of calcium and calmodulin in the formation of acetylcholine receptor clusters. **J. Cell Biol.**, v. 98, n. 2, p. 550-557, 1984.

PENG, H. B.; FROEHNER, S. C. Association of the postsynaptic 43K protein with newly formed acetylcholine receptor clusters in cultured muscle cells. **J. Cell Biol.**, v. 100, n. 5, p. 1698-1705, 1985.

PERRY, R. L.; RUDNICK, M. A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. **Front. Biosci.**, v. 5, p. 750-767, 2000.

PITCHFORD, S.; DAY, J. W.; GORDON, A.; MOCHLY-ROSEN, D. Nicotinic acetylcholine receptor desensitization is regulated by activation-induced extracellular adenosine accumulation. **J. Neurosci.**, v. 12, n. 11, p. 4540-4544, 1992.

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. **J. Pineal Res.**, v. 33, n. 1, p. 20-30, 2002.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **J. Pineal Res.**, v. 41, n. 2, p. 136-141, 2006.

POPOVA, J. S.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. **J. Neurochem.**, v. 64, n. 1, p. 130-138, 1995.

POZO, D.; REITER, R. J.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. **J. Cell Biochem.**, v. 65, n. 3, p. 430-442, 1997.

PROVENCIO, I.; RODRIGUEZ, I. R.; JIANG, G.; HAYES, W. P.; MOREIRA, E. F.; ROLLAG, M. D. A novel human opsin in the inner retina. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 2, p. 600-605, 2000.

RAFII-EL-IDRISSI, M.; CALVO, J. R.; HARMOUCH, A.; GARCIA-MAURINO, S.; GUERRERO, J. M. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. **J. Neuroimmunol.**, v. 86, n. 2, p. 190-197, 1998.

RAMARAO, M. K.; BIANCHETTA, M. J.; LANKEN, J.; COHEN, J. B. Role of rapsyn tetratricopeptide repeat and coiled-coil domains in self-association and nicotinic acetylcholine receptor clustering. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 10, p. 7475-7483, 2001.

REDMAN, J. R.; ARMSTRONG, S. Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 5, n. 2, p. 203-215, 1988.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654-664, 1993.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; OI, W.; MANCHESTER, L. C.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J. R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. **Biol. Signals Recept.**, v. 9, n. 3-4, p. 160-171, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mech. Ageing Dev.**, v. 123, n. 8, p. 1007-1019, 2002.

RENO, L. A.; ZAGO, W.; MARKUS, R. P. Release of [(3)H]-L-glutamate by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat cerebellar slices. **Neuroscience**, v. 124, n. 3, p. 647-653, 2004.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1177-1185, 1994.

REPPERT, S. M.; GODSON, C.; MAHLE, C. D.; WEAVER, D. R.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel 1b melatonin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 19, p. 8734-8738, 1995.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, n. 3, p. 100-102, 1996.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935-941, 2002.

ROA, M.; CHANGEUX, J. P.; Characterization and developmental evolution of a high-affinity binding site for calcitonin gene-related peptide on chick skeletal muscle membrane. **Neuroscience**, v. 41, n. 2-3, p. 563-570, 1991.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2004. Review.

ROKA, F.; BRYDON, L.; WALDHOER, M.; STROSBURG, A. D.; FREISSMUTH, M.; JOCKERS, R.; NANOFF, C. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 5, p. 1014-1024, 1999.

ROLE, L. W. Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 2, n. 3, p. 254-262, 1992.

SAFRAN, A.; PROVENZANO, C.; SAGI-EISENBERG, R.; FUCHS, S. Phosphorylation of membrane-bound acetylcholine receptor by protein kinase C: characterization and subunit specificity. **Biochemistry**, v. 29, n. 28, p. 6730-6734, 1990.

SAMPAIO, L. F.; HAMASSAKI-BRITO, D. E.; MARKUS, R. P. Influence of melatonin on the development of functional nicotinic acetylcholine receptors in cultured chick retinal cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 4, p. 603-613, 2005.

SANDROCK, A. W. Jr.; DRYER, S. E.; ROSEN, K. M.; GOZANI, S. N.; KRAMER, R.; THEILL, L. E.; FISCHBACH, G. D. Maintenance of acetylcholine receptor number by nurogulins at the neuromuscular junction in vivo. **Science**, v. 276, n. 5312, p. 599-603, 1997.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 22, p. 389-442, 1999. Review.

SCHULTZ, T. F.; KAY, S. A. Circadian clocks in daily and seasonal control of development. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 326-328, 2003.

SHIBATA, S.; OOMURA, Y.; KITA, H.; HATTORI, K. Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. **Brain Res.**, v. 247, n. 1, p. 154-158, 1982.

SHIDA, C. S.; CASTRUCCI, A. M.; LAMY-FREUND, M. T. High melatonin solubility in aqueous medium. **J. Pineal Res.**, v. 16, n. 4, p. 198-201, 1994.

SMIRNOV, A. N. Nuclear melatonin receptors. **Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 19-26, 2001. Review.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STEINHILBER, D.; BRUNGS, M.; WERZ, O.; WIESENBERG, I.; DANIELSSON, C.; KAHLEN, J. P.; NAYERI, S.; SCHRADER, M.; CARLBERG, C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 13, p. 7037-7040, 1995.

SUNAHARA, R. K.; TAUSSIG, R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. **Mol. Interv.**, v. 2, n. 3, p. 168-184, 2002.

SUZUKI, Y.; SHEN, T.; POYARD, M.; BEST-BELPOMME, M.; HANOUNE, J.; DEFER, N. Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 6, p. 1674-1685, 1998.

TAI, H. H.; CONNOLLY, J. A. Calmodulin and acetylcholine receptor clustering in embryonic chick myotubes. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 41, n. 2, p. 246-251, 1986.

TAKAMI, K.; KAWAI, Y.; UCHIDA, S.; TOHYAMA, M.; SHIOTANI, Y.; YOSHIDA, H.; EMSON, P. C.; GIRGIS, S.; HILLYARD, C. J.; MACINTYRE, I. Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse. **Neurosci. Lett.**, v. 60, n. 2, p. 227-230, 1985.

