RENATO COUTO MORAES

Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

RENATO COUTO MORAES

Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Farmacologia

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Pekelmann Markus

Co-Orientador:
Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Moraes, Renato Couto.
Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos / Renato Couto Moraes. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Regina Pekelmann Markus.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Eixo imune-pineal.

Versão do título para o inglês: The role of corticosterone in the presence of stress upon the pineal function in rats.

Descritores: 1. Estresse 2. Corticosterona 3. TNF I. Markus, Regina Pekelmann II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0113/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renato Couto Moraes.

Título da Tese: Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos .

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: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **069** nas fls. **47** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Regina Pekelmann Markus** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Efeitos do estresse sobre a função pineal em ratos***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Renato Couto Moraes,*** 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 **25.09.2007.**

São Paulo, 26 de setembro de 2007.

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

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

Ao meu querido **PAI** (Gilberto) que tomado de uma garra quase sobrenatural sempre se empenhou em prover os confortos que nunca teve, nunca esmoreceu em nos mostrar os diversos caminhos da vida, e acima de tudo, pelo referencial que se tornou a partir de si mesmo.

À minha querida **MÃE** (Sandra) que sempre fez de nossa casa um ambiente feliz e agradável, nunca deixou de oferecer o colo, escutou as lamentações com a mesma paciência em que ouvira as alegrias. E ainda, pela sua sapiência às vezes tão popular, mas que nunca erra.

Ao meu querido **IRMÃO** (Ricardo) que soube identificar os meus maiores defeitos como virtudes úteis ao seu crescimento tanto pessoal como profissional, e também, por tornar-se um exemplo de profissional que terei o orgulho de dizer que é meu irmão.

À minha querida **AMIGA** (Mônica) que sempre me ouviu, nunca deixou de ponderar sobre as minhas opiniões, pela crença nas minhas realizações e pela fiel torcida mesmo à distância.

Aos meus queridos **ANIMAIS** (Xuxa, Princesa, Tieta, Igor, Tchê, Tyson, Pretinha, Joy e outros) que rejeitando a lógica da pouca ou nada racionalidade me entenderam mesmo com o mais profundo silêncio e souberam olhar nos meus olhos.

A G R A D E C I M E N T O S

A todos os REAIS PROFESSORES (lembro de muitos, mas não quero ausentar ninguém) que passaram em minha vida, cada um deixou sua contribuição e serão eternamente lembrados.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) que me recebeu menino e me ajudou a ser homem.

Ao Prof. Dr. Cláudio César Fonseca (DVT-UFV) por ter fornecido no mínimo o impulso inicial na minha escolha como pesquisador ao me orientar na minha primeira iniciação científica e ainda aceitar minha modesta ajuda como monitor.

À Profa. Dra. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado (DBG-UFV) também no mínimo por ter mostrado o caminho da docência de forma prazerosa em minha primeira monitoria.

Ao Prof. Dr. Luiz Renato de França (ICB-UFMG) por ter me incentivado bastante nos caminhos da pesquisa e, ter proporcionado um feliz convívio no meu primeiro grupo de pesquisa durante minha segunda iniciação científica.

Aos meus amigos do condomínio na época acadêmica ("As Meninas", Fábio, Daniel, Mário, Maira, Ana Cecília, Sandro e outros) pelo prazeroso convívio e amizade tão importantes na nossa aventura de sermos adultos.

Aos meus inúmeros amigos de universidade e de cidade na época acadêmica por ter contribuído para que as saudades fossem menos árduas e que a diversão fosse garantida mesmo em lugares questionáveis e em ocasiões impensáveis.

Aos queridos Antônio Jésus, Eugênia e Dona Ana, por terem me acolhido como filho e me apoiarem e incentivarem na busca de meus sonhos, tenham a certeza de que são permanentes na minha memória e no meu coração.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) por ter fornecido pessoas tão boas que viraram colegas e amigos, os quais jamais serão também esquecidos.

Ao Departamento de Patologia (VPT-FMVZ), professores, alunos e funcionários, pelo integral apoio na condução dos meus experimentos e amadurecimento dos meus pensamentos científicos.

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício (VPT-FMVZ) por ter me recebido de maneira tão amigável e direcionado melhor meus caminhos dentro da USP para alcançar meus objetivos.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto (VPT-FMVZ) por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa de forma tão harmoniosa, pelo fornecimento de seus ensinamentos, e sobretudo, pelo respeito às minhas dissonâncias.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha (VPT-FMVZ) pelo gentil acolhimento ao grupo e pelas inteligentes conversas de toda natureza.

Ao Prof. Dr. Frederico A. Pinto (VPT-FMVZ) por torna-se de um colega a um excelente amigo, em que pude dividir minhas angústias, tristezas e alegrias, por poder conviver com sua linda família (Carol, Gabriel e Isabela) e pelo inestimável auxílio neste trajeto simplesmente pelo inteligente convívio.

À todos os funcionários do VPT, em especial a inesquecível Romeika ("Dona Rô" – *in memorian*) e Herculano, pela cordialidade e carinho prestados ora nos momentos de cafezinho ora nos de trabalho, e sobretudo, nas já saudosas confraternizações animadas do VPT.

Ao Prof. Dr. Cristoforo Scavone (ICB-USP) pelos ensinamentos de toda ordem e pela certeza que os encontros sempre serão momentos verdadeiros e agradáveis.

Aos Doutores Daniel Cohen, Evelise S.M. Fonseca, Ricardo Lazzarini, Silvia Oloris e Heidge Fukumasu pelo auxílio em diferentes modos e momentos à minha formação.

Aos AMIGOS do VPT e agregados, especialmente Milena (e Breno), Alison, Viviane, Luciana (e Greg), Domenica, Adriana, Denise, Ana Paula, Sérgio e Rodrigo; aos amigos do ICB, em especial Marília, Sabrina, André, Simone, Priscila e André; aos amigos da FISIO da Bio e agregados, em especial Leonardo, Eduardo, Cecília, Marcelo, Marco Antônio, Érika, Natália, Pedro, Roseli, Gizele e Patrícia, tenho a certeza que compreenderão a falta de tempo e espaço para agradecer cada pessoa de forma singular e honesta, gostaria que sentissem de fato minha gratidão e amizade nesse momento e sempre pela particular contribuição de cada um ao meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Regina P. Markus pela orientação e por ter me tornado uma pessoa bem mais forte aos próximos desafios da vida.

Aos AMIGOS de FAMÍLIA (Luiz Carlos e Família) que se passaram de amigos dos meus pais a meus amigos, que sempre foram nossa família em São Paulo, pela torcida por todos nós de casa. Muito Obrigado!

Aos meus TIOS (Paulo e Lú, Sueli e Hélio, Pedro e Edilene) pela torcida por todos nós de casa. Muito Obrigado!

A TODOS COLEGAS e CONHECIDOS que passaram em minha vida, muitos deixaram marcas tão simples e lindas que espero também ter deixado minha contribuição em vossas mentes e corações.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão de bolsa de doutorado (Processo N° 2007/01602-3), a qual permitiu a realização da presente tese.

“A vida é uma pedra de amolar: desgasta-nos ou afia-nos, conforme o metal que somos feitos”.

George Bernard Shaw

R E S U M O

MORAES, R. C. **Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos.** 2010. 266f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A existência de uma comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imune permitiu a nós e a outros a sugerir o conceito de Eixo Imune-Pineal. Neste sentido, a fototransdução da pineal, pela produção e liberação de melatonina, é potenciada pelo hormônio corticosterona ou suprimida pela citocina TNF. A corticosterona é produzida mais intensamente sob estresse, e nesta condição, a citocina TNF também pode ser produzida (em nível plasmático ou cerebral) à semelhança do que ocorre na inflamação. Assim, o objetivo geral da presente tese é testar a hipótese que a pineal faz parte integrante da resposta ao estresse, da mesma forma que está integrada ao processo inflamatório. Para tal, dois modelos de estresse de natureza distinta foram escolhidos, contenção e frio, os quais foram aplicados aos ratos sempre na fase clara do ciclo de luz (ZT9-12) em dois intervalos de tempo, 30 minutos ou 2 horas. Os resultados foram agrupados em quatro partes, sendo: **Parte I:** Caracterização dos modelos de estresse, onde ambas modalidades de estresse não formaram úlceras gástricas nem produziram TNF em nível plasmático, apenas aumento pronunciado de corticosterona até os 10 minutos após aplicação dos mesmos. Portanto, a aplicação da contenção como a exposição ao frio são modelos moderados de estresse. **Parte II:** Efeitos do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*, nesta mostrou-se que somente em duas horas qualquer um dos estresses aumentou significativamente a produção pineal de melatonina, sem alterar o precursor N-acetilserotonina, de forma indiferente ao tipo de estresse. Portanto, esta modulação do estresse somente sobre o conteúdo de melatonina da pineal é implicada por ação da corticosterona. **Parte III:** Papel da corticosterona sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo* frente ao estresse, tratamento com metirapona ou com mifepristone aboliram indistintamente os efeitos de ambos os estresses em aumentar significativamente o conteúdo pineal de melatonina, também, tratamento com talidomida para abolir (eventuais) níveis cerebrais de TNF não modificou os efeitos de ambos os estresses, que poderiam estar sendo diminuídos pela ação da corticosterona junto da citocina TNF. Portanto, a modulação do estresse via corticosterona sobre a pineal é confirmada. **Parte IV:** Papel da estimulação alfa-adrenérgica na vigência do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*, foi visto que tratamento com fenilefrina não modifica os efeitos observados nos estresses aplicados isoladamente. Portanto, a estimulação α-adrenérgica juntamente da β-adrenérgica não interfere com os efeitos da corticosterona (do estresse) sobre a glândula pineal. De posse de nossos achados, nós podemos concluir que o estresse moderado agudo, independente de sua natureza, devido à corticosterona, promove modulação da glândula pineal na dependência do estado fisiológico da mesma. Esta tese confirma a existência de uma relação entre as glândulas adrenais e pineal. Em conjunto, nossos resultados implicam que a glândula pineal exerce, além de suas clássicas funções cronobióticas, um papel de grande sensor do estado geral ao organismo inteiro.

Palavras-chave: Estresse. Corticosterona. TNF. Pineal. Melatonina. Eixo Imune-Pineal.

A B S T R A C T

MORAES, R. C. **The role of corticosterone in the presence of stress upon the pineal function in rats.** 2010. 266p. PhD. Thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The existence of the bidirecional communication between the pineal gland and the immune system allow to us and others to suggest the Immune-Pineal Axis concept. In this way, the phototransduction of pineal, by melatonin production and release, is potentiated by corticosterone hormone or supressed by TNF cytokine. The corticosterone is produced more intensily upon stress, and in this condition, the TNF cytokine could be also produced (in plasma or cerebral levels) as occurs in inflammation. Thus, the general objective of this thesis is to test the hypothesis that the pineal is a player in stress response, likewise that it is one player in inflammatory process. For this, two models of stress with different nature were choosen, restraint and cold, which were applied to the rats always in the photofase (ZT9-12) in two times, 30 minutes or 2 hours. The results were clustered in four sections, being: **Section I:** Caracterization of the stress models, where both types did not produce gastric ulcers neither TNF levels, but there was enhancement of corticosterone serum levels up to 10 minutes after application of theses. Therefore, the restraint application as well as cold exposure are moderate models of stress. **Section II:** Effects of stress upon the pineal function *in vivo*, in this section were shown that only two hours of anyone stress increased significantly the melatonin production by the pineal gland, without changes in the precursor N-acetylserotonin, yet theses effects were undifferentiated to the stress type. Therefore, this modulation of the stress upon the melatonin pineal content is implicated for the corticosterone action in the gland. **Section III:** Role of corticosterone upon the pineal function *in vivo* ahead to the stress, in this section the metyrapone or mifepristone treatment abolish indistinctly the effects of both stresses in to increase significantly the melatonin pineal content, already the thalidomide treatment for to abolish (incidental) TNF cerebral levels did not modify the effects of both stresses, that could be covering by the corticosterone and TNF actions both together. Therefore, the modulation of stress via corticosterone upon the pineal is authenticated. **Section IV:** Role of alpha-adrenergic stimulation in the presence of stress upon the pineal function *in vivo*, here was shown that the phenylephrine treatment did not modify the effects observed in the stresses applied separately. Therefore, the alpha-adrenergic stimulation together beta-adrenergic stimulation did not interfere with the corticosterone effects (from stress) upon the pineal gland. For the our findings, we can conclude that the acute moderate stress, unattached of its type, by the corticosterone action, promote modulation of pineal gland on the dependence of the physiological status of itself. This PhD Thesis confirm the existence of a network between the adrenal and pineal glands. All together, our results implicate that the pineal gland performs, beyond of its chronobiotical classical functions, one role of the great sensor of internal body state to the whole organism.

Key-words: Stress. Corticosterone. TNF. Pineal. Melatonin. Immne-Pineal Axis.

L I S T A D E I L U S T R A Ç Õ E S

Figura 1. Fotografia do aparato de contenção para indução de estresse em ratos. 126

Figura 2. Fotografia de gaiolas junto de lâmpada de emergência em geladeira para exposição dos ratos ao frio. 128

Figura 3. Fotografia da caixa escura de transporte da sala de manutenção para sala escura de eutanásia. 133

Figura 4. Curva temporal da concentração sérica de corticosterona de ratos submetidos a aplicação de contenção ou a exposição ao frio por 30 minutos. 150

Figura 5. Curva temporal da concentração sérica de corticosterona de ratos submetidos a aplicação de contenção ou a exposição ao frio por duas horas. 152

Figura 6. Conteúdo de N-acetilserotonina e de melatonina da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio. 158

Figura 7. Conteúdo de melatonina da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados previamente com metirapona. 164

Figura 8. Conteúdo de melatonina da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados previamente com mifepristone. 168

Figura 9. Conteúdo de melatonina da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados previamente com talidomida. 171

Figura 10. Conteúdo de melatonina da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados conseguinte com fenilefrina. 177

L I S T A D E E X P E R I M E N T O S

Experimento 1. Efeitos da aplicação da contenção ou da exposição ao frio sobre a formação de úlcera gástrica 145

Experimento 2. Efeitos da aplicação da contenção ou da exposição ao frio sobre a concentração plasmática de TNF 146

Experimento 3. Efeitos da aplicação da contenção ou da exposição ao frio sobre a concentração sérica de corticosterona 147

Experimento 4. Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio sobre a síntese *in vivo* de NAS e MEL pela glândula pineal 156

Experimento 5. Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com metirapona sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo* 161

Experimento 6. Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com mifepristone sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo* 165

Experimento 7. Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com talidomida sobre a síntese de melatonina da glândula pineal in vivo 169

Experimento 8. Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento conseguinte com fenilefrina sobre a síntese de melatonina da glândula pineal in vivo 175

S U M Á R I O

1 INTRODUÇÃO.....017

2 REVISÃO DE LITERATURA.....021

2.1 Glândula Pineal.....022
2.1.1 Histórico.....023
2.1.2 Anatomia da Pineal.....038
2.1.3 Histologia da Pineal.....040
2.1.4 Embriologia da Pineal.....043
2.1.5 Patologias da Pineal.....043
2.1.6 Vascularização da Pineal.....044
2.1.7 Inervação da Pineal.....045
2.1.8 Fisiologia da Pineal.....048
2.1.9 Farmacologia da Melatonina.....053
2.1.10 Papeis Biológicos da Melatonina.....059

2.2 Estresse.....065
2.2.1 Breve Histórico e Definição do Estresse.....069
2.2.2 Tipos de Estresse.....073
2.2.3 Eixo HPA.....077
2.2.4 Síntese da Corticosterona.....087
2.2.5 Farmacologia da Corticosterona.....088
2.2.6 Papeis Biológicos da Corticosterona.....093