TAKAMORI, M.; YOSHIKAWA, H. Effect of calcitonin gene-related peptide on skeletal muscle via specific binding site and G protein. **J. Neurol. Sci.**, v. 90, n. 1, p. 99-109, 1989.

TAMARKIN, L.; BAIRD, C. J.; ALMEIDA, O. F. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? **Science**, v. 227, n. 4688, p. 714-720, 1985.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; PLUMMER, B. F.; HARDIES, L. J.; WEINTRAUB, S. T.; VIJAYALAXMI; SHEPHERD, A. M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 253, n. 3, p. 614-620, 1998.

TAUSSIG, R.; INIGUEZ-LLUHI, J. A.; GILMAN, A. G. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. **Science**, v. 261, n. 5118, p. 218-221, 1993.

TINSLEY, J. M.; BLAKE, D. J.; ROCHE, A.; FAIRBROTHER, U.; RISS, J.; BYTH, B. C.; KNIGHT, A. E.; KENDRICK-JONES, J.; SUTHERS, G. K.; LOVE, D. R. Primary structure of dystrophin-related protein. **Nature**, v. 360, n. 6404, p. 591-593, 1992.

TZAVARA, E. T.; POUILLE, Y.; DEFER, N.; HANOUNE, J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 20, p. 11208-11212, 1996.

UCHIDA, S.; YAMAMOTO, H.; IIO, S.; MATSUMOTO, N.; WANG, X. B.; YONEHARA, N.; IMAI, Y.; INOKI, R.; YOSHIDA, H. Release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive substance from neuromuscular junction by nerve excitation and its action on striated muscle. **J. Neurochem.**, v. 54, n. 3, p. 1000-1003, 1990.

VAKKURI, O.; LEPPALUOTO, J.; VUOLTEENAHONEN, O. Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. **Acta Endocrinol.**, v. 106, n. 2, p. 152-157, 1984.

VANECEK, J.; SUGDEN, D.; WELLER, J.; KLEIN, D. C. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in rat pinealocytes. **Endocrinology**, v. 116, n. 6, p. 2167-2173, 1985.

VORHERR, T.; KNOPFEL, L.; HOFMANN, F.; MOLLNER, S.; PFEUFFER, T.; CARAFOLI, E. The calmodulin binding domain of nitric oxide synthase and adenylyl cyclase. **Biochemistry**, v. 32, n. 23, p. 6081-6088, 1993.

WALLACE, B. G. Agrin-induced specializations contain cytoplasmic, membrane, and extracellular matrix-associated components of the postsynaptic apparatus. **J. Neurosci.**, v. 9, n. 4, p. 1294-1302, 1989.

WITZEMANN, V.; STEIN, E.; BARG, B.; KONNO, T.; KOENEN, M.; KUES, W.; CRIADO, M.; HOFMANN, M.; SAKMANN, B. Primary structure and functional expression of α -, β -, γ -, δ - and ϵ -subunit of the acetylcholine receptors from the rat muscle. **Eur. J. Biochem.**, v. 994, n. 2, p. 437-448, 1990.

WU, Z.; WONG, S. T.; STORM, D. R. Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 32, p. 23766-23768, 1993.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J. The formation, metabolism and physiologic effects of melatonin. **Adv. Pharmacol.**, v. 6, p. 141-151, 1968.

XU, R.; SALPETER, M. M. Protein kinase A regulates the degradation rate of Rs acetylcholine receptors. **J. Cell Physiol.**, v. 165, n. 1, p. 30-39, 1995.

YOSHIHARA, C. M.; HALL, Z. W. Increased expression of the 43-kD protein disrupts acetylcholine receptor clustering in myotubes. **J. Cell Biol.**, v. 122, n. 1, p. 169-179, 1993.

ZAGO, W. M.; MARKUS, R. P. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors located on short noradrenergic neurons of the rat vas deferens: a pharmacological characterization. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 8, p. 999-1006, 1999.

ZHANG, S.; LI, W.; GAO, Q.; WEI, T. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 501, n. 1-3, p. 25-30, 2004.

ANEXO

Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin

Lidiana Duarte de Almeida-Paula^a, Leticia V. Costa-Lotuf^{a,b}, Zulma Silva Ferreira^a,
Amanda Elisa G. Monteiro^a, Mauro Cesar Isoldi^a, Rosely O. Godinho^c, Regina P. Markus^{a,*}

^a Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^c Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Received 11 August 2005; received in revised form 12 September 2005; accepted 21 September 2005

Abstract

Melatonin, the pineal gland hormone, modulates α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors in sympathetic nerve terminals, cerebellum and chick retina imposing a diurnal variation in functional responses [Markus, R.P., Zago, W.M., Carneiro, R.C., 1996. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 18–22; Markus, R.P., Santos, J. M., Zago, W., Reno, L.A., 2003. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [³H] glutamate release in rat cerebellum slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 525–530; Sampaio, L.F.S., Hamassaki-Britto, D.E., Markus, R.P., 2005. Influence of melatonin on the development of functional nicotinic acetylcholine receptors in cultured chick retinal cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 603–613]. Here we show that in rat myotubes forskolin and melatonin reduced the number of nicotinic acetylcholine receptors expressed in plasma membrane. In addition, these cells expressed melatonin MT₁ receptors, which are known to be coupled to G_i-protein. However, the pharmacological profile of melatonin analogs regarding the reduction in cyclic AMP accumulation and number of nicotinic acetylcholine receptors did not point to a mechanism mediated by activation of G_i-protein coupled receptors. On the other hand, calmidazolium, a classical inhibitor of calmodulin, reduced in a similar manner both effects. Considering that one isoform of adenylyl cyclase present in rat myotubes is regulated by Ca²⁺/calmodulin, we propose that melatonin modulates the number of nicotinic acetylcholine receptors via reduction in cyclic AMP accumulation.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Melatonin; Nicotinic acetylcholine receptor; α -Bungarotoxin; Myotube culture; Cyclic AMP; Calmodulin