2.3 Eixo Imune-Pineal.....105

3 OBJETIVOS.....113
3.1 Objetivo Geral.....114
3.2 Objetivos Específicos.....114

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....115
4.1 Animais.....116
4.2 Drogas, Reagentes e Soluções.....117
4.3 Objetos e Vidrarias.....118
4.4 Instrumentos Cirúrgicos.....120
4.5 Aparelhos.....120
4.6 Preparo dos Fármacos.....122
4.6.1 Preparo da Solução de Metirapona.....122
4.6.2 Preparo da Solução de Mifepristone.....123
4.6.3 Preparo da Solução de Talidomida.....124
4.6.4 Preparo da Solução de Fenilefrina.....124
4.7 Procedimentos.....125
4.7.1 Aplicação da Contenção.....125
4.7.2 Exposição ao Frio.....127
4.7.3 Horário dos Procedimentos de Estresse.....129
4.7.4 Avaliação da Geração de Úlceras Gástricas.....129
4.7.5 Coleta de Sangue e Obtenção de Plasma.....131
4.7.6 Coleta de Sangue e Obtenção de Soro.....132
4.7.7 Coleta da Glândula Pineal.....132
4.7.8 Horário da Coleta da Glândula Pineal.....134
4.7.9 Quantificação de TNF.....134
4.7.10 Quantificação de Corticosterona.....135
4.7.11 Quantificação de N-Acetilserotonina e Melatonina.....136
4.8 Delineamento Experimental Geral.....137
4.9 Formação dos Grupos Experimentais.....138
4.10 Análise dos Dados.....140

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....141
5.1 Delineamento Experimental Geral.....142
5.2 Resumo Geral dos Resultados.....143

5.3 Delineamento - Parte I.....144
5.3.1 Experimento 1.....145
5.3.2 Experimento 2.....146
5.3.3 Experimento 3.....147
5.3.4 Resumo dos Resultados - Parte I.....154
5.4 Delineamento - Parte II.....155
5.4.1 Experimento 4.....156
5.4.2 Resumo dos Resultados - Parte II.....159
5.5 Delineamento - Parte III.....160
5.5.1 Experimento 5.....161
5.5.2 Experimento 6.....165
5.5.3 Experimento 7.....169
5.5.4 Resumo dos Resultados - Parte III.....172
5.6 Delineamento - Parte IV.....174
5.6.1 Experimento 8.....175
5.6.2 Resumo dos Resultados - Parte IV.....178
5.7 Resumo dos Resultados – Geral.....179

6 DISCUSSÃO.....181

7 CONCLUSÕES.....208

REFERÊNCIAS.....211

1 INTRODUÇÃO

Há muitos séculos é conhecida a marcante influência da mente sobre a saúde humana (FELTEN, 2000). Em 1936, Hans Selye postula a Síndrome de Adaptação Geral, posteriormente, designada simplesmente como estresse (NEYLAN, 1998). Atualmente, é reconhecido que o estresse promove uma resposta complexa coordenada centralmente, envolvendo alterações de funções autonômicas, endócrinas, comportamentais e cognitivas (DAYAS et al., 2001), além de imunológicas (BESEDOVSKY e DEL REY, 2000).

O estresse pode ser classificado em duas grandes categorias: (1) estresse físico ou “sistêmico” e (2) estresse psicológico ou “processivo” (SAWCHENKO et al., 1996). Um exemplo de modelo de natureza psicológica é o estresse por contenção (DAYAS et al., 2001; SCHIMITZ et al., 2002; MADRIGAL et al., 2003). Já de natureza física, o estresse pelo frio é um exemplo (ZOELLER et al., 1990; BAFFI e PALKOVITS, 2000).

O estresse por contenção (CULLINAN et al., 1995; IMAKI et al., 1995; DAYAS et al., 2001; VIAU e SAWCHENKO, 2002) e pelo frio (PACAK e PALKOVITS, 2001) possuem vias aferentes diferentes, mas de maneira invariável se direcionam ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que se projeta para a porção intermédio lateral (IML) da medula, mesmo que por diferentes populações, não só alcançando o gânglio cervical superior, que se comunica com a glândula pineal (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003), mas também chegando ao córtex da adrenal (BUIJS et al., 1999). Portanto, o PVN faz parte tanto do eixo HPA como do sistema de temporização, ou seja, existe uma via neural comum entre o eixo HPA e a glândula pineal.

A resposta de defesa do organismo tanto com ativação do sistema nervoso autônomo como do eixo HPA induzem alterações do sistema imune (ELENKOV et al., 1996; ORTEGA et al., 2000; SIGOLA e ZINYAMA, 2000; SANDERS, 2006), resultando

num interessante modelo para avaliação da interação neuroimunoendócrina (MCEWEN et al., 1997). Neste sentido, foi observado que o estresse pode promover a produção da citocina TNF tanto no plasma (LIU et al., 2007) como no sistema nervoso central (MADRIGAL et al., 2002; MUNHOZ et al., 2004).

Convém destacar que tanto o hormônio corticosterona (FERREIRA et al., 2005) como a citocina TNF (FERNANDES et al., 2006; PONTES et al., 2006) agem na glândula pineal. Sendo possível um papel integrador da glândula pineal pela recepção de informações de citocinas centrais e periféricas, por ser um dos órgãos circunventriculares (PEDERSEN et al., 1997; DUVERNOY e RISOLD, 2007). Portanto, é plausível pensar que o estresse possa agir sobre a pineal na dependência da reatividade da mesma a substâncias (revisto por COUTO-MORAES et al., 2009).

A glândula pineal é tida como um neurotransdutor da informação fótica, visto que libera seu hormônio, melatonina, durante o escuro. De forma sintética, no escuro ocorre a ativação da via simpática que inerva a glândula pineal. A ativação de adrenoceptores beta promove a ativação da via dependente de AMP cíclico, que induz a transcrição do gene aril-alquil-N-acetiltransferase (Aa-nat). Esta enzima é considerada chave na síntese de melatonina, visto que sua atividade é praticamente zero durante o claro e aumenta em cerca de 100 vezes no escuro. A enzima AA-NAT transforma serotonina em N-acetilserotonina (NAS), que posteriormente é metilada a melatonina pela enzima hidroxi-indol-O-metiltransferase (revisto por MARKUS et al., 2003).

Recentemente, mostramos outro caminho de controle da síntese (pineal) de melatonina pelo fator de transcrição nuclear NFκB (FERREIRA et al., 2005). A ativação deste fator leva à inibição da transcrição do gene aa-nat, enquanto sua inibição potencia a transcrição do mesmo gene induzida por P-CREB. Por esse caminho,

a citocina pró-inflamatória TNF, que é secretada, sobretudo por macrófagos, na fase precoce de resposta inflamatória, promove inibição da síntese noturna de melatonina (PONTES et al., 2006). Diferentemente, condições de inflamação crônica com aumento da atividade do eixo HPA e, por conseqüente, aumento sérico persistente de corticosterona, cessa a melatonina sintetizada noturnamente após adrenalectomia (LOPES et al., 2001). Estes dados indicam que durante a inflamação não há produção noturna de melatonina; assim, o organismo animal fica “desligado” da variação fótica ambiental.

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do estresse sobre a atividade da glândula pineal. Uma das premissas é que a ativação do eixo HPA, com um aumento da quantidade de corticosterona circulante, levaria a um aumento da produção de melatonina, conforme estudos *in vitro* (FERREIRA et al., 2005) e *in vivo* (FERNANDES et al., 2009) na dependência do estado fisiológico em que a glândula pineal encontra-se (FERNANDES, 2009). Por outro lado, se o estímulo estressante levasse à produção da citocina pró-inflamatória TNF em nível plasmático (LIU et al., 2007) ou em nível cerebral (MADRIGAL et al., 2002; MUNHOZ et al., 2004), a produção de melatonina poderia ser reduzida ou suprimida pela inibição da maquinaria enzimática (FERNANDES et al., 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção será apresentada a literatura pertinente para ampla compreensão do presente trabalho.

2.1 Glândula Pineal

A glândula pineal recebeu este nome pelo seu formato peculiar de pinha, sendo também chamada de: epífise, epífise cerebral, corpo pineal e, olho pineal. É uma pequena glândula endócrina presente em todos os vertebrados, que produz um importante hormônio (melatonina) responsável pela transdução da informação fótica em informação química, e assim, modulando as funções associadas ao ciclo sono-vigília e às quatro estações climáticas, ambas relacionadas ao ciclo claro-escuro ambiental.

Dentre todas as glândulas endócrinas, a glândula pineal é que apresenta menor número de artigos em consulta a base de dados PubMed (cerca de 14.200), sendo que o número de artigos em ordem decrescente para este tipo de glândula é: 1º - adrenais (280.000), 2º - pâncreas (128.000), 3º - tireóide (146.000), 4º - hipófise (139.000) e, 5º - paratireóide (44.000); conforme último levantamento feito em 14 de junho do corrente ano. Desta forma, o número de artigos sobre pineal é aproximadamente três vezes menor do que para a glândula menos estudada, a paratireóide. Isto é compreensível por diferentes razões quando comparada a outras glândulas endócrinas, tais como: associação com propriedades místicas por longo período, reduzido tamanho, pouca acessibilidade anatômica na maioria dos mamíferos, longo tempo para descoberta de função fisiológica, dentre outras.

Curiosamente pela sua profunda localização anatômica no cérebro, ímpar e central em humanos, ela foi associada por diversos filósofos e religiosos como tendo

propriedades especiais, uma glândula misteriosa. Além disto, o aproveitamento do enfoque místico pela cultura, particularmente a literatura (não-técnica) e o cinema, faz também despertar interesse de leigos. Desta forma, um breve histórico de sua descrição é apresentado a seguir.

2.1.1 Histórico

A primeira descrição documentada da pineal é datada de aproximadamente 1.500 a.C. na obra Vedas e, referia-se a glândula pineal como “terceiro olho”, também chamado de “olho interno”, um conceito simbólico (místico) bem antigo. A obra Vedas é um conjunto de quatros textos, escritos em sânscrito, que forma a base do sistema de escrituras sagradas do Hinduísmo. O “terceiro olho” refere-se a uma parte do *chakra* (de forma não literal “centro de forças”), na verdade o sexto *chakra* (ajnã, “o centro do comando”) na tradição hinduísta (Kabbalah), estando presente em diversas tradições espiritualistas tanto orientais como ocidentais (SAGAN, 2007), inclusive sendo marcado por uma pequena jóia ou pedra no centro da testa pela cultura indiana. Ainda nesta linha, a glândula pineal é evocada a ser consultada, com a expressão: “Consulte sua glândula pineal”, pelos adeptos ao Discordianismo. O Dicordianismo é uma espécie de religião criada nos Estados Unidos em 1958, sendo uma modificação da filosofia Zen budista da escola Rinzai, escola japonesa derivada da escola chinesa Linji. “A consulta” a glândula pineal permite, segundo os adeptos, uma consulta à Deusa Grega Eris (em latim, Discordia), a Deusa da Desarmonia ou da Discórdia.

Na era Contemporânea, cresce o número de pessoas que adotam o conceito de “terceiro olho” em escolas de meditação e artes, tais como: ioga, meditação Zen, caratê

(certos estilos) e, aiquidô; sendo por muitos até reconhecidamente que não se trata de um órgão físico ou material como concebido originalmente (SAGAN, 2007). No mesmo sentido, Alice Ann Bailey (1880-1949), escritora britânica de religiões e afins, escreveu no seu livro "Um Tratado em Magia Branca" (do inglês, *A Treatise on White Magic*) que a glândula pineal poderia ter função até mesmo telepática em indivíduos especiais.

A glândula pineal apareceu até em obras de ficção científica e em filmes. Na obra "Do Além" de 1920 (do inglês, *From Beyond*) de Howard Phillips Lovecraft (1890-1937), famoso novelista estadunidense, que escreveu nos gêneros do horror e ficção científica, é descrito um cientista (Dr. Crawford Tillinghast) que construiu uma máquina que estimulava as glândulas pineais de seres humanos de modo a permitir ver planos de existência fora da realidade. Esta obra literária foi adaptada ao cinema, com mesmo nome, em 1986 pelo diretor de horror estadunidente Stuart Gordon[1]. Outra obra sobre pineal que também foi versada a filme é "Medo Mortal" de 1997 (do inglês, *Mortal Fear*), escrita por Greg Iles (1960-), alemão de nascimento e estadunidense de criação, novelista consagrado em vendas nos Estados Unidos com mais de 10 "best-sellers" dos 15 já produzidos por ele. Nesta obra, Greg escreve sobre uma série de mortes em que o assassino tem especial interesse em coletar a glândula pineal das mulheres assassinadas acreditando que o "sexto sentido" estava lá.

A glândula pineal já foi mencionada na literatura, não convencional e não científica, por Georges Bataille (1897-1962), escritor francês, considerado um escritor de uma literatura de transgressão, uma obra metafórica por excelência. Bataille escreveu um texto sobre a glândula pineal (*The Pineal Eye, 1927-1939*), na verdade, a glândula como a função de "terceiro olho". Neste texto, Bataille se apóia no conceito de olho-pineal com uma metáfora a racionalidade cega do Ocidente, e este órgão

[1] Trecho pode ser visto em <http://www.youtube.com/watch?v=5tj-dNb6Ar8>.

simbolizaria o excesso e o delírio, conforme análise de Denis Hollier (1989). Para Japiassú (1976), o conceito olho-pineal é abordado por Bataille como uma criação do oriente que necessitam os cidadãos do ocidente.

A pineal foi usada na filosofia moderna em 1957 pelo filósofo francês Gaston Bachelard (1884-1962) na sua obra A Poética do Espaço (do francês, *La poétique de l'espace*). Simões (1999) afirma que: "A fenomenologia bachelardiana da imaginação, ao contrário, não vê as coisas com os olhos". Entendido isto e indo além, a pineal em Bachelard ("super-olhos") é algo desnecessário, simboliza um super-racionalismo apoiado na imaginação, a realidade não é aquela que se apresenta aos olhos, as imagens devem ser entendidas como modelos de raciocínios.

Outra documentação antiga da pineal é do século III a.C. por Herófilos (Herophilos; 335-280 a.C.), médico grego filiado a Escola Médica de Cós (Alexandria, Grécia Antiga) que se dedicou à anatomia com considerável contribuição na neuroanatomia, com descrição da anatomia do cérebro, cerebelo, ventrículos, meninges e, olho (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Sendo que nos estudos da anatomia deste último órgão, estabeleceu a diferença entre nervos motores e sensitivos (PORTER, 2002). Herófilos ainda foi quem primeiramente considerou o cérebro como sede da inteligência e não o coração, como proposto por Aristóteles (PORTER, 2002). Sendo por toda sua obra, considerado "O Pai da Anatomia".

Contudo, o nome pineal a esta glândula só ocorreu no século II já na era Cristã por Galeno (Claudius Galenus; 131-200), médico grego que atendeu o Imperador Romano Marco Aurélio, e também, seus outros dois sucessores (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Ampliou a função do cérebro, feita por Herófilos, ao considerá-lo centro das sensações e do pensamento (PORTER, 2002). Galeno dedicou-se intensamente aos

estudos de neuroanatomia, inclusive com a descrição de sete (dos 12) pares de nervos cranianos e de 30 (dos 31) pares de nervos espinhais (PORTER, 2002). Denominou a glândula pineal de *konarium* (em grego), pelo aspecto semelhante a uma pinha (pineal), além de ter rebatido a idéia de que a função da mesma era regular a passagem do espírito (do grego, *pneuma*). Sua maior contribuição foi inaugurar a fisiopatologia, visto que Galeno estabeleceu o princípio de que toda lesão num órgão corresponde a uma alteração da função e vice-versa (PORTER, 2002). Pelo fato de ser um monoteísta, tendo a visão do corpo humano como obra divina e os tempos posteriores a sua vida serem marcados por marcante repressão, perseguição e morte aos pensadores por parte da Igreja Católica (o que ficou conhecido como “Era das Trevas”) foi o médico que deixou sua influência por tempo mais prolongado na história da civilização ocidental, cerca de 1500 anos, até a Renascença (século XIV ao XVII).