1. Introduction

Many biological processes follow diurnal rhythms related to the light–dark cycle. Melatonin, the hormone released at night by the pineal gland, is the marker of darkness (Simonneaux and Ribelayga, 2003). Darkness is associated with alterations in the number and function of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hypothalamus (Morley and Gamer, 1990), cerebellum (Markus et al., 2003) and vas deferens (Carneiro et al., 1991). In the vas deferens, maximal

contraction induced by activation of nicotinic acetylcholine receptors increases at night, through a melatonin-dependent pathway (Carneiro et al., 1991, 1993). Administration of melatonin at night restores the diurnal rhythm response in the vas deferens from animals deprived of endogenous melatonin (Carneiro et al., 1994). In the rat cerebellum, stimulation of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors increases the nocturnal release of glutamate which is abolished by procedures that block nocturnal surge of melatonin, such as constant lighting or inhibition of β adrenoreceptors (Markus et al., 2003). Melatonin also modulates the numbers of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the rat vas deferens (Markus et al., 1996), cerebellum (Markus et al., 2003) and in chick retina culture (Sampaio et al., 2005).

Distinct signaling transduction pathways, such as activation of G-protein coupled receptors (Dubocovich et al., 2000)

* Corresponding author. Full address: Laboratory of Chronopharmacology, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, travessa 14, 321, Cidade Universitária São Paulo-SP, Brasil, CEP: 05508-900. Tel./fax: +55 11 3091 7612.

E-mail address: rpmarkus@usp.br (R.P. Markus).

and inhibition of Ca^{2+} /calmodulin interaction (Benitez-King et al., 1996) mediates melatonin effects. Melatonin and 2-iodomelatonin activate both G_i -protein coupled MT1 and MT2 receptors, while 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) is selective for the MT2 receptor (Dubocovich, 1995; Lotufo et al., 2001). Differently from the MT1 and MT2 receptors, the putative MT3 melatonin receptors, characterized as a binding site for some analogs (Nosjean et al., 2000; Barrenetxe et al., 2004) shows a distinct pharmacological profile, with high affinity for *N*-acetylserotonin and high selectivity for the agonist 5-methoxycarbonylamino-*N*-acetyltryptamine (5-MCA-NAT) (Dubocovich, 1995). Luzindole blocks all these responses (Witt-Enderby et al., 2003).

In order to study the action mechanism of melatonin on the membrane expression of nicotinic acetylcholine receptors we used the rat cultured myotubes which express an homogeneous population of α -bungarotoxin sensitive receptors, localized in clusters associated with calmodulin-dependent nitric oxide synthase (Luck et al., 2000) and cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) (Perkins et al., 2001). In this model, appropriate expression of nicotinic acetylcholine receptors is modulated by cyclic AMP and calmodulin-dependent mechanisms (Kang et al., 2003; Tang et al., 2001).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Melatonin, *N*-acetylserotonin, 2-iodomelatonin, α -bungarotoxin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, cytosine-B-D-arabinofuranoside hydrochloride (ARA-C), bovine serum albumin, 1-bromo-3-chloropropane (BCP), sodium nitroprusside dehydrate (SNP) and isopropanol were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT), luzindole (*N*-acetyl-2-benzytryptamine), 5-methoxy-carbonylamino-*N*-acetyltryptamine (5-MCA-NAT) and forskolin were from Tocris, Ballwin, MO, USA. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal calf serum, horse serum, collagenase, gentamicin reagent solution and Trizol™ Reagent were purchased from GIBCO BRL Products. Grand Island, NY, USA. 3- ^{125}I iodotyrosyl α -bungarotoxin (specific activity 2000 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear, Boston, MA, USA. Pertussis toxin and calmidazolium chloride were from Calbiochem. Darmstadt, Germany. DEPC water and DNA-free kit were purchased from Ambion, Austin, TX, USA. Cyclic AMP and cyclic GMP kits were from BIOTRAK-Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England.

2.2. Skeletal muscle culture

Primary skeletal muscles were obtained from hindlimb muscles of newborn rats as described by da Costa et al. (2001). Briefly, the hindlimbs were removed, minced and incubated for 2 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 90% air and 10% CO_2 with collagenase (200 U/ml) diluted in Hank's balanced salt solution plus 3 mM CaCl_2 . Then, the cell

suspension was centrifuged (700 g, 5 min), the pellet was resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 10% horse serum and 40 mg/l gentamicin, and the myoblasts (10^6 cells/well, 24 wells plate) were plated. The medium was replaced on the third day by DMEM supplemented with 8% horse serum, 2% fetal calf serum and 1 μM cytosine-B-D-arabinofuranoside hydrochloride.

On the fourth day, cells were incubated with a cytosine-B-D-arabinofuranoside hydrochloride free medium. All experiments were performed with 5–6-day-old differentiated cultured skeletal muscle cells.

2.3. ^{125}I - α -Bungarotoxin binding sites

In this assay, 10^6 cells/well were incubated for 1 h in Krebs solution (mM, NaCl 116, KCl 4.6, MgCl_2 1.5, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.0, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 0.8, glucose 11, pH 7.4, 37 °C) with 4 nM 3- ^{125}I iodotyrosyl α -bungarotoxin in the absence, or presence of 0.1 μM unlabeled α -bungarotoxin. Cells washed three times with Krebs solution were resuspended in deionized water, immersed in scintillation cocktail (Ecolume, ICN Biomedicals, CO, USA) and radioactive was counted (Packard, TriCarb 2100TR, Downers Grove, Illinois, USA). Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) and the results were expressed as fmol/mg protein.

2.4. Cyclic AMP and cyclic GMP content

Cultured myotubes (10^6 cells/well) were rinsed two times with Krebs solution, pre-incubated with 1 mM 1-3-isobutyl-1-methylxanthine for 15 min and treated with melatonin (0.01–3 nM), *N*-acetylserotonin (0.1–1 nM), 4-P-PDOT (1–100 nM), or vehicle, in the presence or absence of forskolin (10 μM) for 5 min. When mentioned, the cells were incubated in pertussis toxin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight in a serum-free medium, before the addition of melatonin. Cyclic AMP or cyclic GMP from the samples was determined using the cyclic AMP or cyclic GMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) system. The results were expressed as a percentage of forskolin-induced increase in cyclic AMP or cyclic GMP basal levels shown as pmol/well.