Novas descrições sobre a pineal só ocorreram em meados do século XVI, em 1543 no Atlas de Anatomia “A Fábrica do Corpo Humano” (do latim, *De Humani Corporis Fabrica*) no livro VII, escrito por Andreas Vesálio (nome original Andreas van Wesele, nome que assinava em latim Andreae Vesalli; 1514-1564), belga, médico e professor. Como médico exerceu suas atividades para o Rei Carlos V (1546) e posteriormente à Corte Espanhola de Filipe II (1559), filho sucessor. Como professor exerceu cargos na Universidade de Bolonha e de Pádua, sendo que na última recebeu o título de doutor (1537) e, onde desenvolveu sua grande obra literária. “A Fábrica do Corpo Humano” foi, em grande parte, motivada quando ao dissecar corpos humanos verificou que diversas descrições anatômicas de Galeno estavam erradas, como por exemplo, a descrição da anatomia do fígado era apresentada cinco lobos ao invés dos dois grandes lobos (direito e esquerdo) como nos humanos, esta e outras descrições o

levaram a concluir que se tratava da descrição em macacos Rhesus (*Macaca mulata*) e não de seres humanos (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Contudo, é lembrado frequentemente somente por seu magnífico Atlas de Anatomia, vale destacar que ele rompeu com a teoria local ventricular dos processos mentais ao comparar a organização anatômica dos humanos a outros mamíferos, curiosamente o asno. “A Fábrica do Corpo Humano” é considerado o melhor Atlas de Anatomia com detalhados desenhos naturalísticos (não artísticos) e ilustrações da anatomia (KICKHÖFEL, 2003), feitos por Jan Stephen van Kalcar (grande parte) como por Vesálio e, impresso primorosamente por Johannes Oporinus (mestre-artesão suíço em xilogravura).

Continuidade na descrição da pineal ocorre no século XVII pelo francês René Descartes (Renatus Cartesius; 1596-1650), filósofo, físico e matemático por atuação e advogado por formação, pois nunca exerceu o título que obteve da Universidade de Poitiers (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Na verdade, o título de primeiro filósofo moderno já bastaria para englobar a dimensão de sua obra, que mais do que vasta, foi vanguardista em essência, em duas de suas obras Discurso sobre o Método de 1637 e Meditações de 1641, ele inaugura um ceticismo metodológico nunca dantes escrito, o que veio a ser chamado de “Método Cartesiano”, em suma, pregoava a dúvida (“só existe aquilo que pode ser provado”) em quatro regras fundamentais, a saber: verificar, analisar, sintetizar e enumerar. Com contribuição medíocre na Física (O Mundo ou Tratado da Luz, de 1633), apesar de ser somente superado por Isaac Newton aproximadamente 30 anos depois (em 1663, o Binômio de Newton), sua contribuição inestimável foi no campo da Matemática, onde usou a Álgebra para soluções de problemas da Geometria (antes distintamente separadas) por meio do Sistema de Coordenadas. Ao estudar a glândula pineal atribui-a a função de

“terceiro olho”. Sendo que esta atribuição não se devia a nenhuma comparação com a fotorrecepção dos olhos. Acreditava que a pineal coordenava os movimentos musculares ao que se via pelos olhos, pois para ele, os líquidos fluíam entre a glândula pineal e os ventrículos e daí para os músculos, escrevendo para isto a expressão espírito animal (do francês, *esprits animaux*). Ainda, o corpo (*a res extensa*) encontrava-se com a alma autônoma e não material (*a res cogitans*) na pineal. Escreveu sobre esta glândula: “Existe uma pequena glândula no cérebro, na qual a alma exercita sua função mais singularmente do que em todas as outras partes do corpo” (do inglês, *There is a small gland in the brain, in which the soul exercises its function more particularly than in every other part of the body*). Desta maneira, a pineal para Descartes não era o centro da alma, mas o local de sua atividade. De maneira não intencional, Descartes fora quem primeiro atribui relação da pineal com ciclo sono-vigília, pois o sono e a vigília dependiam (para ele) dos fluxos dos espíritos animais no cérebro regulado pela pineal. Por isto, o cérebro dos cadáveres apresentava (as hoje denominadas) circunvoluções por que estava sem fluxo, murcho (desenhos feitos na obra De Homine, 1662).

Outro relato importante sobre a glândula pineal data do século XVIII, precisamente em 1769, por Giovanni Battista Morgagni (“Giambattista” apelido dos italianos, 1682-1771) italiano, filósofo e médico (ambas concluídas em 1701) pela Universidade de Bologna (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Morgagni dedicou-se intensamente em basear o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento das doenças por meio de exame minucioso das condições anatômicas do paciente, com consistentes relações doença-coração, doença-pulmões e doença-fígado (PORTER, 2002), sendo por isto considerado “O Pai da Anatomia Patológica”. Pela repercussão de sua obra *Adversaria anatômica* (1706; conjunto de três obras inicialmente) virou professor-

assistente de medicina teórica (1712) e cátedra de anatomia (1715) na Universidade de Pádua. Foi membro da maior parte das importantes academias de ciência da época, citando-se: Academia Imperial Césaro-Leopoldina - 1708; Sociedade Real da Inglaterra - 1724, Academia Parisiense de Ciências - 1731, Academia de Saint Petersburg - 1735 e, Academia de Berlim - 1754. Sua maior obra mais famosa foi *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis* (1761), nela Giovanni descreveu o histórico de vida de seus pacientes, o modo como morreram e os achados de necropsia que ele conduziu nos mesmos. Oito anos depois (1769), Morgagni ao descrever seus achados de necropsia (achados *post-mortem*) verificou a presença de ar na circulação cerebral e deduziu que isto era a *causa-mortis,* a primeira descrição da Síndrome ou Mal de Descompressão (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Nesta oportunidade, ele fez a curiosa observação que a calcificação da pineal aparecia mais freqüentemente em pacientes espiritualistas (ENCICLOPÉDIA..., 1986).

O próximo relato que se sabe sobre a pineal é de 1884, feito por Richard Owen (1804-1892) no periódico Quarterly Journal of the Geological Society. Owen, renomado anatomista, zoologista e paleontólogo britânico, foi quem primeiro sugeriu o nome dinossauro (em grego, lagarto terrível) em 1841 aos achados fósseis de ossos gigantes de répteis encontrados no sul da Inglaterra, que posteriormente foram publicados na sua obra História de Répteis Fósseis Britânicos (do inglês, *History of British Fossil Reptiles)* sendo o primeiro volume de 1849. Ele descreveu e nomeou uma série de dinossauros, como a preguiça-gigante (*Mylodon*, de 1842) e o primeiro ancestral do cavalo (*Toxodon owenii*, de 1848). Preparou uma série de catálogos de anatomia comparativa para o Colégio Real de Cirurgiões, o que o elevou ao cargo de Professor Hunteriano (espécie de Cátedra) desta instituição, ocupando a posteriori o cargo de

Superintendente do Depto. de História Natural do Museu Britânico, que se tornou independente como Museu Britânico de História Natural tendo Owen como fundador (ENCICLOPÉDIA..., 1986). No artigo de 1884 sobre o crânio e a dentição de um réptil do Período Triássico (*Tritylodon longævus*), Owen descreve "A short anterior divarication bounds a small vacuity exposing matrix which has filled the cerebral cavity; which vacuity is completed anteriorly by a similar divarication of the mid and hind angles of the frontal bones, the mid suture of which is unobliterated. The above vacuity, *v*, if natural, represents a fontanelle, or it may be interpreted as a 'pineal' or parietal foramen; it may, however, be due to posthumous injury". Deste modo, Owen apresenta dúvidas sobre a ocupação de um espaço no crânio do *Tritylodon*, o qual poderia ser a glândula pineal, o forame parietal ou até mesmo um artefato *post-mortem*.

Em 1886, dois pesquisadores Henry Will de Graaf (GRAAF, 1886 apud SPENCER, 1886[2]) e Walter Baldwin Spencer (1860-1929) publicam de forma independente (respectivamente nos periódicos: Zoologischer Anzeiger e, Quarterly Journal of Microscopical Science) a presença da pineal em lagartos (Lacertilia).

O relato seguinte é de 1887 por Henry Fairfield Osborn (1857-1935), geólogo e paleontólogo estadunidense. Renomado por descobertas paleontológicas famosas, fósseis dos dinossauros *Tyrannosaurus rex* (1905) e *Velociraptor* (1924). Osborn faz apontamentos na famosa revista Science (em duas descrições, volume IX, número 208 e 209) sobre as descrições do artigo de Owens (1884), esclarecendo a dúvida que de fato era a pineal encontrada nestes dinossauros e isto era algo importante. Numa primeira oportunidade (volume IX, número 208), Osborn descreveu: "From the large size of the parietal foramen in *Tritylodon*, which greatly exceeds that of any of the recent lizards in relative diameter, and compares with that of the labyrinthodonts and saurians,

[2] DE GRAAF, H.W. Zur Anatomie und Entwickelung der Epiphyse bei Amphibieu und Keptilien. Zool. Anzeig., 29th March, 1886.

we may safely infer that the primitive Mammalia, of this family at least, had a pineal eye of some functional size and value". No número seguinte da Science (volume IX, número 209), Osborn apenas se explica que ao comparar com o crânio do *Sphenodon* a expressão "relative diameter" deve ser substituída por "actual diameter", e ainda pontua que esta descoberta reforça o ancestral reptiliano dos mamíferos. Contudo, os trabalhos de Henry e William foram ignorados, apesar de relatarem a glândula pineal em répteis como apresentado anteriormente. Finaliza esta seqüência de discussão na revista Science, George Macloskie (1834-1920), naturalista irlandês radicado nos Estados Unidos, que apresenta informações morfológicas sobre a pineal em lagartos. Macloskie foi um renomado professor de Biologia da Universidade de Princenton a partir de 1874, onde desenvolveu estudos sobre insetos e botânica.

No mesmo ano (1887), William Turner (1832-1916), médico anatomista britânico, que se destacou como Reitor da Universidade de Edimburgo e neurocirurgião, escreveu a morfologia e a localização anatômica da glândula pineal em morsas e em duas espécies de focas.

No ano seguinte (1898), Johann Otto Leonhard Heubner (1843-1926), médico clínico e pediatra alemão, descreve um caso em que a glândula pineal está envolvida, mas erra no diagnóstico (HEUBNER, 1898 apud DANDY, 1915[3]) . Heubner é conhecido pela dissecação e descrição minuciosa de uma importante artéria cerebral (em 1872) que se origina da junção dos segmentos A1 e A2 da artéria cerebral anterior, a qual recebeu seu sobrenome - artéria de Heubner. Além disto, foi o primeiro médico a introduzir práticas de assepsia nos hospitais. Descreveu pioneiramente a Endoarterite Sifilítica Obliterante ("Síndrome de Heubner"), a hoje conhecida Doença Celíaca ("serious deficiency of digestion") e proveu profunda contribuição sobre a Meningite

[3] HEUBNER, J.O.L. Allg. reed. Centr.-Ztg., *v.* lxvili, p. 89, 1899.

Meningocócica. Em 1898, descreveu a puberdade precoce num garoto de quatro e meio anos de idade com desenvolvimento corporal ligeiramente avançado (compatível com 8 a 9 anos), isto foi atribuído a tumor da hipófise. Somente cerca de um ano após (1899), Oestreich e Slawyk ao reestudarem o caso encontraram na necropsia um teratoma de pineal (OESTREICH e SLAWYK, 1899 apud DANDY, 1915[4]). Desta forma, uma função endócrina é dada à pineal somente no final do século XIX. No mesmo ano, Ogle descreve precocidade sexual num menino de seis anos com características semelhantes ao caso descrito por Heubner, contudo o diagnóstico (teratoma de pineal) foi o mesmo dado por Oestreich e Slawyk (OGLE, 1899 apud DANDY, 1915[5]).

Ainda em 1898 (dezembro), artigo de Joseph Frank Payne (1840-1910), descreveu sete diferentes casos médicos, de outros colegas, envolvendo modificações morfológicas da pineal bastante variáveis e, conclui que os sintomas clínicos no decorrer da doença da pineal devam ser causados por compreensão mecânica do que a mesma promova qualquer modificação da função fisiológica. Payne foi um renomado médico patologista britânico, que atuou também como escritor da História da Medicina. Em 1874, Payne foi agraciado com o convite para escrever no respeitável Goulstonian Lectures, onde escolheu o seguinte tema: "*On the origin and relations of new growths".*

Em 1908, Marburg (sem maiores detalhes) escreveu dois artigos sobre tumores da pineal (MARBURG, 1908 apud KAPPERS, 1979[6]). Neles, Marburg proveu a caracterização da entidade clínica da doença da pineal com base em 40 casos clínicos na literatura e um dos seus, assim classificou em três níveis: hipopinealismo, hiperpinealismo e apinealismo. O hipopinealismo foi associado à hipertrofia dos genitais e precocidade sexual e corporal. Já o hiperpinealismo foi associado à obesidade.

[4] OESTREICH, R.; SLAWYK, T. Riesenwuchs und zirbeldriisen-geschwulst. Virchows Arch. f. path. Anat., v. CLVII, p. 475, 1899.
[5] OGLE, C. Tumor of Pineal Body in a Boy. Tr. Path. Soc. London, v.1, p. 6, 1899.
[6] MARBURG, O. Die Adipositas cerebralis. Ein Beitrag zur Pathologie der Zirbeldriise, Wien. reed. Wochnschr., v. LVIII, p. 2617-, 1908.

E o apinealismo foi associado à caquexia. Desta forma, a pineal e a hipófise teriam efeitos orgânicos opostos. Ainda, Marburg considerou que a glândula pineal somente funcionaria nos primeiros anos de vida inibindo o crescimento somático e sexual, sua destruição parcial por tumores resultariam em hipopinealismo e permitiria o desenvolvimento destas características, o que era corroborado pela ausência de anormalidades sexuais em adultos jovens e adultos maduros.

A partir dos artigos de Marburg, outros se sucederam relatando a relação de tumores da pineal com precocidade sexual ou somática junto de obesidade, respectivamente os artigos de von Frankl-Hochwart (1909) (VON FRANKL-HOCHWART, 1909 apud DANDY, 1915[7]) e Raymond junto de Claude (1910) (RAYMOND e CLAUDE, 1910 apud DANDY, 1915[8]).

Em 1910, C.M. Hinds Howell (1877-1960), médico neurologista britânico, descreveu três relatos de casos médicos sobre tumores da glândula pineal. Escreveu curiosamente em sua primeira oração do artigo: “Tumours of the pineal body are of considerable considerable interest both from a clinical and pathological point of view”. Assim, a caracterização de Marburg estava crescentemente aceita na literatura médica. Após confrontar os achados clínicos com os de necropsia, Howell conclui tratar-se de teratomas da pineal.

Sobre esta evolução na descrição da pineal, Jordan (1912) escreve uma crítica geral no periódico da Sociedade Americana de Microscopia (Transactions of the American Microscopical Society). Jordan afirma que os estudos sobre a pineal foram impulsionados em grande parte pelos estudos com a hipófise, e que apesar da pineal ser estudada em diversas direções, chamá-la de glândula ainda é prematuro (“In view of certain contradictory histological and experimental results, it seems premature to speak

[7] VON FRANKL-HOCHWART, L. Über diagnose der zirbeldrflsentumoren, Deutsch.Ztschr. f. Nervenh., v. XXXVII, p. 455, 1909.
[8] RAYMOND, F.; CLAUDE, H. Les tumeurs de la glande pinéale chez l'enfant. Bull. de l'Acad, de todd. de Paris, v. LXIII, n. 3, p. 265, 1910.

of a pineal 'gland'"). Segue explicando que a ausência de ductos excretórios, presença de profusa vascularização e de cistos, justifica como um órgão de secreção interna.

Trabalhos experimentais sobre a pineal só ocorreram a partir de 1910, com pinealectomia total ou parcial no sentido de simular apinealismo ou hipopinealismo, respectivamente. Assim, Exner e Boese (1910) promoveram a pinealectomia total ou parcial em cães, porém não observaram quaisquer diferenças em peso e desenvolvimento corporal bem como sexual (EXNER e BOESE, 1910 apud DANDY, 1915[9]). Já Foà (1911) ao executar a pinealectomia total de frangos observou desenvolvimento prematuro das características sexuais primárias e secundárias (FOÀ, 1911 apud DANDY, 1915[10]). Sarteschi (1913) observou obesidade, maior desenvolvimento somático e genital bem como precocidade sexual em cães jovens submetidos à pinealectomia (SARTESCHI, 1913 apud DANDY, 1915[11]).

Trabalhos experimentais para simularem hiperpinealismo usaram a suplementação com extratos de pineal. Berkely et al. (1913) adicionaram extratos de pineal de bovinos jovens na alimentação de filhotes de porquinhos-da-índia, coelhos e gatos, sendo que observaram aumento de 25% no peso corporal destes animais. Em 1914, McCord proveu alimentação com extratos de pineal a diversos animais (porquinho-da-índia, frangos e cães), os quais apresentaram aumento de peso também junto de precocidade da maturidade sexual e das características sexuais. No mesmo ano, Dana e Berkeley injetaram extrato de pineal em 50 crianças e observaram que elas cresceram menos em altura e peso do que as controle, porém maturidade mental foi observada.

Em 1915, Walter Edward Dandy (1886-1946), neurocirurgião estadunidense, descreve minuciosamente o método de pinealectomia em cães motivado pela alta taxa

[9] EXNER, A.; BOESE, J. Ueber experimentelle exstirpation der glandula pinealis. Deutsch. Ztschr. f. Chit., v. CVII, p. 182, 1910.
[10] FOÀ, C. Ipertrofia 'dei testicoli e della cresta dopo l'asportazione della ghiandola pineale nel gallo, Pathologica, v. IV, p. 445, 1911.

de insucesso (mortalidade pós-cirúrgica elevada) alcançado em trabalhos experimentais com mamíferos, e também, pelo uso de sua técnica de hemoestase por clipe metálico nas cirurgias de hidrocefalia, a qual poderia aumentar o sucesso da pinealectomia. Neste extenso artigo (20 páginas), Dandy destaca já no primeiro parágrafo que a localização inacessível da pineal tem desencorajado muitos experimentadores, posteriormente, destaca que a história nos estudos de outras glândulas (tireóide, paratireóide, hipófise e adrenais) tem contribuído para os recentes esforços em mostrar a importância desta entre as glândulas endócrinas. Dandy é considerado o "Pai da Neurocirurgia", com contribuição inestimável ao tratamento da hidrocefalia (após caracterização feita por ele), cirurgia para aneurisma cerebral, realização de aproximadamente mil operações por ano nos anos mais atribulados e o estabelecimento da primeira unidade de tratamento intensivo no Hospital Johns Hopkins (SHERMAN et al., 2006). O conhecimento sobre a pinealectomia lhe foi útil na prática médica em 1921, quando realizou a retirada com sucesso de tumores da região da pineal (SHERMAN et al., 2006). No artigo, Dandy obteve sucesso na nova técnica de pinealectomia em cães jovens e o acompanhamento pós-cirúrgico não confirmou nenhum dos achados experimentais antes observados na literatura e aqui apresentados, o que o fez concluir que "The pineal is apparently not essential to life and seems to have no influence upon the animal's well being". Este artigo praticamente "sepultou" a caracterização da sintomatologia clínica da pineal por Marburg, o que foi definitivamente feito em 1920 por Sisson e Finney, que demonstraram que administração de extratos secos de pineiais a ratos não promoveu quaisquer efeitos sobre o desenvolvimento somático bem como sexual e de nenhuma forma precocidade, inclusive chegaram a afirmar a inexistência de princípio ativo na glândula.

[11] SARTESCHI, U., La sindrome epifisaria "macrogenitosomia precoce" attenuta sperimentalmente nei mammiferi. Pathologica, v. 707, 1913.

Em 1917, Carey Pratt McCord e Floyd Pierpont Allen observaram que a alimentação com extratos de pineal de bovinos a girinos (larvas de anuros) promoviam rápido e profundo clareamento da pele destes animais pela forte agregação dos melanossomas dentro dos melanóforos dermais. Então, eles sugeriram pioneiramente que a glândula pineal continha uma substância ativa (na íntegra: "it contains within itself na active principle capable of inducing pigment changes independent of and wholly apart from environmental conditions"). Isto foi fortemente contestado por Henry Laurens ainda em 1917 (LAURENS, 1917 apud BAGNARA e HADLEY, 1970[12]).

Em 1918, Nils Holmgren descreve, após sucessivas análises microscópicas, a similaridade entre a retina e a glândula pineal em sapos (HOLMGREN, 1918 apud KELLY e SMITH, 1964[13]). No mesmo ano, Shuller é o primeiro a descrever a calcificação da pineal numa radiografia de crânio humana, isto foi um marco para topografia cerebral e orientou a localização de patologias intracranianas. Somente em 1954, a calcificação da pineal é associada ao envelhecimento por Julian I. Kitay. E em 1978, Michael Cohen et al. afirmam que a diminuição da função pineal (inclusive por calcificação) poderia aumentar a ocorrência de câncer de mama em mulheres, o que foi naquele mesmo ano debatido em outros artigos sequenciais na revista científica The Lancet.

O papel cromático da pineal foi extensivamente revisado por uma série de trabalhos, particularmente em anfíbios. Isto abriu possibilidade para especulações sobre o papel fótico da pineal associada ou não a áreas epitalâmicas (SCHARRER, 1928; YOUNG, 1935), o que só foi confirmado por meio de observações em microscopia eletrônica da presença de elementos fotoreceptivos na pineal de répteis ("olho parietal") semelhantes aos dos olhos verdadeiros (ou "laterais") (EAKIN e

[12] LAURENS, H. The reactions of the melanophores of Amblystoma tigrinum larvae to light and darkness. J. Exp. Zool., v. 23, p. 195-205, 1917.
[13] HOLMGREN, N., Zur Kenntnis der Parietalorgane von *Rana temporaria.* Arkiv. Zool., n. 24, p. 11, 1918.

WESTFALL, 1959 e 1960; STEYN, 1959 e 1960). O papel cromático da pineal só seria de fato esclarecido em 1958 pelo médico dermatologista estadunidense Aaron Lerner (1920-2007) junto de outros quatro colaboradores. Lerner e sua equipe isolaram a substância da pineal responsável pela agregação dos melanossomos (a partir de 200.000 pineais de bovinos em quatro anos) e, a chamaram de melatonina.

A partir de 1947, avança o número de artigos sobre a glândula pineal. Desta maneira, apenas alguns artigos a partir deste período são aqui destacados para mostrar a evolução da pesquisas sobre a mesma.

Em 1964, Quay descreve o ritmo circadiano de secreção da melatonina, na qual a secreção da melatonina é controlada pela variação luminosa ambiental, o que já havia sido previsto de alguma maneira por ele em 1961. Em 1965, Julius Axelrod junto de Quay e Baker relatam a síntese da melatonina.

Em 1973, Piechowiak demonstra que a circulação sanguínea na pineal é a segunda maior do organismo perdendo somente para os rins. Em 1983, Redman et al. mostram que administração de melatonina em ratos é capaz de ajustar o ritmo circadiano endógeno. E em 1986, Arendt et al. mostram o efeito da administração de melatonina em humanos que sofriam de “jet-lag”.

Em 1995, Reppert et al. executam a clonagem de três receptores para melatonina (Mel1a, Mel1b e Mel1c) (revisto por REPPERT et al., 1996). No mesmo ano, a melatonina é proibida para ser consumida livremente na Alemanha, porém nos Estados Unidos é estimado que cerca de 50 milhões de comprimidos foram comercializados. Em 1997, a comercialização da melatonina fica livre de prescrição médica nos Estados Unidos.

Cumpre salientar que importantes revisões recentes em espanhol (LÓPEZ-MINÕZ et al., 2010a e 2010b) e em inglês (SIMMONEAUX e RIBELAYGA, 2003) sobre o histórico da glândula não contemplam a abordagem aqui feita. Desta maneira, esta abordagem mesmo que ampla é justificada.

2.1.2 Anatomia da Pineal

A glândula pineal é um órgão peculiar em seu aspecto anatômico mesmo dentro da classe dos mamíferos com diferenças tanto inter- como intra-espécies. Esta variablidade ocorre pelas diferenças adaptativas espécie-específicas na função pineal (DAWSON e VAN DEN HEUVEL, 1998).

Em humanos, a pineal ocupa 1–2mm na linha alba (ou branca), sendo um ponto de referência para o plano sagital mediano dentro do crânio. Suas dimensões em humanos adultos são de 5-9 x 1-5 x 3-5 mm (comprimento x largura x espessura), com peso médio variando de 100-180 mg na dependência da idade ou do gênero (ARENDT, 1995), sendo maior em homens do que mulheres e maiores em adultos do que idosos e crianças.

O tamanho da glândula pineal é bastante diferente entre as espécies e apresenta uma relação de tamanho proporcional ao restante do cérebro, em alguns pássaros alcança cerca de 10% do cérebro em volume. Animais que habitam altas altitudes (pólos), como focas, têm pineais maiores que os animais que vivem nas áreas tropicais e, os mais jovens das áreas polares possuem uma pineal bem maior e mais ativa na produção de melatonina (BRYDEN et al., 1986 e 1994). Na mesma direção, um amplo estudo de correlação entre espécies animais e suas respectivas localizações

geográficas (correlação zoogeográfica) mostrou que todas as espécies de lagartos que não apresentam glândula pineal estão restritos a viver nas baixas latitudes (trópicos) e, ao contrário, os que apresentavam tinha distribuição mais ampla, ou seja, das baixas a altas latitudes (RALPH, 1975).

A classificação anatômica da pineal mais amplamente usada é a proposta por Vollrath (1979), esta se baseia na posição relativa da pineal a duas estruturas, diencéfalo e terceiro ventrículo, além do seu formato e tamanho. De acordo com a classificação de Vollrath existem três tipos de pineal, esclarecendo: tipo A, tipo B e, tipo C. A pineal – tipo A é compacta e arredondada repousando proximalmente na porção posterior do diencéfalo, exemplo inclui a dos humanos. A pineal – tipo B é ligeiramente alongada e estende-se a partir da porção posterior do diencéfalo até a proximidade da porção anterior do cerebelo, exemplo inclui a dos cães. A pineal – tipo C é alongada e estende-se a partir da porção posterior do diencéfalo até a porção anterior do cerebelo, por exemplo, a dos roedores.

Alguns crânios fossilizados de vertebrados apresentavam o forame pineal, o que está de acordo com achados em animais como a lampréia e tuatara que apresentavam a pineal como um órgão parietal com capacidade fotosensível (“terceiro olho”) (SCHWAB e O’CONNOR, 2005). As microestruturas deste órgão são homólogas aos da córnea e retina, o que será visto adiante. Nos mamíferos e outros animais que perderam o olho parietal, o saco pineal é retido e condensado até formar a glândua pineal (SCHWAB e O’CONNOR, 2005). Uma curiosa exceção é o pássaro Melovatka, um fóssil encontrado na Rússia referente ao período Cretácelo – 90 milhões de anos, o mesmo possui ambos, olho parietal e glândula pineal (KUROCHKIN et al., 2007).

A glândula pineal pode ser um alvo que integra as informações de citocinas

centrais e periféricas, visto que está localizada em uma região especial (órgão circunventriculares), onde a barreira hematoencefálica não se apresenta de forma plena (PEDERSEN et al., 1997; DUVERNOY e RISOLD, 2007). Portanto, é plausível pensar que o estresse possa agir sobre a pineal na dependência da reatividade da mesma a substâncias (revisto por COUTO-MORAES et al., 2009).

Os órgãos circunventriculares são estruturas situadas na linha média que circundam terceiro e quarto ventrículos, sendo áreas únicas do cérebro a estarem fora da barreira hemato-encefálica, assim estas áreas são importantes sítios por se comunicarem quimicamente com o líquor e o cérebro bem como com órgãos periféricos por meio de produtos carreados no sangue. Os órgãos circunventriculares incluem: *organum vasculosum* da lâmina terminal, órgão subfornical, glândula pineal, órgão subcomissural, área postrema e, lobos intermediário e neural da hipófise (neurohipófise ou hipófise anterior, ou ainda, pituitária anterior) (DUVERNOY e RISOLD, 2007).

2.1.3 Histologia da Pineal

A pineal, em humanos, é descrita como apresentando um núcleo central composto de lóbulos (parênquima lobular) cercado de espaços teciduais conectivos e um córtex (periferia) com uma distribuição mais difusa de neurônios. A superfície glandular é coberta por uma cápsula da pia-mater (SCHWAB e O'CONNOR, 2005). Esta glândula é composta principalmente por dois tipos celulares: pinealócitos (maioria) e astrócitos (BURKITT et al., 1994), porém outros tipos celulares estão presentes.

O principal tipo celular do parênquima pineal é o pinealócito (revisão em KORF, 2000), estes possuem um núcleo proeminente com aspecto granular, com quatro a seis

processos citoplasmáticos terminando num pedículo proximal a capilares fenestrados, uma configuração característica das glândulas endócrinas (revisto por BHATNAGAR, 1992). Os pinealócitos são os responsáveis pela produção do hormônio melatonina, apresentando todas as enzimas responsáveis para tal (RIBELAYGA et al., 1999), o qual será visto em detalhes mais adiante.

Entre os pinealócitos, células intersticiais estão presentes e a função seria apenas de suporte (CALVO et al., 1988).

Neuroglia também está presente, a maioria é de astrócitos fibrosos, seguido de microglia (PEDERSEN et al., 1993), irregularmente distribuídos e frequentemente encontrados ao redor dos pinealócitos e nas extremidades da glândula (VOLLRATH, 1984). Cumpre salientar que, não existe uma distribuição uniforme das células em toda extensão da glândula. Isto foi especialmente avaliado nas células da neuroglia, e foi visto que a microgilia apresenta variável distribuição ao longo de toda a glândula, ou seja, a proprorção volumétrica da mesma está na dependência do segmento histológico avaliado, e isto muda no desenvolvimento do animal desde o nascimento (TSAI e MCNULTY, 1997).

Fagócitos estão presentes intimamente nos vasos sanguíneos da pineal, portanto, são fagócitos perivasculares, ainda são células apresentadoras de antígenos (SATO et al., 1996).

Neurônios pineais estão presentes em vertebrados superiores e ausentes em roedores (revisto por MOLLER e BAERES, 2002).

Células tipo-neurônio peptidérgicos estão presentes em algumas espécies e possuem uma função regulatória páracrina (revisto por MOLLER e BAERES, 2002).

Os pinealócitos dos mamíferos não são sensíveis à luz (diretamente), porém

mantém muitas características de fotorreceptores verdadeiros e modificados encontrados em peixes, anfíbios, répteis e aves, incluindo imunorreatividade para proteínas específicas de fotorreceptores como: rodopsina, antígeno S e recoverina (HUANG et al., 1992; KORF et al., 1992).

Depósitos calcáreos, chamados de *acervuli* ou *corpora arenacea* ou ainda área cerebral, são uma característica radiográfica distinguível da pineal. Estes depósitos aparecem tanto no parênquima como no espaço intersticial como camadas de concreções (apenas em microscopia eletrônica) de sais de cálcio (fosfato de cálcio e carbonato de cálcio) e magnésio (fosfato de magnésio), fosfato de amônio e outros microelementos (BOCCHI e VALDRE, 1993). Os depósitos de cálcio (BACONNIER et al., 2002), fósforo (BACONNIER et al., 2002) e flúor (LUKE, 1997) têm sido relacionados com o envelhecimento. Sua formação se dá pela combinação de um polipeptídeo secretado pelos pinealócitos e o cálcio (inicialmente) acumulado intersticialmente e intracelularmente (LUKASZYK e REITER, 1975). Estes depósitos estão presentes desde o nascimento, mas sua densidade gradualmente aumenta com a idade, estabilizando na maturidade (HELMKE e WINKLER, 1986). Estudos radiográficos têm falhado em mostrar uma correlação direta entre o grau de calcificação e a função secretória (ARENDT, 1995). Todavia, a densidade da calcificação detectada por tomografia computatorizada tem sido usada para estimar o tamanho do tecido funcional, o que tem revelado correlação negativa com a idade (KUNZ et al., 1998) e com distúrbios de sono (KUNZ et al., 1999).

2.1.4 Embriologia da Pineal

A glândula pineal é derivada do neuroectoderma do teto diencefálico (ROSS et al., 1993) como uma evaginação da parte posterior do teto do terceiro ventrículo (DUVERNOY et al., 2000).