2.5. Extraction of total RNA

Total RNA was extracted from cultured myotubes and pineal glands with Trizol™ Reagent. The samples received 134 μl of 1-bromo-3-chloropropane (BCP) and after centrifugation (12,000 $\times$ g, 15 min, 4 °C) the RNA present in the aqueous phase was precipitated with isopropanol. The pellet was rinsed twice in ethanol, resuspended in diethylpyrocarbonate (DEPC) water and treated with DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, USA), for removal of DNA contamination. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with 1 μg of total RNA, 0.5 μl of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ random primers, 1 μl of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) mix, 2 μl of 10 $\times$ PCR buffer, 2 μl of 10 mM dithiothreitol, 1 μl of 20 U/ μl

ribonuclease inhibitor, and 1 μ l of Superscript II reverse transcriptase (200 U, Invitrogen) for a final volume of 20 μ l.

2.6. Polymerase chain reaction

Oligonucleotide primers were designed using Primer 3 software (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi), based on the sequences obtained from the GenBank database accession numbers AF130341 (MT1) and AF141863 (MT2) (National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine National Institutes of Health, www.ncbi.nlm.nih.gov) as follows: receptor MT1; 5'-AAC.CTG.CTG.GTC.ATC.CTG.TC-3' (sense), 5'-GAC.ACT.CAG.GCC.CAT.TAG.GA-3' (anti-sense) and receptor MT2: 5'-CAT.CCA.CTT.CTT.CTT.TCC.AA-3' (sense), 5'-TGC.AAG.GCC.AAT.ACA.GTT.GA-3' (anti-sense). In the polymerase chain reaction, 1 μ l of cDNA, 0.3 μ l of AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 U/ μ l, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England), 4 μ l of 1.25 mM dNTP mix, 2 μ l of each primer (10 pmol/ μ l), 2.5 μ l of 10 x PCR buffer, and 1.5 μ l of 25 mM MgCl₂ (all Invitrogen) were used for a final volume of 25 μ l. The PCR reaction started with 6 min denaturation at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 s denaturation at 95 °C, 45 s annealing at 60 °C, 1 min extension at 72 °C, ending with a final cycle of 10 min at 72 °C. The PCR was performed with the iCYCLER system (Biorad, Hercules, CA, USA). The size of the PCR products was verified in 1% ethidium bromide-stained 1.5% agarose gels, the band corresponding to the expected size (201 bp for MT1, primer location 123–142 bp and 323–304 bp and 202 bp for MT2, primer location 204–223 bp and 384–405 bp) was excised, and the fragment extracted by centrifugation in 50 μ l filter tips (USA Scientific Inc.). Gel image was captured and digitalized by GEL PRO IMAGE system (Fotodyne Inc., Hartland, USA).

2.7. Cloning and sequencing

The PCR products were then passed through Millipore columns for salt and enzyme removal, eluted with PCR buffer and cloned in pCR II TOP0 vector (TOP0 TA Cloning kit, Invitrogen). The vector was then inserted into competent cells and the bacteria containing the DNA selected by ampicillin resistance and screened by PCR with T7 primer. The purified DNA (Mini-Prep kit, Promega, Madison, WI, USA) was quantified and sequenced in a ABI Prism sequencer (mod 310, ABI, Foster City, CA, USA). The nucleotide sequences were compared to the database of the National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine National Institutes of Health (www.ncbi.nlm.nih.gov) site, using BLAST software.

2.8. Statistical analysis

$B_{\max}$ and K_d values were calculated by the GRAPHPAD program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA). The differences between experimental groups were compared by Student's *t* test (comparison of two means) or analysis of

variance followed by Newman–Keuls (comparison of more than two means). The number of experiments refers to the number of different cultures.

3. Results

3.1. Determination of mRNA for MT1 and MT2 receptors

Rat myotube and pineal gland (control) PCR products presented bands of the expected size for MT1 receptor (201 bp), while the size for MT2 receptor followed the pattern only in the pineal gland. The band obtained with myotubes cDNA presented a larger size (Fig. 1). When PCR products were cloned and sequenced, the comparison to the GenBank database confirms a 100% of homology (accession number AF130341) for MT1 mRNA from rat myotubes and MT1 and MT2 receptors from the pineal gland. Therefore, no effect can be mediated by MT2 melatonin receptor, as it is not expressed in this model.

3.2. Effect of melatonin and analogs on the number of α -bungarotoxin binding sites

The binding of [¹²⁵I]- α -bungarotoxin to cultured myotubes was saturable and presented a high specificity ($B_{\max}$ = 645 fmol/mg protein, and K_d = 3.2 nM) (Fig. 2). Treatment of cultures with melatonin (0.1–30 nM) for 8 h reduced the number of sites in a dose-dependent manner (Fig. 3A). The IC₅₀ value for melatonin effect was 0.19 nM (confidence limit (CL) 0.03–1.24 nM), and the maximal reduction in the number of binding sites was 56.4 $\pm$ 5.67%. Incubation of cultures with melatonin (100 nM) for 1, 4 or 6 h did not interfere with the number of nicotinic acetylcholine receptors (data not shown). On the other hand, incubation of melatonin (0.1–100 nM) for 48 h resulted in a 50% reduction in the number of [¹²⁵I]- α -bungarotoxin binding sites in all doses tested (Fig. 3A). Thus, melatonin is able to reduce by 50% the membrane expression of nicotinic acetylcholine receptors, in a time dependent manner which commences after 8 h.

N-acetylserotonin, an agonist that presents higher affinity for MT3 than for MT1 or MT2 receptors, also reduced the number

Fig. 1. RT-PCR analysis of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA expression in rat myotubes (lanes 3 and 5) and pineal gland (lanes 2 and 4), respectively. Lane 1—molecular weight standard; Lane 6—negative control, no template added. Band sizes are correct for rat myotube MT1 and for pineal gland MT1 and MT2.