Em humanos, o desenvolvimento da pineal se inicia na 8ª semana de gestação, aparece como uma evaginação do revestimento ependimário na porção diencefálica do terceiro ventrículo entre as comissuras habenular e posterior, pela qual mantém um pedículo ("pineal stalk") composto de uma lâmina rostral e caudal. Desta forma, a pineal é cercada pela piamater e está suspensa no recesso pineal cheio de líquor, diretamente abaixo do esplênio (DUVERNOY et al., 2000). Ainda em humanos, o crescimento da pineal em volume ocorre até 1-2 anos de idade e, a partir daí, fica estável (SCHMIDT et al., 1995; SUMIDA et al., 1996), porém seu crescimento em peso ocorre gradualmente a partir da puberdade (TAPP e HUXLEY, 1971 e 1972).

2.1.5 Patologias da Pineal

Cistos gliais e menos frequentemente cistos benignos ependimais são observados, e podem levar a uma degradação morfológica e funcional do tecido pineal (TAMAKI et al., 1989). Contudo, a alteração morfológica e funcional mais consistentemente observada é a presença de pinealoma, ou adenoma pineal, que é raro tanto em animais como em seres humanos (JONES et al., 2000).

Histologicamente, o pinealoma se apresenta com uma mescla indiscriminada de grupos de grandes células epitelióides (derivadas dos pinealócitos) com grupos de

pequenas células (neuroglia), com grande atipia celular (SOLLEVELD et al., 1991), pode conter pequenos núcleos arredondados que sugerem ser linfócitos (JONES et al., 2000). Em humanos, apresenta duas formas citológicas principais. Numa primeira apresentação, as células neoplásicas se assemelham aos pinealócitos e, então, o tumor é chamado de pineocitoma. Noutra apresentação, as células neoplásicas consitem de células primitivas, então, é chamado de pineoblastoma. Uma terceira apresentação citológica é possível, consiste de uma combinação dos dois tipos anteriores, assim é chamado de pineocitoma-pineoblastoma misto (JONES et al., 2000). Todos os tumores da pineal raramente apresentam metástases (KRINKE et al., 2000).

As neoplasias da pineal são incomumente descritas em animais, exceto em estudos de patologia toxicológica (animais de laboratório) ou na investigação de outras moléstias do cérebro (animais domésticos) (revisão por KRINKE et al., 2000). Já foi descrito nos seguintes animais não-experimentais: raposa e cavalo (JONES et al., 2000).

2.1.6 Vascularização da Pineal

Curiosamente, o fluxo sanguíneo (estimado) em pineais de ratos é de 4 mL/min/g, sendo que este fluxo é o segundo maior do organismo animal, menor somente do que o dos rins (PIECHOWIAK, 1973). Esta particularidade parece ser verdade para diversos outros mamíferos, visto que é destacável a rica vascularização da pineal em toda esta classe (VILLEGAS, 2004).

A pineal recebe abundante suprimento sanguíneo de ramos das artérias coroidais posteriores, incluindo os ramos quadrigeminal, talâmico, póstero-medial e

póstero-lateral, derivadas das artérias cerebrais que se direcionam pelo aspecto posterior do mesencéfalo (REITER, 1981). Retorno venoso se dá pelo sino tentorial por veias de curto trajeto que desembocam em veias cerebrais internas e veias basais de Rosenthal, as quais formam a grande veia cerebral – veia de Galeno. Artérias e veias frequentemente entram na pineal por hilos vasculares como vasos pareados. O sistema capilar interno é extenso e caracterizado por uma rede de grandes capilares sinusóides nos septos separando os lóbulos localizados no centro da glândula, enquanto a periferia apresenta poucos e menos calibrosos vasos (DUVERNOY et al., 2000).

2.1.7 Inervação da Pineal

Fibras simpáticas e parassimpáticas, bem como do SNC, inervam a glândula pineal. Apesar de ser uma estrutura do prosencéfalo (*forebrain*) localizada dentro do mesencéfalo (*midbrain*), a pineal se difrencia de outras estruturas cerebrais em receber relativamente pouca inervação aferente do próprio cérebro. As aferências mais importantes são fibras não-mielínicas pós-ganglionares originárias do gânglio cervical superior (GCS) que formam o nervo bilateral coronário (KAPPERS, 1979), os quais percorrem rostralmente junto da veia de Galeno antes de entrar a pineal posteriormente. Outro grupo de aferências entra a pineal anteriormente por meio de pedículos comissurais, com fibras mais numerosas na comissura habenular do que na posterior, provavelmente originárias do hipotálamo (VOLLRATH, 1984). Um terceiro grupo de fibras, agora mielinizadas, o trato pineal ventro-lateral tem sido recentemente descrito como formado na região pretectal, posterior e lateral da comissura posterior (SPARKS, 1998).

A maioria das terminações nervosas não está em contato direto com os pinealócitos, se encontra em espaços perivasculares com proximidade aos processos dos pinealócitos. Entretanto, neurotransmissão por difusão através do espaço extracellular é relativamente lenta, e pode não dar conta completamente a uma rápida resposta fisiológica da pineal à luz. Na verdade, contatos do tipo-sinapse entre fibras nervosas e pinealócitos têm sido observados em algumas espécies, inlcuindo primatas não-humanos (ICHIMURA et al., 1986).

Em humanos e outros mamíferos, a inervação mais desenvolvida e melhor estudada é a via simpática noradrenérgica formada por corpos celulares localizados dentro do gânglio cervical superior (par) que alcançam a pineal pelo nervo coronário como já apresentado. Estes neurônios pós-ganglionares recebem entrada regulatória dos núcleos supraquiasmáticos – SCNs (do inglês, *suprachiasmatic nucleus*) do hipotálamo, que por sua vez, recebem entrada direta das células ganglionares da retina (KAPPERS, 1960 e 1979), via trato retino-hipotalâmico, monosinapticamente (MEIJER e RIETVELD, 1989). Em mamíferos, incluindo os humanos, estas células ganglionares foram recentemente mostradas em conter um novo fotopigmento, a melanopsina, assim chamadas por serem primeiramente isoladas dos melanóforos dermais de sapos (PROVENCIO et al., 2000). Estas células ganglionares contendo melanopsina são intrinsicamente fotorreceptivas, e apresentam máxima atividade em comprimentos luminosos de onda-curtos em 484 nm (BERSON, 2003).

Vale salientar que, melanopsina é necessária para muitas funções visuais que não formação de imagem, algumas destas incluem fotorregulação dos ritmos circadianos, reflexo pupilar à luz e, supressão da melatonina rítmica. Todavia, estas funções estão desreguladas em animais com perda de melanopsina, mas não estão

inteiramente abolidas, o que sugere que estas células ganglionares na origem do trato retinohipotalâmico (TRH) também recebem e transmitem informação fótica dos clássicos fotoreceptores, cones e bastonetes (BERSON, 2003).

Neuropeptídeo Y (NPY) está colocalizado com a noradrenalina (NA) nas fibras simpáticas pós-ganglionares na maioria dos mamíferos, e assim é capaz de modular a transmissão noradrenérgica pré- e pós-sináptica (SIMONNEAUX et al., 1994; MIKKELSEN et al., 2000). Da mesma forma, NA e ATP são co-liberados em ratos (BARBOSA et al., 2000).

Existe evidência que fibras nervosas centrais entram na pineal humana através das comissuras habenular e posterior bem como pelo pedículo pineal (KAPPERS, 1960; MOLLER, 1978). Em macacos, estas fibras têm sido mostradas se originarem no hipotálamo, sistema límbico e estruturas visuais, contendo vários peptídeos (substância P, vasopressina, oxitocina). Isto sugere que sejam análogas a fibras neurosecretórias encontradas na hipófise (ICHIMURA, 1992).

Inervação parassimpática da pineal não tem sido tão minuciosamente investigada, em humanos. Fibras contendo o neurotransmissor parassimpático primário, acetilcolina, são encontradas em algumas espécies de mamíferos, tais como: vacas (PHANSUWAN-PUJITO et al., 1991) e ratos (WEIHE et al., 1996), e talvez em macacos (DAVID e KUMAR, 1978), pois atividade da acetilcolinesterase foi observada.

Existe alguma evidência, em mamíferos, que fibras parassimpáticas possam ser originárias do gânglio pterigopalatino e contém o peptídeo intestinal vasoativo – VIP (do inglês, *vasoactive intestinal peptide*) (MOLLER, 1992). Em humanos, existe especulação que fibras parassimpáticas oriundas dos gânglios de Marburg e Pastori, localizados acima e abaixo da veia de Galeno, inervam também a pineal (MOLLGARD e

MOLLER, 1973; VOLLRATH, 1984; MOLLER, 1992).

Além do NPY, que está colocalizado com a NA em fibras simpáticas, outros peptídeos têm sido encontrados em fibras nervosas terminando em áreas perivasculares e intraparenquimais na pineal, tais como: substância P, vasopressina, oxitocina e hormônio luteinizante (BARRY, 1979; RONNEKLEIV, 1988), porém a origem destas fibras peptidérgicas é desconhecida. Experimentos, em roedores, traçaram fibras VIP-imunorreativas no gânglio pterigopalatino, no CSG e no núcleo paraventricular do hipotálamo – PVN (do inglês, *paraventricular nucleus*) (SHIOTANI et al., 1986; MIKKELSEN e MOLLER, 1988; SASEK e ZIGMOND, 1989). O PVN contém corpos celulares das fibras vasopressinérgicas e ocitocinérgicas encontradas na pineal. Já a substância P, pode ser originária nos núcleos da habênula (LARSEN et al., 1991). Neuropeptídeos podem também ser expressos nas células intrapineais, os quais têm sido mostrados exibir imunorreatividade para encefalina, em humanos (MOORE e SIBONY, 1988). Fibras contendo PACAP (do inglês, *pituitary adenylate cyclase activating peptide*) como neurotransmissor inervam a glândula pineal e são provenientes do gânglio trigeminal (SHIOTANI et al., 1986).

2.1.8 Fisiologia da Pineal

A secreção de melatonina na circulação e no líquor apresenta um ritmo diário, ocorrendo mais intensamente no escuro, e com isto sinaliza a alternância entre dia e noite e as estações do ano (revisto por MARKUS et al., 2003). Portanto, a pineal exerce papel de organizador temporal dos eventos fisiológicos e comportamentais permitindo a adaptação do indivíduo e da espécie às variações temporais cíclicas, ou seja, a pineal é

um transdutor fotobiológico (revisto por MARKUS et al., 2003).

A biossíntese de melatonina, independente de fotoestímulo ambiental, é controlada de maneira direta por um oscilador central localizado nos SCNs (zona dorso-mediana). Por sua vez, a síntese de melatonina que é dependente do ciclo claro-escuro ambiental é controlada pelo trato retinohipotalâmico (TRH), que se projeta da retina aos SCNs (zona ventro-lateral) (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Em diversos vertebrados, a exposição à luz no período noturno pode interromper a reação em cadeia dos eventos enzimáticos da biosíntese da melatonina (MOORE et al., 1967). Portanto, a produção pineal de melatonina é estimulada pela escuridão e inibida pela luz.

A partir da zona ventro-lateral dos SCNs, neurônios gabaérgicos se comunicam com neurônios pré-autonômicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), assim a luz promove estimulação destes neurônios inibitórios e, de modo oposto, a escuridão libera a inibição que sofria o PVN, o qual se comunica com o GCS (SAPER, 2005), em adição, durante o escuro um grupo de neurônios dos SCNs se encontram ativos (PERREAU-LENZ et al., 2005). Portanto, a síntese rítmica de melatonina não ocorre exclusivamente pela interrupção do efeito inibitório, mas também, pela ativação de efeito estimulatório. Além disto, é indubitavelmente dependente dos SCNs, visto que lesões do mesmo abolem a produção pineal de melatonina (KLEIN e MOORE, 1979).

Sobre condições de iluminação apenas diurna, este padrão de secreção é bastante estável em dias consecutivos dentro da mesma estação do ano, sobretudo aos animais que moram no Hemisfério Norte. A entrada fótica apresenta efeito agudo supressivo nos níveis notrunos de melatonina (LEWY et al., 1980). Esta supressão é dose-dependente e varia com as características do espectro de luz. Primeiramente com

base em pesquisas com animais, foi acreditado que somente altos níveis de intensidade luminosa poderiam exercer efeito inibitório em humanos. Posteriormente, outros estudos mostraram que baixos níveis de intensidade luminosa como os encontrados dentro das residências poderiam suprimir a produção noturna de melatonina (BRAINARD et al., 2001). Sendo que esta supressão em humanos, em geral, não é máxima e alcança níveis próximos a 70% de inibição da produção noturna de melatonina quando exposição a 3000 lux, e inibição se inicia a partir de 200 lux (MCINTYRE et al., 1989).

Entrada gabaérgica dos SCNs alcançam a subdivisão autonômica parvocelular do PVN (KALSBEEK et al., 2000). Eferências do PVN partem pelo complexo mesencéfalo medial e pela formação reticular se projetando a coluna intermédio lateral (IML) do cordão espinhal cervical (MOORE, 1996), onde fibras adrenérgicas pré-ganglionares então transmitem ao GCS; fibras adrenérgicas pós-ganglionares do GCS alcançam a pineal e liberam nodradenalina (BLACKSHAW e SNYDER, 1997).

Os adrenoceptores beta-1 localizados nos pinealócitos quando ativados desencadeiam sua atividade por meio da proteína G, então estimulam a produção de adenil ciclase, e iniciam a cascata da via de transdução AMPc-proteína quinase A (PKA) (SUGDEN e KLEIN, 1983). A ativação da via AMPc-PKA leva a transcrição do gene aa-nat (da enzima AA-NAT), pela fosforilação do fator de transcrição CREB por meio do fator P-CREB, pois o promotor do gene aa-nat, em roedores, possui sítios regulados por P-CREB. De forma interessante, a concentração do gene aa-nat, em pineal de roedores, apresenta ritmo de 24 horas com pico no período de escuro, coincidindo com a neurotransmissão simpática para a glândula. Por outro lado, a enzima HIOMT, apesar de apresentar atividade bastante controlada, possui maior

envolvimento nas variações fotoperiódicas de longo-prazo do que nas diárias de iluminação ambiental (revisto por SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003).

Os adrenoceptores alfa-1 também presentes nos pinealócitos potenciam a atividade β-adrenérgica por meio de um aumento pontual na atividade do Ca^{2+} bem como ativação da proteína quinase do tipo C (PKC) (SUGDEN et al., 1987; HO et al., 1987). Também foi observado que estimulação sinérgica de adrenoceptores alfa e beta resultam na elevação intracelular de AMPc, o qual aumenta a produção da enzima NAT (KLEIN, 1985).

No rato, a ativação do gene repressor precoce de AMPc induzível (ICER), o qual negativamente autoregula, é um mecanismo de controle para limitar a produção noturna de melatonina sob condições fisiológicas normais (STEHLE et al., 1993; TAKAHASHI, 1994). Existem suposições de um mecanismo regulatório parassimpático, baseado na observação que os pinealócitos do rato expressam todos os elementos do sistema glutamatérgico, e que a administração de glutamato inibe a atividade da AA-NAT (MORIYAMA et al., 2000). Além disto, acetilcolina pode disparar exocitose de microvesículas mediadas por glutamato, e assim, AMPc-estimulado por NA (YAMADA et al., 1998).

Recentemente, mostramos outro caminho de controle da síntese (pineal) de melatonina pelo fator de transcrição nuclear NFκB (FERREIRA et al., 2005). A ativação deste fator leva à inibição da transcrição do gene aa-nat, enquanto sua inibição potencia a transcrição do mesmo gene induzida por P-CREB. Por esse caminho, a citocina pró-inflamatória TNF, secretada, sobretudo por macrófagos, na fase precoce de resposta inflamatória, promove inibição da síntese noturna de melatonina (PONTES et al., 2006). Diferentemente, condições de inflamação crônica com aumento da

atividade do eixo HPA e, por conseqüente, aumento sérico persistente de corticosterona, cessa a melatonina sintetizada noturnamente após adrenalectomia (LOPES et al., 2001). Estes dados indicam que durante a inflamação não há produção noturna de melatonina; assim, o organismo animal fica “desligado” da variação fótica ambiental.