Fig. 2. Saturation curve to [125 I]- α -bungarotoxin in cultured myotubes. We seeded cells in culture dishes of 24 wells (10^6 cells/well) and kept in culture for 6 days, as described in Materials and methods. The saturation curve was obtained incubating the labeled ligand in the absence (square) or in the presence (triangle) of 0.1 μ M nonlabeled α -bungarotoxin. Specific binding (circle) was calculated as the difference between total and non-specific binding. $B_{\max}$ value = 645 ± 164 , and K_d value = 3.2 ± 1.9 nM. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3–6 different cultures.

of binding sites (Fig. 3B). The IC_{50} value for *N*-acetylserotonin was 2.12 nM (CL: 0.2–24.1 nM) and the maximal reduction of receptors number was $59.57 \pm 11.9\%$. Luzindole (10 μ M), an antagonist of both MT1 and MT2 receptors, blocked melatonin effect (Fig. 3C). Surprisingly, 4P-PDOT, considered a selective ligand for MT2 receptor (Dubocovich, 1995; Lotufo et al., 2001), promoted per se a reduction in the number of α -bungarotoxin binding sites (Fig. 3D), in a system devoid of this receptor.

Fig. 3. Effect of melatonin and analogs on the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites. (A) Melatonin incubated for 8 (squares) or 48 h (triangles) reduced in a time-dependent manner [125 I]- α -bungarotoxin $B_{\max}$. (B) Melatonin (squares, $n=8$) and *N*-acetylserotonin (NAS, triangles, $n=4-12$) reduced in a dose-dependent manner [125 I]- α -bungarotoxin $B_{\max}$. (C) Luzindole (10 μ M) reversed the effect of melatonin ($n=3$). (D) 4P-PDOT promoted the same effect of melatonin ($n=4$). * $P<0.05$. Therefore in this system luzindole is acting as an antagonist and 4P-PDOT as an agonist.

Fig. 4. Effect of forskolin on the number of α -bungarotoxin binding sites. Forskolin (10 μ M, 8 h) increased the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites in cultured rat myotubes, while melatonin (10 nM) reversed this effect. Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. of 3 cultures. * $P<0.05$.

2-iodomelatonin, a high affinity agonist for MT1 and MT2 receptors, which does not cross the membrane (Paul et al., 1999), and 5-MCA-NAT, a selective agonist for MT3 binding sites, (Molinari et al., 1996; Nosjean et al., 2001) did not change the number of α -bungarotoxin binding sites (data not shown).

Considering that: a) only MT1 receptors are expressed in myotubes, b) 2-iodomelatonin, an agonist highly selective for MT1 receptors, has no effect on this system, c) 4P-PDOT, a selective ligand for MT2 receptors, mimics melatonin and *N*-acetylserotonin response, we concluded that the effect of melatonin on nicotinic acetylcholine receptors was not mediated by G-protein coupled receptors.

3.3. Effect of forskolin on the number of α -bungarotoxin binding sites

Forskolin (10 μ M, 8 h) increased the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites in cultured rat myotubes, while melatonin (10 nM) reversed this effect (Fig. 4).

3.4. Effect of melatonin and analogs on the production of cyclic AMP

Forskolin (10 μ M, 5 min) increased cyclic AMP from 0.84 ± 0.09 pmol/well ($n=7$) to 7.7 ± 1.3 pmol/well. Melatonin (0.01–10 nM) and *N*-acetylserotonin (0.1–10 nM), incubated for 5 min with forskolin, inhibited cyclic AMP accumulation in a dose-dependent manner (melatonin IC_{50} value = 2.96 nM; CL: 1.89 to 4.62 nM; *N*-acetylserotonin IC_{50} value = 54.3 pM; CL: 27.4–107 pM). Interestingly, the MT2 antagonist 4P-PDOT (1–100 nM) also inhibited cyclic AMP production (IC_{50} value = 1.47 nM; CL: 1.23–1.76 nM) (Fig. 5). Although luzindole (10 μ M) blocked the effect of melatonin (data not shown), the pharmacological profile of melatonin analogs was not compatible with an action on MT1-melatonin receptors.

Treatment of cells with pertussis toxin (0.5 μ g/ml, overnight) did not change inhibitory effect of melatonin on the production of cyclic AMP induced by forskolin (data not shown); suggesting that melatonin signaling transduction does not involve G_i -protein.

3.5. Effect of melatonin on cyclic GMP production

In myotubes, calmodulin activates nitric oxide synthase with a downstream stimulation of guanylyl cyclase and formation of cyclic GMP (Stamler and Meissner, 2001). Melatonin (1 nM) and calmidazolium (50 μ M), a classical inhibitor of calmodulin, block KCl (30 mM)-induced cyclic GMP accumulation (Fig. 6). On the other hand, neither melatonin nor calmidazolium impaired the effect of sodium nitroprussiate (30 μ M), a nitric oxide donor, which stimulates guanylyl cyclase, in a nitric oxide synthase independent manner.

Fig. 5. Effect of melatonin and analogs on the cyclic AMP level in myotubes stimulated with forskolin (10 μ M). Melatonin (circles), *N*-acetylserotonin (squares), and 4P-PDOT (triangles) inhibit in a dose-dependent manner forskolin-induced cyclic AMP production. Forskolin (10 μ M) induced a production of 7.7 ± 1.3 pmol/ 10^6 cells ($n=7$). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. of 4–6 cultures.

Fig. 6. Effect of melatonin (mel, 1 nM) and calmidazolium (cdz, 50 μ M) on the production of cyclic GMP induced by KCl (30 mM) (A), or sodium nitroprussiate (SNP, 30 μ M) (B). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 3 cultures. * $P < 0.05$ comparing to basal.

3.6. Inhibition of calmodulin mimicked melatonin effect on cyclic AMP production and reduction of the number of nicotinic acetylcholine receptors

The experiments described above strongly suggest that melatonin blocks calmodulin in rat myotubes. Here we tested if calmidazolium (50 μ M) is able to mimic melatonin in reducing the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites and cyclic AMP accumulation. Fig. 7 shows that similarly to melatonin, preincubation of calmidazolium (50 μ M) for a short interval (5 min) reduces cyclic AMP accumulation, and a larger interval (8 h) resulted in a reduction of the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites.