Importante considerar que NFκB é um fator de transcrição comum a vários tipos de estímulos, entre eles, a citocina pró-inflamatória TNF, produtos virais e bacterianos, mitógenos de linfócitos T e B, estresse oxidativo e muitas outras injúrias (KARIN e BEN-NERIAH, 2000; MEFFERT e BALTIMORE, 2005) tal como estresse (MERCIÉ et al., 1998). Recentemente, também vem sendo mostrado que NFκB é uma via importante na diferenciação neuronal. Na realidade existe, no mínimo duas vias de sinalização NFκB (canônica e não canônica) que estão sob controle de disparadores específicos e que podem ter alguma forma de conversa cruzada (revisto por BASAK et al., 2007).

No mesmo sentido, considerando que a via de transcrição do NFκB é reconhecidamente relevante para o controle da síntese de melatonina pela glândula pineal (FERREIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006); pode-se inferir ser um importante candidato para mediar às alterações que o estresse poderia gerar sobre a glândula pineal.

Vale lembrar que, a melatonina só foi descoberta em 1958 por Lerner e equipe. Sendo que somente em 1964, Quay descreve o ritmo circadiano de sua secreção. Na seqüência, Axelrod et al. (1965) relatam a síntese da melatonina (em anfíbios). Em 1974, Axelrod demonstrou que os pinealócitos possuíam toda a maquinaria responsável pela síntese de melatonina. A cascata bioquímica descrita por

Axelrod (1974), Klein (1985), Sugden (1989) e por Reiter (1991), podem ser assim sumarizadas: os pinealócitos captam o aminoácido essencial triptofano da circulação sanguínea e por meio de hidroxilação pela enzima triptofano-5-hidroxilase o converte a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), este por sua vez, é convertido a serotonina por decarboxilação pela enzima 5-HTP-decarboxilase, então a serotonina sofre acetilação pela enzima aril-alquil-N-acetil-transferase (AA-NAT nos roedores) ou simplemente N-acetil-transferase (NAT em humanos) originando o precursor final N-acetilserotonina, daí este sofre O-metilação pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) e, então, é finalmente formada a N-acetil-5-metoxitriptamina, ou seja, a melatonina.

2.1.9 Farmacologia da Melatonina

A seguir serão apresentados brevemente alguns apontamentos da farmacocinética e farmacodinâmica da melatonina.

a) Farmacocinética da Melatonina

A melatonina é uma molécula altamente lipofílica, ou seja, possui alto coeficiente de partição óleo-água, assim, é poucamente estocada nas células produtoras, após formada, ela é prontamente disponibilizada nos capilares (no caso de produção pela pineal), onde mais de 70% se encontra ligada à albumina plasmática (CARDINALI et al., 1972).

A meia-vida da melatonina, quando da administração intravenosa, é cerca de 30 minutos (MALLO et al., 1990), porém o padrão de eliminação é bifásico com

meias-vidas de cerca de 3 horas e 45 minutos após administração oral (ARENDT, 1995). A metabolização da melatonina é de primeira-passagem no fígado sendo que os rins também o fazem, sofre hidroxilação seguida de conjugação a sulfato e glucuronídeo. Hepatopatias (especialmente, cirrose) ou nefropatias (especialmente, falha renal crônica) alteram as taxas de depuração (LANE e MOSS, 1985; VILJOEN et al., 1992; KUNZ et al., 1999). A eliminação da melatonina é principalmente pela urina, em humanos, onde o seu principal metabólito, 6-sulfatóxi-melatonina, corresponde até 90% da melatonina (ARENDT, 1995).

A melatonina é detectada no líquor de mamíferos, incluindo primatas, onde sua concentração é bem superior aos níveis encontrados no sangue, e também na câmera anterior do olho que possui níveis equivalentes ao sangue possivelmente pela produção pelo corpo ciliar (MARTIN et al., 1992). A melatonina pode ser também encontrada em diversos fluidos relacionadas à reprodução, tais como: sêmen, líquido amniótico, leite e folículos ovarianos pré-ovulatórios (CAGNACCI, 1996). Os níveis detectados de melatonina no plasma, líquor, saliva e urina são eliminados após pinealectomia, portanto reflete a produção pela glândula pineal (NELSON e DRAZEN, 1999). Contudo, muitos estudos confirmam a existência de síntese de melatonina extra-pineal, como observado em certos órgãos ou estruturas, retina (de aves: SAMPAIO, 2009; de humanos: TOSINI, 2000), intestino (de humanos: BUBENICK, 2002) e medula óssea (de humanos e roedores - CONTI et al., 2000), e também, em células imunocompetentes humanas e de roedores (CARRILLO-VICO et al., 2004; MARTINS et al., 2004; PONTES et al., 2006). Portanto, a melatonina afeta funções fisiológicas pela ação local em adição a sua função regulatória central.

Em seres humanos saudáveis, concentração plasmática de melatonina inicia

aumento com níveis detectáveis (em torno de 5 pg/mL) durante o final da tarde e início da noite, os níveis máximos são alcançados no meio da noite e decréscimo inicia-se pouco antes do horário habitual de acordar.

Por radioimunensaio, a produção média de melatonina em adultos saudáveis foi estimada em 28,8 µg/dia (LACOSTE e WETTERBERG, 1993 apud PEISE, 2009[14]), ainda, 39,2 e 14,8 µg/noite foram valores encontrados para homens adultos jovens e mulheres na fase folicular do ciclo menstrual (GEOFFRIAU et al., 1998). Já pela cromatografia gasosa acoplada a espectometroia de massa, valores de 21,6 µg para mulheres e 35,7 µg para homens, com uma taxa constante de secreção a noite de 2,8 e 4,6µg/h em mulheres e homens, sendo que não houve diferenças relacionas à idade (FOURTILLAN et al., 2001).

Distúrbios na produção pineal de melatonina (sobretudo redução) são relatados em diversas doenças psiquiátricas e neurológicas como será abordado mais adiante nesta seção. Todavia, alterações dos níveis de melatonina podem estar associadas a uma alteração do sistema endócrino, e assim, serem apenas uma conseqüência de uma doença e não sua patogênese. Neste sentido, são destacadas todas as doenças que afetam a região hipotalâmica, tais como: degeneração do tronco encefálico, paralisia supranuclear progressiva; e também, as que afetam a função adrenérgica, exemplos incluem: atrofia sistêmica múltipla, síndrome de Shy-Drager, hipertensão ortostática idiopática, neuropatia autonômica diabética; estas e outras acabam por desregular a função pineal (revisto por PENEV e ZEE, 1997).

O descréscimo na produção pineal de melatonina pode ser também observado em agravos que tenham aumento da pressão intra-craniana, consequentemente do terceiro ventrículo, assim diminuição da circulação arterial cerebral, como acontence

[14] LACOSTE, V.; WETTERBERG, L. Individual variations of rhythms in morning and evening types with special emphasis on seasonal differences. In: WETTERBERG, L. (Ed.) Light and biological rhythms in man. New York: Pergamon Press, p. 287-304, 1993.

após acidente vascular cerebral – isquêmico ou hemorrágico – e, ruptura de aneurisma (PANG et al., 1990; YAMADA et al., 1991; FIORINA et al., 1996).

Níveis ausentes de melatonina foram encontrados, de modo inédito, em mastite aguda, uma doença inflamatória não-infecciosa. Detalhando, mães logo após parto que apresentaram mastite aguda apresentaram abolição dos níveis de melatonina no colostro (que reflete a produção pineal) quando os níveis da citocina TNF estavam presentes e com níveis aumentados, uma correlação inversa significativa (PONTES et al., 2006).

A exposição a campos eletromagnéticos são reconhecidamente capazes em afetar a atividade da pineal dos ratos, porém este efeito na produção de melatonina da pineal humana é inexistente (SELMAOUI et al., 1996). Um interferente à produção pineal humana de melatonina é o exercício físico (MONTELEONE et al., 1990; BUXTON et al., 1997). Outro interferente, em humanos, são as mudanças posturais, as quais decaem as concentrações de melatonina tanto salivares como plasmáticas quando de decúbito passa-se a posição ereta, e vice-versa (DEACON e ARENDT, 1994; KRÄUCHI et al., 1997).

Diante das diversas possiblidades de redução e até mesmo abolição da produção pineal de melatonina e de todas as propriedades da melatonina, estudo recente verificou a viabilidade da utilização da melatonina, por meio de parâmetros farmacocinéticos, a pacientes críticos alocados em unidades de terapia intensiva, e verificaram que a suplementação de 3 mg mantém níveis farmacológicos de melatonina até 10 horas após a administração oral, o que pode ser útil pelas propriedades antioxidantes e soporíferas da mesma (MISTRALETTI et al., 2010).

A quantidade de melatonina produzida em indívíduos saudáveis é bastante

estável, ou seja, as oscilações de uma noite a outra são pequenas (LUSHINGTON et al., 1996). Contudo, fatores como tempo, duração e quantidade da produção noturna de melatonina mostram diferenças individuais marcantes (ARENDT et al., 1979; BERGIANNAKI et al., 1995). Salientado que produção pineal de melatonina é independente do estado sono-vigília (MORRIS et al., 1990; VON TREUER et al., 1996).

b) Farmacodinâmica da Melatonina

A melatonina atua intracelularmente sem a necessidade de receptores, e também, por uma série de receptores (de membrana e intracelulares) que foram classificados e reclassificados conforme a espécie e as características funcionais dos mesmos, para maiores detalhes consultar revisão por Jockers et al. (2008).

Dois subtipos de receptores para melatonina foram identificados em humanos, a saber: Mel_{1a} (chamado atualmente de MT1) e Mel_{1b} (chamado atualmente de MT2), sendo que os mesmos possuem afinidades diferentes à melatonina (picomolar ou nanomolar, respectivamente) e localização cromossômica diferente (4q35 ou 11q21–22, respectivamente) (REPPERT et al., 1995).

Os receptores de melatonina acoplados à membrana plasmática são encontrados em muitos órgãos/tecidos/células periféricos.

O RNAm para MT1 foi detectado no núcleo supraquiasmático, o qual controla a produção rítmica de melatonina pela pineal como já explanado (REPPERT et al., 1988; WEAVER e REPPERT, 1996). Ambos receptores (MT1 e MT2) foram encontrados no cerebelo (AL-GHOUL et al., 1998) e na retina (bastonete, células amácrinas horizontais e ganglionares) (REPPERT et al.,1995; SCHER et al., 2002).

Fora do sistema nervoso central, receptores de melatonina (em humanos) foram encontrados em células imunocompetentes (já relatado), células epiteliais prostáticas (ZISAPEL et al., 1998), células da granulosa em folículos pré-ovulatórios (YIE et al., 1995), espermatozóides (VAN VUUREN et al., 1992), na camada mucosa e submucosa do cólon (POON et al., 1996) e, em plaquetas (VACAS et al. 1992). Salienta-se que a expressão de genes para tais receptores dentro do sistema imune (órgãos linfóides e células imunes) se mostra espécie-específica e órgão-específica (SKWARLO-SONTA, 2002).

Receptores para melatonina estão amplamente distribuídos no feto humano (THOMAS et al., 1998), sendo que os pinealócitos do feto são capazes de sintetizar melatonina já por volta da 26ª semana de gestação. Todavia, os níveis de melatonina não exibem variação circadiana e responsividade à luz nos primeiros 2–3 meses de vida pós-natal (KENNAWAY et al., 1998). O estabelecimento de ritmicidade na produção de melatonina está associado a mudanças no controle termoregulatório dos neonatos (WURTMAN et al., 1991).

Mesmo na ausência de receptores, a alta difusibilidade da melatonina permite que ela exerça efeitos sistêmicos em grande parte em nível celular, com modulação de funções do citoesqueleto (como mitóticas) por meio da ligação com calmodulina (BENITEZ-KING, 1993; FJAERLI et al., 1999), bem como sua ação antioxidante a mais consistentemente descrita após a ação cronobiótica (HARDELAND e FUHRBERG, 1996; CUZZOCREA e REITER, 2001).

2.1.10 Papeis Biológicos da Melatonina

A glândula pineal exerce seus efeitos sob a fisiologia dos mamíferos por uma variedade de funções, a saber: fototransdutora, reguladora parácrina (cérebro) e endócrina (outros órgãos). Enquanto o papel fisiológico da melatonina é bem mais amplo. Além da clássica ação cronobiótica da melatonina, essa indolamina exerce outros importantes efeitos, como ação antioxidante (HARDELAND e FUHRBERG, 1996; CUZZOCREA e REITER, 2001), ação antiapoptótica (SRINIVASAN et al., 2005), sincronização do ciclo de parasitas em sua relação com o hospedeiro (HOTTA et al., 2000), efeito antiinflamatório (LOPES et al., 1997), expressão da ritmicidade sazonal (ARENDT, 1995), modulação de ritmos circadianos (ARENDT, 1995), regulação do sono (LAVIE, 1997), modulação da reprodução (BINKLEY, 1988), regulação cardiovascular (VEERMAN et al., 1995), regulação do sistema imune (SKWARLO-SONTA, 2002) e, muitas outras. Associação dos níveis de melatonina a desordens psiquiátricas, como depressão sazonal, e também, neurológicas, como Alzheimer e Parkinson, têm sido ampliadas mais recentemente.

A regulação do sono é uma das funções da melatonina mais amplamente investigadas e a regulação do sistema imune é uma das áreas que mais cresce e teve especial interesse no desenvolvimento e na confecção desta tese.

A seguir serão apresentados brevemente alguns papeis biológicos da melatonina relacionados ao contexto da presente tese.

a) Controle dos Ciclos Sazonais

Na maioria dos vertebrados, variações sazonais na duração do fotoperíodo, ou seja, comprimento do dia leva a mudanças opostas na duração da produção noturna de melatonina. Desta forma, a duração da secreção de melatonina exprime a informação sobre o comprimento do dia aos organismos animais, a qual em muitas espécies serve para regular as variações sazonais na reprodução, no metabolismo e no comportamento (ARENDT, 1995).

Na sociedade atual há o uso indiscriminado da luz artificial, que de modo extensivo “protege” os seres humanos das mudanças sazonais no comprimento do dia. Entretanto, a glândula pineal humana ainda tem capacidade de responder a duração do fotoperíodo, embora o significado functional de tal mecanismo seja incerto (revisto por WEHR et al., 1995).

Indivíduos que vivem em altas latitudes do hemisfério norte exibem alongamento do pico noturno de melatonina durante as noites de inverno (LACOSTE e WETTERBERG, 1993). De forma semelhante, encurtamento artificial do fotoperíodo natural de verão (noites curtas) promove também alongamento do pico noturno de melatonina (VONDRASOVA et al., 1997 e 1999), já prolongamento artificial (noites longas) é seguido de alongamento do pico noturno de melatonina (WEHR, 1991).

b) Controle dos Ritmos Circadianos

A informação que a melatonina age como um sincronizador do ritmo circadiano endógeno em mamíferos se dá quase que exclusivamente por trabalhos fazendo ciclo

sono-atividade (actogramas) sob diferentes condições em roedores (ARMSTRONG, 1989). Evidência que a melatonina em humanos apresenta papel de regulador circadiano se dá por estudos com deslocamento de fase de ritmos circadianos (tais como: temperatura, secreção de melatonina e tempo de sono) após administração de melatonina (LEWY et al., 1992). Neste sentido, o deslocamento de fase depende do horário do dia em que foi administrada a melatonina, assim ocorre atraso de fase seguido da administração matutina e avanço de fase seguido à administração vespertina (LEWY et al., 1992). De posse deste conhecimento, a administração de melatonina tem sido usada com sucesso para facilitar o reajuste após deslocamento de fase agudo associado à “jet lag” e turno de trabalho (ARENDT et al., 1997). Contudo, existem apreciáveis controvérsias sobre os efeitos da melatonina neste caso, sendo muitas vezes implicado efeito não como regulador circadiano e sim como soporífico (indutor do sono).

c) Envolvimento em Desordens Psiquiátricas e Neurológicas

Existe considerável número de estudos que mostram níveis alterados de melatonina em muitas desordens psiquiátricas e neurológicas. Estudos em roedores sugerem que a glândula pineal pode influenciar as ações de diversas drogas, recreacionais como cocaína (UZ et al., 2003) e terapêuticas como o antidepressivo fluoxetina (UZ et al., 2004). Além disto, a melatonina é implicada em proteger contra neurodegeneração (REITER, 1998).

Alterações nos níveis de melatonina têm sido observadas em importantes doenças psiquiátricas, como depressão, estresse, ansiedade, anorexia nervosa e

esquizofrenia, assim serão brevemente discutidas a seguir.