4. Discussion

Time keeping in mammals involves the decodification of diurnal cyclic information delivered by the alternation between

Fig. 7. Calmidazolium effect on forskolin-induced cAMP production and the number of α -bungarotoxin binding sites. The left axis shows the percentage of forskolin (F)-induced production of cyclic AMP in the presence or absence of calmidazolium ($n=4$). The right axis shows the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites expressed as fmol/well ($n=5$). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$.

day and night. In this process, melatonin is secreted only during the dark phase of the day, which makes this hormone the hallmark of darkness (Simonneaux and Ribelayga, 2003). Melatonin signal is translated at the cell level in order to synchronize biological responses. Our previous studies showed that melatonin, at a concentration compatible to nocturnal surge (nM range), modulates neuronal α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic nerve terminals (Zago and Markus, 1999), chick retina (Sampaio et al., 2005) and rat cerebellum (Markus et al., 2003). In contrast, modulation of α -bungarotoxin nonsensitive nicotinic acetylcholine receptor occurs only at mM range of melatonin (Schiller et al., 2003). In order to study the mechanism responsible for melatonin modulation of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors, we used rat myotubes. This culture expresses a homogenous population of nicotinic receptors clustered in association to adenylyl cyclase and nitric oxide synthase (Froehner, 1991), allowing the evaluation of melatonin effect on cyclic AMP and cyclic GMP production and their influence on nicotinic receptor expression.

Our results showed that melatonin reduced the number of nicotinic acetylcholine receptors in a dose- and time-dependent manner. Incubating melatonin for 8 h resulted in a dose-dependent effect (0.1–10 nM), while after 48 h a maximal reduction was attained even with the lower melatonin concentration (0.1 nM). This time-course suggests that melatonin triggers a multi-step cascade, and promotes a cumulative effect.

Agents that rise intracellular levels of cyclic AMP, such as forskolin, increase the number of cell surface nicotinic acetylcholine receptors in mouse fibroblasts containing stably integrated *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptors (Green et al., 1991; Ross et al., 1991). Maximal forskolin-induced increase in membrane-expressed receptors was obtained only after 48 h incubation (Jayawickreme et al., 1994). Here we show that forskolin, incubated for the same interval, also increases the number of membrane-expressed nicotinic acetylcholine receptors in rat myotubes. Interestingly, melatonin reverses both forskolin effects (accumulation of cyclic AMP and increase in the number of membrane expressed nicotinic acetylcholine receptors). The long interval between cyclic AMP signaling (5 min) and receptor reduction (8–48 h) favors a multi-step process.

In spite of a recent report showing that human melatonin MT1 receptors expressed in neuronal cells promotes cyclic AMP accumulation (Schuster et al., 2005), most commonly melatonin MT1 and MT2 receptors are coupled to G_i -proteins, which reduce cyclic AMP accumulation (Simonneaux and Ribelayga, 2003). RT-PCR determination of mRNA and the cloning of the resulting products from rat myotubes showed the presence of melatonin MT1 receptors mRNA, discarding any involvement of myotube melatonin MT2 receptors in the responses here studied.

In order to evaluate the contribution of melatonin MT1 and the putative MT3 receptor we analyzed the pharmacological profile of melatonin analogs. The absence of 5-MCA-NAT effect, as well as, the high potency of *N*-acetylserotonin

discarded the involvement of the putative melatonin MT3 receptor. Melatonin MT1 receptor contribution is also questionable assuming its low affinity to *N*-acetylserotonin and is not sensitive to 4P-PDOT, and its high affinity to 2-iodomelatonin (Masana et al., 2003). Here we observed a high affinity to *N*-acetylserotonin and 4P-PDOT, and no response to 2-iodomelatonin. We reinforced this conclusion showing that pertussis toxin does not block melatonin-induced reduction in cyclic AMP. Therefore, the present data exclude the participation of G_i -protein coupled melatonin receptors in the reduction of forskolin-induced cyclic AMP production. An important conclusion, derived from the present data, is that 4P-PDOT, considered a selective antagonist or partial agonist of melatonin MT2 receptors (Dubocovich, 1995; Lotufo et al., 2001), mimics melatonin effect despite the absence of melatonin MT2. Therefore, this melatonin analog interacts with other melatonin signaling pathways, besides melatonin MT2 receptor.

Several melatonin effects are mediated by inhibition of calmodulin (Benitez-King et al., 1993), which plays a role in the maintenance of nicotinic acetylcholine receptors clusters in rat myotubes and activates some isoforms of adenylyl cyclase. In cultured myotubes, nicotinic acetylcholine receptors form aggregates with scaffold proteins and muscle constitutive nitric oxide synthase (Luck et al., 2000). This enzyme, activated by calmodulin (Fulton et al., 2001), is essential for cluster formation (Peng, 1984; Tai and Connolly, 1986). Regarding adenylyl cyclase, at least nine closely related isoforms have been cloned and characterized in mammals (Sinnarajah et al., 2001), some of them being modulated by Ca^{2+} /calmodulin and/or calcium. Skeletal muscle presents adenylyl cyclase isoforms II, VI, VII and IX (Defer et al., 2000), adenylyl cyclase VI being positively modulated by Ca^{2+} /calmodulin (Beazely and Watts, 2005).

Melatonin binds to calmodulin with high affinity (nM range), promoting several functional effects, such as tubulin polymerization, cytoskeletal rearrangement, inhibition of estrogen receptors, etc. (Benitez-King and Anton-Tay, 1993; Romero et al., 1998; del Rio et al., 2004). In addition, luzindole inhibits [3H]-melatonin binding to calmodulin with a K_i value of 2.7 μ M (Benitez-King et al., 1993). Therefore, the concentrations of melatonin and luzindole here tested are compatible with a calmodulin-dependent effect. In the present report we show evidences for an inhibitory effect of melatonin on nitric oxide-induced cyclic GPM accumulation, a well-known Ca^{2+} /calmodulin activated function relevant to organization of rat myotube (Stamler and Meissner, 2001). Melatonin and the calmodulin blocker, calmidazolium, reduce KCl-induced cyclic AMP accumulation. The effect of the nitric oxide donor, sodium nitroprusiate, was not affected by melatonin. A similar result was obtained in rat cerebellum, where melatonin reduces nitric oxide activity and binds calmodulin (Pozo et al., 1997).