A presença de baixos níveis noturnos de melatonina junto da depressão é bastante controverso na literatura, muitos estudos têm encontrado esta associação (revisto por BROWN, 1995). Todavia, outros estudos não encontraram esta associação (WALDHAUSER et al., 1993). A depressão sazonal comumemente observada em pacientes do Hemisfério Norte têm encontrado mais fortemente esta associação de baixos níveis noturnos de melatonina e aparecimento dos sintomas da depressão (PARTONEN, 1998). De modo oposto, tratamento da depressão não sazonal com inibidores da monoamina oxidase (MAO) aumenta os níves de melatonina por aumentar a atividade da enzima NAT (LEWIS et al., 1990), o que já foi observado em roedores quando tratados com inibidores seletivos da MAO-A (OXENKRUG et al. 1985), o que será apropriadamente debatido na seção de discussão desta tese.

Já tratamento dos sintomas da ansiedade com alprazolam (análogo da 1,4-benzodiazepina) abole a produção de melatonina, isto foi atribuído à ação sobre receptores para benzodiazepínicos presentes na pineal (LOWESTEIN et al., 1984; MCINTYRE et al., 1993). Contudo, os níveis de cortisol foram também suprimidos e, cortisol (como corticosterona) possui efeitos positivos sobre a produção pineal de melatonina, inclusive níveis elevados de melatonina são observados em mulheres com estresse induzido (BERGA e YEN, 1988) e após exercício físico (BERGIANNAKI et al., 1995).

Os níveis noturnos de melatonina junto da anorexia nervosa são também vairáveis, podendo estar elevados ou normais na dependência da perda relativa de peso e das deficiências nutricionais agudas (BROWN, 1996).

Os ritmos biológicos encontram-se patologicamente alterados na esquizofrenia,

incluindo o ritmo de melatonina, a hipótese levantada foi que isto pode estar relacionado à degeneração induzida pelo estresse crônico ao eixo HPA (FERRIER et al., 1982). Pacientes esquizofrênicos com ou sem tratamento medicamentoso apresentam robusto aumento do pico noturno de melatonina (MONTELEONE et al., 1997).

Alterações nos ritmos biológicos, inclusive o do ritmo de melatonina, têm sido observado em importantes doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, assim serão brevemente discutidas a seguir.

Existem algumas evidências do envolvimento da melatonina da pineal na progressão da demência senil, particularmente Alzheimer, e prováveis papéis terapêuticos da reposição de melatonina (revisto por PAPPOLLA et al., 2000). Os níveis de melatonina apresentam-se anormais em pacientes acometidos por Alzheimer quando se compara com idosos saudáveis, havendo diminuição da secreção total (LIU et al., 1999) e até aumento da variabilidade dos tempos de pico com presença de picos diurnos (OHASHI et al., 1999). A evidência mais forte para o tratamento com melatonina de pacientes acometidos por Alzheimer é a diminuição da formação de folhas β-paralelas e, consequentemente, da agregação de fibrilas amilóides *in vitro* (SKRIBANEK et al., 2001).

A participação da melatonina na síndrome de Parkinson foi recentemente implicada de forma mais convincente por ADI et al. (2010), eles mostraram por estudos *post-mortem* em seres humanos que tanto os receptores MT1 quanto MT2 encontram-se significativamente diminuídos na amígdala e na substância nigra, regiões reconhecidamente envolvidas nesta síndrome. Contudo, esta “down-expression” dos receptores para melatonina não é sabida de estar envolvida na patogênese ou ser

apenas uma conseqüência das alterações na comunicação neuronal.

d) Papel Antioxidante

A ação antioxidante da melatonina é a mais consistentemente descrita, tanto em processos inflamatórios agudos e crônicos (revisto por CUZZOCREA e REITER, 2001) como em doenças neurodegenerativas (revisto por REITER et al., 1998) até mesmo em seres unicelulares (HARDELAND et al.,1995 e 1996). Tem sido demonstrado que esta indolamina apresenta poder antioxidante maior que manitol (REITER et al., 1986), vitamina E (REITER et al., 1995) e, glutationa (REITER, 1998a e 1998b).

O papel antioxidante da melatonina se deve às características lipofílicas anteriormente apresentadas e a atividade sobre diversas enzimas intracelulares. Uma das atividades sobre enzimas mais importantes, é sobre a enzima quinona redutase, a qual promove a redução de glutationa dissulfeto para glutationa sulfidrila, esta reconhecidamente um importante antioxidante celular. Esta enzima foi categorizada como receptor para melatonina tipo 3, MT3. Portanto, os efeitos antioxidantes da melatonina poderiam ser desempenhados somente por este mecanismo. Contudo, existem outros mecanismos que explicam este efeito. Um deles seria a melatonina se ligar a calmodulina, proteína regulatória de diversos eventos intracelulares em vertebrados, e também, a proteínas nucleares como os receptores retinóides Z (RZRα e RZRβ) (STEINHILBER et al., 1995). Além disto, melatonina bem como seus metabólitos estimulam diversas outras enzimas antioxidantes, a saber: glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GRd), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutamilcisteína sintase (revisto por REITER et al., 2007). De forma complementar,

melatonina e seus metabólitos inibem a enzima (pró-oxidante) sintase de óxido nítrico (NOS) (revisto por REITER et al., 2007).

e) Papel sobre o Sistema Imune

A regulação do sistema imune pela melatonina é uma das áreas que mais cresce conforme destacado anteriormente.

A existência de uma comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imune, com a participação do sistema endócrino, particularmente a glândula adrenal, como será visto adiante (seção 2.3.1), permitiu a nós (MARKUS et al., 2007) e a outros (SKARWALO-SONTA et al., 2003) sugerir o conceito de Eixo Imune-Pineal.

2.2 Estresse

Em seu habitat, os animais estão amiúde expostos a situações potencialmente prejudiciais à sobrevivência, por exemplo, encontros com outros animais dominantes da mesma espécie, predadores e desastres naturais (queimadas, alagamentos, etc.). A capacidade de superar situações ameaçadoras é imperativa para sobrevivência do animal, e por último, para a continuidade da espécie. Esta capacidade somente existe por causa de uma elaborada comunicação bidirecional entre cérebro e corpo, a qual durante as adversidades à integridade da vida permite a adaptação imediata bem como tardia do organismo por mecanismos neuroendócrinos distintos. A adaptação imediata constitui uma reação de alarme, já a tardia constitui o estresse.

O estresse foi inicialmente denominado como Síndrome de Adaptação Geral, posteriormente, designado por este simplificado nome. É uma resposta com

mecanismos básicos bastante similares e conservados tanto em invertebrados como vertebrados, que ao final, acaba por produzir mais intensamente um importante hormônio (corticosterona/cortisol) responsável por uma série de funções fisiológicas sobre o metabolismo e o sistema imune, consequentemente, a inflamação.

Como anteriormente visto, a glândula adrenal é a glândula endócrina que apresenta maior número de artigos em consulta a base de dados PubMed (cerca de 280.000); conforme último levantamento feito em 14 de junho do corrente ano. Contudo, ao consultar estresse surgem aproximadamente 416.000 artigos, sendo que se referem a uma série de eventos não relacionados diretamente a esta resposta fisiológica com hiperprodução e secreção de glicocorticóides (corticosterona/cortisol) e de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Então, o termo estresse mesmo dentro da literatura especializada foi banalizado, há um infindável número de associações com o termo, tais como: estresse oxidativo, estresse glicêmico, estresse osmótico, estresse ortostático e tantos outros. Utilização do termo sem associação pela literatura médica também aparece, nestes casos, estresse é usado como sinônimo a: injúria, doença, cansaço prolongado e até mesmo preocupação; inclusive tal sinonímia consta em dicionários médicos. No sentido de elucidar, apresentar-se-á definição de estresse segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), que inclui o estresse como um agravo à saúde dentro do *Código Internacional de Doenças* (CID) (WHO, 2007). O estresse está inserido no CID (10ª edição) no capítulo V na grande categoria de Desordens mentais e comportamentais (F00-F99) dentro da categoria de Desordens neuróticas, relacionadas ao estresse e somatoformas (F40-F48), num último recorte têm-se Reações ao estresse severo e desordens de ajuste (F43), onde estresse agudo, pós-traumático e crônico com suas diferentes manifestações se encaixam, com

diversas sub-categorias de acordo com a severidade ou manifestação relatada, isto pode ser melhor visualizado na tabela a seguir (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Categorias e sub-categorias do estresse segundo CID-OMS.

Categorias (código)	Sub-Categorias (sub-códigos)
Reação ao estresse agudo (F43.0)	fraco (F43.00) moderado (F43.01) severo (F43.02)
Desordem por estresse pós-traumático (F43.1)	*Sem sub-categoria*
Desordens de ajuste (F43.2) devido a presença de mudança de vida ou evento estressante de vida	Reação depressiva breve (F43.20) Reação depressiva prolongada (F43.21) Reação mista de ansiedade e depressão (F43.22) Com distúrbio predominante de outras emoções (F43.23) Com distúrbio predominante de comportamento (F43.24) Com distúrbio misto de emoções e comportamento (F43.25) Com outros sintomas predominantes especificados (F43.28)
Outras reações ao estresse severo (F43.8)	*Sem sub-categoria*
Reação não-especificada ao estresse severo (F43.9)	*Sem sub-categoria*

Antes da definição de estresse pela OMS se faz necessário a compreensão desta categoria em que o mesmo está inserido, assim Reações ao estresse severo e desordens de ajuste (F43) é apresentado por diferenciar-se de outras reações que incluem desordens indentificáveis na base não somente dos sintomas e curso da doença, mas também da existência de um ou outro das seguintes influências: um evento da vida extremamente estressante produzindo uma reação de estresse aguda, ou uma mudança de vida relevante levando a circunstâncias continuamente desagradáveis que resultam numa desordem de ajuste. Desta forma, é necessário um dos dois causantes acima descritos para que o agravo seja incluso nesta categoria.

Agora, a definição de estresse pela OMS dentro do CID (10ª edição) pode ser apropriadamente apresentada. Estresse agudo (F43.0) é definido pela OMS como uma desordem transitória que se desenvolve num indivíduo sem qualquer outra desordem mental aparente em resposta a estresse físico e mental excepcionais, os quais usualmente terminam dentro de horas ou dias. Complementarmente, o estresse agudo recebe três sub-categorias relativas à magnitude do mesmo, assim sendo, classificam-o em: fraco (F43.00), moderado (F43.01) e, severo (F43.02). É salientado que, a vulnerabilidade individual e a capacidade de superação têm relevante papel na ocorrência e severidade das reações ao estresse agudo. Os sintomas são agrupados em dois grupos, os mentais e os físicos. É relatado que, os sintomas mentais aparecem tipicamente misturados e mudam a realidade, estes incluem um estado inicial de confusão com alguma compreensão consciente com redução de atenção, inabilidade de compreender estímulos e desorientação. Os sinais físicos relatados são sinais autonômicos de ansiedade do pânico, tais como: taquicardia, sudorese e vermelhidão. Além disto, os sintomas tanto mentais como físicos frequentemente duram horas, mas podem persistir por dois a três dias; em casos de persistência dos mesmos em tempo superior uma mudança no diagnóstico deve ser considerada. Mas, a compreensão de estresse dentro da fisiologia é consideravelmente diferente desta adotada pela medicina e será devidamente explanada nesta tese.

O termo estresse aparece também noutras áreas que não biomédicas, tais como: Economia (estresse econômico), Engenharia (estresse estrutural), Sociologia (estresse econômico, estresse cultural), Zootecnia (estresse produtivo, estresse de transição), Jornalismo (estresse político) e outras áreas. Isto dificulta sensivelmente um discurso objetivo sobre o assunto.

Entendemos que o estresse foi apenas uma ferramenta para acessar uma possível modulação hormonal sobre a glândula pineal, e assim, ampliar o entendimento do conceito de Eixo Imune-Pineal, mas de qualquer forma, será apresentado adiante uma Revisão de Literatura para o mesmo.

2.2.1 Breve Histórico e Definição do Estresse

A influência da mente sobre o estado de higidez dos indivíduos bem como sobre sua susceptibilidade e sua capacidade de recuperação a estados patológicos é conhecida de longa data (FELTEN, 2000). Na Antiguidade, essa interação corpo-mente foi bem evidenciada por Aristóteles (384-322 a.C.); ele ensinava que psique e corpo agiam complementarmente (ENCICLOPÉDIA..., 1986). Assim, alterações da psique eram promotoras de mudanças no corpo, e vice-versa. Já na era Cristã, Galeno (129-200 d.C.) observou que mulheres melancólicas eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores de mama que “mulheres de sangue quente” (DUNN, 1988). No século XX, Hans Hugo Bruno Selye (1907-1982), nominado cientificamente como Hans Selye, fez importante sistematização e definição destes conhecimentos permitindo que estes passassem do campo descritivo para o campo conceitual. A partir de experimentos realizados com ratos expostos agudamente a “agentes danosos” não específicos (frio, injúria cirúrgica, choque espinhal, exercício muscular excessivo, intoxicações com doses subletais de diversas drogas), Seyle (1936) observou que os mesmos ocasionavam uma reação orgânica geral e a definiu Síndrome de Adaptação Geral. Esta se caracterizava basicamente por aumento no peso das adrenais, atrofia tímica, esplênica e linfóide, além da presença de úlceras gástricas; tal denominação foi,

posteriormente, designada simplesmente como estresse (NEYLAN, 1998).

A partir do trabalho pioneiro de Selye (1936) a compreensão do estresse foi fundamentalmente melhorada, tendo surgido pelo menos dois conceitos básicos. Um primeiro conceito é o de que a resposta orgânica geral a estressores é adaptativa, ou seja, representa uma tentativa do organismo em adaptar-se a uma nova situação ambiental ou orgânica. O segundo conceito decorrente é o de que a resposta independe do estímulo, ou seja, é estereotipada.

Decorridos 74 anos do conceito de estresse formulado por Hans Selye, vê-se atualmente conforme já apontando um uso indiscriminado do termo estresse sem qualquer ligação como mecanismo fisiológico do organismo animal. Desta forma, surgiram mais modernamente diferentes definições no sentido de resgatar o conceito original de Selye. Uma definição importante de estresse é feito por Chrousos (1998), nela estresse é definido como “um estado do animal de homeostase ameaçada” (do inglês, “an animal’s state of threatened homeostasis”), completa ainda a definição ao afirmar que estressores são ameaças a homeostase e a contrapartida para restablecimento da homeostase são respostas adaptativas. De acordo com as definições de Seyle e Chrousos, um estímulo torna-se um estressor se, e somente se, ameaça a homeostase do animal, e portanto, o eixo HPA é ativado. Contudo, pistas ambientais de predador, como fezes e odores, podem também ativar o eixo HPA, e portanto, existe estresse quando a sobrevivência do indivíduo está ameaçada. Isto já sugere a discriminação de dois tipos de estresse. Vale salientar que, circunstâncias de perigo não tão evidentes, cujos sinais de advertência não estão claros, há o surgimento de ansiedade e não há necessariamente o desenvolvimento de estresse (FONSECA, 2005).

Outra confusão muito comum é a não distinção da resposta adaptativa imediata e tardia, enquandrando ambas como estresse. A adaptação imediata em que o organismo animal é prontamente defendido da ameaça constitui uma reação de alarme. Já na adaptação tardia, o organismo animal elabora um quadro de respostas secundárias, isto constitui o estresse. Estas adaptações possuem mecanismos neuroendócrinos diferentes. Estes dois mecanismos neuroendócrinos são: o sistema simpato-adrenomedular (SAS) e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (CHROUSOS, 1998; LAPIZ et al., 2000; MCEWEN, 2000). Cumpre salientar que, a ação desses dois componentes é amplamente integrada e hierarquizada.