It is interesting to note that in the rat cerebellum, melatonin also reduces the number of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors, imposing a diurnal rhythm in cholinergic function (Markus et al., 2003; Reno et al., 2004). The diurnal variation of acetylcholine-induced glutamate release is lost in constant light, a procedure that impairs nocturnal melatonin surge. The rhythmic release of glutamate is restored

Fig. 8. Myotubes clusters co-localize nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), adenylyl cyclase and constitutive nitric oxide synthase (cNOS), among other proteins (Luck et al., 2000). Inhibition of calmodulin by melatonin (MEL) results in a reduction of cyclic GMP (cGMP) and cyclic AMP (cAMP). The decrease in cyclic AMP that mediates membrane expression of nicotinic acetylcholine receptors, probably by signaling phosphorylation of proteins assisting at the level of folding or assembly of the receptor in the Golgi, will result in a diminution of the number of nicotinic acetylcholine receptors in plasma membrane, i.e., a reduction in the number of [125 I]- α -bungarotoxin binding sites.

by nocturnal administration of melatonin. On the other hand, nicotinic acetylcholine receptors in rat and chick myotubes have a half-life of 24 h, being therefore susceptible to melatonin synchronization (Devreotes and Fambrough, 1975).

The data described, so far, suggest that melatonin diffuses through the plasma membrane and inhibits calmodulin, which in turn reduces Ca^{2+} /calmodulin nitric oxide synthase activity, and cyclic GMP accumulation (Fig. 8). Finally, we showed that calmidazolium was able to simulate both melatonin reduction in number of nicotinic acetylcholine receptors and cyclic AMP accumulation. Therefore, we suggest that melatonin reduction in cyclic AMP accumulation is a result of the inhibition of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent adenylyl cyclase. This is a fast process that triggers a multi-step cascade that in the long-term reduces the number of nicotinic acetylcholine receptors expressed in the plasma membrane.

Receptors traffic into and out the membrane involves some steps that are regulated by cyclic AMP-dependent protein kinases. It enhances the desensitization and decreases the resensitization rate of *Torpedo* and skeletal muscle receptors, but does not elicit internalization (Nishizaki and Sumikawa, 1998; Paradiso and Brehm, 1998). Changes in receptor sensitivity modify the functionality of the receptor or binding affinity, but cannot explain the reduction in receptor number. Only a small fraction of internalized receptors are re-incorporated the membrane, the larger fraction comes from newly synthesized receptors (Devreotes and Fambrough, 1975). Intracellular cyclic AMP accumulation increases the incorporation of new receptors to the plasma membrane. However, deletion of nicotinic acetylcholine receptor serines that can be phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase A does not interfere with

receptor membrane incorporation. Otherwise, cyclic AMP-dependent phosphorylation is relevant to proteins that assist folding and assembly of the receptor (Jayawickreme et al., 1994). This is a long-term process, and maximal forskolin efficiency is attained after 48 h. Interestingly, this period coincides with that necessary for maximal reduction of membrane expressed nicotinic acetylcholine receptors by melatonin in myotubes. Although it is out of our scope to measure phosphorylation of Golgi proteins, the most plausible pathway involved in the melatonin-mediated reduction in the number of nicotinic acetylcholine receptors may be a decreased cyclic AMP accumulation and reduced incorporation of new receptors (Fig. 8). We also observed that melatonin decreases cyclic GMP accumulation, opening the possibility that melatonin may interfere with the process of fusion of myoblasts to form myotubes, a process highly regulated by Ca^{2+} /calmodulin dependent nitric oxide synthase (Stamler and Meissner, 2001).

In summary, this study clearly shows that melatonin-dependent reduction of nicotinic acetylcholine receptors is not due to activation of the G_i -protein coupled MT1 or MT2 receptors, or to the putative MT3 receptor. Our data indicate that calmodulin is the target for melatonin effects herein described. Melatonin inhibits calmodulin and, as a consequence reduces cyclic AMP and cyclic GMP accumulation. The reduction of cyclic AMP accumulation mediates the decrease in the number of receptors. Since the effects here described were obtained with concentrations compatible with nocturnal melatonin surge, and nicotinic acetylcholine receptors in plasma membrane has a turnover of 24 h, this opens the possibility for a diurnal modulation in skeletal muscle physiology, based on nocturnal melatonin surge from the pineal gland.

Acknowledgments

The fruitful discussion with Dr. Wagner M. Zago and technical assistance of Debora Aparecida de Moura are gratefully acknowledged. Financial supports: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 02/02957-6); LDA-P is a graduate fellow from FAPESP; RPM and LVCL-research fellow from Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq).

References

- Barrenetxe, J., Delagrè, P., Martínez, J.A., 2004. Physiological and metabolic functions of melatonin. *J. Physiol. Biochem.* 60, 61–72.
- Beazely, M.A., Watts, V.J., 2005. G α q-coupled receptor signaling enhances adenylyl cyclase type 6 activation. *Biochem. Pharmacol.* 70, 113–120.
- Benítez-King, G., Anton-Tay, F., 1993. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 49, 635–641.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., Anton-Tay, F., 1993. Binding of ^3H -melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53, 201–207.
- Benítez-King, G., Rios, A., Martínez, A., Anton-Tay, F., 1996. In vitro inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 191–196.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

- Cameiro, R.C., Cipolla-Neto, J., Markus, R.P., 1991. Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 614–619.
- Cameiro, R.C., Pereira, E.P., Cipolla-Neto, J., Markus, R.P., 1993. Age-related changes in melatonin modulation of sympathetic neurotransmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 1536–1540.
- Cameiro, R.C., Toffoletto, O., Cipolla-Neto, J., Markus, R.P., 1994. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *Eur. J. Pharmacol.* 257, 73–77.
- da Costa Jr., V.L., Lapa, A.J., Godinho, R.O., 2001. Short- and long-term influences of calcitonin gene-related peptide on the synthesis of acetylcholinesterase in mammalian myotubes. *Br. J. Pharmacol.* 133, 229–236.
- Defer, N., Best-Belpomme, M., Hanoune, J., 2000. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol.* 279, 400–416.
- del Rio, B., Garcia Pedrero, J.M., Martinez-Campa, C., Zuazua, P., Lazo, P.S., Ramos, S., 2004. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* 279, 38294–38302.
- Devreotes, P.N., Fambrough, D.M., 1975. Acetylcholine receptor turnover in membranes of developing muscle fibers. *J. Cell Biol.* 65, 335–358.
- Dubocovich, M.L., 1995. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 50–56.
- Dubocovich, M.L., Cardinali, D.P., Delagrange, P., Krause, D.N., Strosberg, A. D., Sugden, D., Yocca, F.D., 2000. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, 2nd ed., IUPHAR Media, London, UK, pp. 187–193.
- Fröhner, S.C., 1991. The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Biol.* 114, 1–7.
- Fulton, D., Gratton, J.P., Sessa, W.C., 2001. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 818–824.
- Green, W.N., Ross, A.F., Claudio, T., 1991. cAMP stimulation of acetylcholine receptor expression is mediated through postranslational modifications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 854–858.
- Jayawickreme, S.P., Green, W.N., Claudio, T., 1994. Cyclic AMP-regulated AChR assembly is independent of AChR subunit phosphorylation by PKA. *J. Cell Sci.* 107, 641–651.
- Kang, B.H., Jo, I., Eun, S.Y., Jo, S.A., 2003. Cyclic AMP-dependent protein kinase A and CREB are involved in neuregulin-induced synapse-specific expression of acetylcholine receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 758–765.
- Lotufo, C.M., Lopes, C., Dubocovich, M.L., Farsky, S.H., Markus, R.P., 2001. Melatonin and *N*-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.* 430, 351–357.
- Luck, G., Hoch, W., Hopf, C., Blotter, D., 2000. Nitric oxide synthase (NOS-1) coclustered with agrin-induced AChR-specializations on cultured skeletal myotubes. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 269–281.
- Markus, R.P., Zago, W.M., Cameiro, R.C., 1996. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 18–22.
- Markus, R.P., Santos, J.M., Zago, W., Reno, L.A., 2003. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [³H] glutamate release in rat cerebellum slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 525–530.
- Masana, M.I., Witt-Enderby, P.A., Dubocovich, M.L., 2003. Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors upon prolonged withdrawal. *Biochem. Pharmacol.* 65, 731–739.
- Molinari, E.J., North, P.C., Dubocovich, M.L., 1996. 2-[¹²⁵I] iodo-5-methoxycarbonylamino-*N*-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 301, 159–168.
- Morley, B.J., Garner, L.L., 1990. Light–dark variation in response to chronic nicotine treatment and the density of hypothalamic alpha-bungarotoxin receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 239–245.
- Nishizaki, T., Sumikawa, K., 1998. Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 812, 242–245.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrange, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275, 31311–31317.
- Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrange, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1369–1379.
- Paradiso, K., Brehm, P., 1998. Long-term desensitization of nicotinic acetylcholine receptors is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *J. Neurosci.* 18, 9227–9237.
- Paul, P., Lahaye, C., Delagrange, P., Nicolas, J.P., Canet, E., Boutin, J.A., 1999. Characterization of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 334–340.
- Peng, H.B., 1984. Participation of calcium and calmodulin in the formation of acetylcholine receptor clusters. *J. Cell Biol.* 98, 550–557.
- Perkins, G.A., Wang, L., Huang, L.J., Humphries, K., Yao, V.J., Martone, M., Deerinck, T.J., Barracough, D.M., Violin, J.D., Smith, D., Newton, A., Scott, J.D., Taylor, S.S., Ellisman, M.H., 2001. PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neurosci.* 2, 17.
- Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R., Guerrero, J.M., 1997. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.* 65, 430–442.
- Reno, L.A., Zago, W., Markus, R.P., 2004. Release of [(3)H]-L-glutamate by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 124, 647–653.
- Romero, M.P., Garcia-Perganeda, A., Guerrero, J.M., Osuna, C., 1998. Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J.* 12, 1401–1408.
- Ross, A.F., Green, W.N., Hartman, D.S., Claudio, T., 1991. Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J. Cell Biol.* 113, 623–636.
- Sampaio, L.F.S., Hamassaki-Britto, D.E., Markus, R.P., 2005. Influence of melatonin on the development of functional nicotinic acetylcholine receptors in cultured chick retinal cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 603–613.
- Schiller, E.D., Champney, T.H., Reiter, C.K., Dohman, D.P., 2003. Melatonin inhibition of nicotine-stimulated dopamine release in PC12 cells. *Brain Res.* 966, 95–102.
- Schuster, C., Williams, L.M., Morris, A., Morgan, P.J., Barrett, P., 2005. The human MT1 melatonin receptor stimulates cAMP production in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells via a calcium–calmodulin signal transduction pathway. *J. Neuroendocrinol.* 17, 170–178.
- Simonneaux, V., Ribelayga, C., 2003. 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.* 55, 325–395.
- Sinnarajah, S., Dessauer, C.W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J.C., Morrison, E.E., Vodyanov, V., Kehrli, J.H., 2001. RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase. III. *Nature* 409, 1051–1055.
- Stamler, J.S., Meissner, G., 2001. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81, 209–237.
- Tai, H.H., Connolly, J.A., 1986. Calmodulin and acetylcholine receptor clustering in embryonic chick myotubes. *Eur. J. Cell Biol.* 41, 246–251.
- Tang, H., Sun, Z., Goldman, D., 2001. CaM kinase II-dependent suppression of nicotinic acetylcholine receptor delta-subunit promoter activity. *J. Biol. Chem.* 276, 26057–26065.
- Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.J., Firestone, S., Melan, M., 2003. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72, 2183–2198.
- Zago, W.M., Markus, R.P., 1999. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors located on short noradrenergic neurons of the rat vas deferens: a pharmacological characterization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 999–1000.