Há necessidade de ficar claro o “método de escolha” do organismo em produzir uma reação de alarme ou produzir estresse, assim maiores explanações serão feitas adiante. Em encontros aversivos, animais mostram uma reação de alarme, a qual inclui respostas comportamentais imediatas e inespecíficas (por exemplo, susto) seguido de respostas comportamentais específicas (por exemplo, luta e fuga). Paralelamente, uma variedade de parâmetros fisiológicos é modificada, tais como: pressão sanguínea, freqüência cardíaca, os quais em conjunto com as respostas comportamentais preparam os animais para o controle bem sucedido da ameaça por uma estratégia de superação ativa. As reações de alarme estão primariamente ligadas ao SAS. Em contraste, quando situações ou encontros não podem ser controlados por luta ou fuga, animais mostram uma estratégia de superação dita passiva, a qual está fundamentalmente associada ao eixo HPA (CHROUSOS e GOLD, 1992; CHROUSOS, 1998; KOOLHASS et al., 1999). Dito isto, o eixo HPA (de outra forma) funcionaria como um mecanismo de controle da homeostase de longo prazo e, SAS seria uma resposta à sobrevivência com alteração temporária do padrão homeostático.

Vale apontar que, importantes pesquisadores acerca do estresse (KORTE et al., 2005) propõem uma visão darwiniana, ampla e complexa do estresse, em que a resposta adaptativa do organismo é altamente dependente da genética individual, existindo traços de ancestrais preservados (obviamente nos genes) estabelecendo uma distribuição dentro da população de indivíduos quanto à possiblidade de luta ou fuga (agressão) em dois grupos: (1) mais propensos à agressão - *Hawks* e, (2) outros menos propensos à agressão (*Dolves*). Na visão destes pesquisadores, estes dois tipos de personalidade (*Hawks e Dolves*) dariam uma linha de raciocínio para entender como alguns indivíduos produzem adaptação em maior ou menor intensidade ativando o eixo HPA, ou seja, produzindo estresse, já outros sob a mesma circunstância produziriam tão somente uma reação de alarme. Vão além, ao atribuir que esta divisão ajuda a entender os efeitos benéicos e deletérios produzidos pelo estresse no organismo animal.

De maneira geral, a resposta ao estresse apresenta como objetivos principais: coordenação e adaptação orgânicas a mudanças do meio interno (organismo) ou externo (ambiente) (MCEWEN, 1998). Desse modo, percebe-se, de forma até mesmo intuitiva, que a resposta ao estresse tem importante papel na sobrevivência dos animais. Assim, os mecanismos básicos de resposta ao estresse são muito similares e foram bem conservados na escala evolutiva, desde invertebrados a vertebrados superiores (OTTAVIANI et al., 1994).

Atualmente, é de amplo reconhecimento que o estresse promove uma resposta complexa coordenada centralmente, envolvendo alterações de funções autonômicas, endócrinas, comportamentais e cognitivas (DAYAS et al., 2001), além de imunológicas (BESEDOVSKY e DEL REY, 2000).

2.2.2 Tipos de Estresse

O estresse pode ser classificado em duas grandes categorias: (1) estresse físico ou “sistêmico” e, (2) estresse psicológico ou “processivo” (SAWCHENKO et al., 1996), os quais apresentam circuitárias diferentes (LI et al., 1996; HERMAN e CULLINAN, 1997; DAYAS et al., 2001), inclusive com perfis de ativação transcricional diferentes dentro do PVN (REYES et al., 2003). Todavia, alguns preferem categorizar simplesmente como estresse físico e estresse emocional (PIJLMAN e REE, 2002), o que recebe críticas por ser uma categorização antropomorfa ao atribuir sentimentos aos animais. Outra classificação sugere a classificação do estresse em ameaças reais e preditivas (HERMAN et al., 2003), o que não deixa de ser a primeira categorização apresentada com outra denominação. A categorização mais usada é a sugerida por Sawchenko et al. (1996).

A classificação do estresse em duas categorias (“sistêmicos” e “processivos”) não assumem que os estressores dentro da mesma categoria usem circuitárias idênticas de resposta (HERMAN e CULLINAN, 1997).

Os estresses físicos (ou sistêmicos) representam desafios verdadeiros a homeostase, eles são secundários a estímulos que alteram o estado fisiológico. Exemplos incluem: dor visceral (estimulação de nociceptores), dor somática (estimulação de nociceptores), inflamação (sinalização por mediadores químicos), hemorragia (estimulação de baroceptores), desidratação (estimulação de osmoceptores).

Os estresses processivos (ou psicológicos) são causados por estímulos que promovem ameaça imediata ou futura ao organismo, eles levam a uma ativação do eixo

HPA na ausência de qualquer desafio fisiológico. Exemplos incluem: ambiente aversivo (antecipação ou reconhecimento de predadores ou sinais de predadores), conflito social (disputa de hierarquia social).

Vale afirmar que, a ocorrência destes estressores no ambiente natural acaba por apresentar aspectos de ambas as categorias. Todavia, as condições laboratoriais proporcionam uma segregação bastante boa das mesmas.

Existe outra categorização do estresse que não exclui as duas categorias anteriormente apresentadas, e sim, as trata de modo indiferente. A primeira categorização proposta por Swachenko et al., (1996) leva em consideração a natureza do estressor, já a segunda a ser apresentada baseia-se na resposta do estressado.

Como visto, independente da definição, o estresse leva a respostas adaptativas frente a ameaças à homeostase ou à sobrevivência, as quais incluem inexoravelmente a ativação do eixo HPA, como resultado ocorre aumento da produção e secreção de corticosterona, responsável por orquestrar uma variedade de outras respostas adaptativas. Caso estas respostas adaptativas sejam suficientes em restabelecer a homeostase, o estado de homeostase perturbado (ou a resposta ao estresse) é chamada de euestresse (do inglês, *eustress*), onde o prefixo grego *eu* indica efeito benéfico ao animal (CHROUSOS e GOLD, 1992; CHROUSOS, 1998). Características importantes do euestresse não são somente uma ativação suficiente, mas também, uma finalização severamente controlada da resposta ao estresse após o cessamento de um estressor específico de modo a restabelecer a homeostase. De modo oposto, hipo ou hiperativação crônica do eixo HPA é compreendida como um estado de má adaptação, então o termo disestresse (do inglês, *disstress*) é usado, onde o prefixo grego *dis* indica prejuízo ao organismo animal (CHROUSOS e GOLD, 1992;

CHROUSOS, 1998).

A possbilidade do estressor em causar euestresse ou disestresse depende da qualidade e intensidade do mesmo bem como de fatores do indivíduo afetado, como genética, história de vida e estágio ontogenético. Estes fatores em conjunto determinam como o estressor é percebido e interpretado pelo indivíduo, o que é sensivelmente diferente nos animais experimentais.

Como visto, euestresse e disestresse são modos de resposta do organismo frente ao estresse, mesmo dependendo (em parte) do tipo de estresse, entender como classificação não é conveniente (DHABHAR e MCEWEN, 1997). Assim, o uso da categorização em estresses físicos (ou sistêmicos) e estresses psicológicos (ou processivos) é de uso corrente.

Nos estresses ditos “sistêmicos”, os neurônios catecolaminérgicos comprovadamente promovem a secreção pronunciada de substâncias do eixo HPA em casos de hemorragia, hipotensão e problemas respiratórios (PLOTSKY et al., 1989), além de nos casos de desafios imunes, como injeção de LPS (ELENKOV et al., 1992). Esses efeitos excitatórios das catecolaminas sobre o eixo HPA são mediados principalmente pelos adrenoceptores alfa presentes no PVN (PLOTSKY et al., 1989). Por outro lado, nos estresses ditos “processivos”, como contenção/imobilização, os estímulos são recebidos pelo eixo HPA por meio de fibras provenientes do sistema límbico; então, dependem de comparação com uma experiência prévia, ou seja, caracterização do estressor como ameaça ou não (HERMAN e CULLINAN, 1997). Salienta-se que, tanto estresse “sistêmico” como “processivo” são recebidos no PVN, o centro regulador do eixo HPA. Partindo do PVN, a resposta ao estresse é praticamente indistinta, isto é, varia somente a magnitude da resposta, que depende do

estressor. Portanto, pode-se afirmar que o cérebro classifica os diferentes tipos de estressores (DAYAS et al., 2001).

Um modelo de estresse de natureza psicológica que destaca-se pelo seu amplo uso na literatura é a contenção (DAYAS et al., 2001; SCHIMITZ et al., 2002; MADRIGAL et al., 2003). Neste modelo, os roedores (em grande parte, os ratos) são submetidos a uma restrição de locomoção e alguma movimentação corporal maior, como levantar e fazer grooming.. Muitas vezes, este modelo é amplamente usado como sinônimo de imobilização, esta última abordagem impossibilita o animal de quaisquer movimentações, apenas movimentos das vértebras cervicais, usando-se ataduras e/ou fitas adesivas ao redor do corpo. A neurocircuitária do estresse por contenção é bem caracterizada na literatura (CULLINAN et al., 1995; IMAKI et al., 1995; DAYAS et al., 2001; VIAU e SAWCHENKO, 2002). Este tipo de estresse é primariamente processado em regiões límbicas, incluindo hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (HERMAN et al., 2003).

Já um modelo de estresse de natureza física é o frio (ZOELLER et al., 1990; BAFFI e PALKOVITS, 2000). Neste modelo, os animais são expostos ao frio de diferentes maneiras, desde imersão em água gelada até manutenção em câmara fria ou em sala aclimatizada. A neurocircuitária do estresse pelo frio é também caracterizada na literatura (PACAK e PALKOVITS, 2001). Este tipo de estresse é reconhecido pelo cérebro pelas vias somáticas, viscerais ou circunventriculares que diretamente ativam centros hipotalâmicos (HERMAN et al., 2003).

Apesar de como apresentado anteriormente que, as aferências (“inputs”) de ambos os tipos de estresse (contenção e frio) são diferentes, vale lembrar que a eferência (“output”) é comum, o hormônio

corticosterona (HERMAN e CULLINAN, 1997).

2.2.3 Eixo HPA

O hormônio corticosterona é produzido pelas glândulas adrenais tanto de maneira rítmica (fisiológica) como em resposta a um estímulo injuriante (estresse) como veremos adiante.

Os componentes neuroanatômicos envolvidos na resposta ao estresse são fundamentalmente os do eixo HPA, já que como anteriormente visto, o SAS está substancialmente mais relacionado a reação de alarme (LAPIZ et al., 2000; MCEWEN, 2000). Como será visto adiante, a adrenal está envolvida nos dois componentes, pois a córtex da adrenal secreta glicocorticóides pela estimulação do eixo HPA e a medula da adrenal, que atua como um grande gânglio simpático, secreta adrenalina e noradrenalina por ativação do sistema nervoso simpático.

Em relação ao eixo HPA, esse é composto por três estruturas, a saber: (a) hipotálamo, (b) hipófise e (c) adrenal. O hipotálamo exerce sua ação na produção de corticosterona por meio de uma porção específica, o núcleo paraventricular (PVN), sobretudo a massa parvocelular, a qual contém neurônios secretores do fator liberador de corticotrofinas – CRF (do inglês, *corticotropin releasing factor*). Por sua vez, a estrutura hipofisária envolvida com a produção de corticosterona é a adenohipófise ou hipófise anterior; especificamente, as células basofílicas, que ao serem ativadas pelo CRF (ligação ao receptor CRF_1), secretam o hormônio adrenocorticotrópico – ACTH (do inglês, *adrenocorticotropic hormone*) para a circulação. Para revisão ampla sobre hipotálamo consultar Swanson (1987). A última estrutura componente do eixo HPA é a

glândula adrenal, particularmente o córtex e especificamente a zona fasciculada, que é a responsável pela produção dos glicocorticóides, após estimulação por ACTH (ligação ao receptor MC2R), sejam eles: corticosterona ou cortisol na depedência da espécie, como será devidamente apontado em tópico específico desta tese.

Explanação, mesmo que breve, do SAS é justificada. Em relação ao SAS, três estruturas participam da resposta ao estresse, são elas: (a) adrenal, (b) fibras simpáticas e (c) fibras parassimpáticas. A glândula adrenal, particularmente a medula, participa liberando principalmente as catecolaminas adrenalina e noradrenalina, além de encefalinas e peptídeos opióides. Já as fibras simpáticas são aquelas que inervam a medula da adrenal e a região periarteriolar da polpa branca do baço bem como aferências que se projetam diretamente em neurônios do PVN. Nesse sistema, a secreção de catecolaminas representa um “mecanismo de aviso” de injúria ou ameaça ao organismo e, por último, a secreção de corticosterona (ou cortisol) representa um mecanismo de adaptação à persistência da injúria ou ameaça. Cumpre relatar que, a existência dessas fibras no timo bem antes do desenvolvimento das funções imunes desse órgão, sugere um papel mais crítico do SAS no desenvolvimento tímico do que na sua relação com o estresse (FRIEDMAN e IRWIN, 1997). Já as fibras parassimpáticas, estas são fundamentalmente as fibras do nervo vago.

A corticosterona não resultante do estresse (estímulo exógeno) e sim de uma ativação endógena do eixo HPA é controlada pelos núcleos supraquiasmáticos – SCNs (do inglês, *suprachiasmatic nucleus*), ou seja, pelo relógio biológico central dos mamíferos (revisto por ANTLE e SILVER, 2005; SAPER, et al., 2005; KALSBEEK et al., 2006). Portanto, a corticosterona apresenta um ritmo de produção e liberação. Existem diferentes subpopulações neuronais nos SCNs, as quais se projetam para regiões

neuronais diferentes e produzem neurotransmissores específicos com acrofases próprias e distintas. Lembrando que ZT0 (do inglês, *zeitgeber time)* é definido como sendo o início da fase clara do ciclo de luz. Deste modo, ao menos quatro subdivisões dos SCNs são conhecidas em relação às suas diferentes acrofases. Uma primeira subpopulação com acrofase em ZT2, que produz vasopressina (VP) e ácido γ-aminobutírico (GABA), os quais inibem a produção de glicose hepática e corticosterona da adrenal. Já uma segunda subpopulação com acrofase em ZT6, produz GABA e inibe a produção diurna de melatonina. Uma terceira subpopulação com acrofase em ZT10, cujos neurotransmissores são desconhecidos, ativa o eixo HPA levando a produção de corticosterona antes do despertar em ratos. Uma quarta subpopulação com acrofase em ZT18 atua positivamente no sentido da glândula pineal promovendo o pico noturno de melatonina (revisto por KALBEEK et al., 2006). Grande parte dos feixes de projeção dos SCNs é para o núcleo paraventricular (PVN), sendo que o PVN se projeta para a porção intermédio lateral (IML) da medula, mesmo que por diferentes populações, não só alcançando o gânglio cervical superior, que se comunica com a glândula pineal (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003), mas também chegando ao córtex da adrenal (BUIJS et al., 1999), em última instância, os SCNs controlam a secreção de corticosterona também por uma via neural direta e, não somente pela via clássica neuroendócrina (sistema porta-hipofisário). O funcionamento da maquinaria celular dos SCNs (relógios biológicos, transcriptomas e enzimas) envolvido nesta ritmicidade da produção de corticosterona foi excepcionalmente revisado por Dickmeis (2009), como a abordagem molecular não foi objeto desta tese recomenda-se a leitura para informações pormenorizadas.

Sobre o controle da produção de corticosterona pela via neural direta, esta ocorre não somente pela projeção do PVN a IML como descrito anteriormente, mas também, por eferência direta dos SCNs sobre a zona subparaventricular ventral (vSPZ) e deste para núcleo dorsomedial (DMH), que juntamente aos estímulos provenientes do Núcleo Arqueado (ARC) atuam sobre o PVN medial modulando a liberação de CRF na hipófise, por sua vez, a de ACTH (SAPER et al., 2005).

Vale acrescentar que, a liberação de corticosterona de maneira rítmica depende ao menos de dois neurotransmissores; vasopressina que liberada no hipotálamo dorso-medial (DMH) inibe a atividade do eixo HPA durante a fração inicial da fase de claro, e outro transmissor, ainda desconhecido, que estimula a atividade do eixo a partir da metade da fase de claro até o inicio da fase de escuro (KALSBEEK e BUIJS, 2002). Os transmissores VIP, GRP e Neuromedina U foram testados como candidatos a neurotransmissor estimulatório da produção de corticosterona, porém nenhum deles foi confirmado (KALBEEK, 2006).

Após apresentação dos mecanismos de controle de ativação endógena (sem estímulo exógeno) do eixo HPA, restam os mecanismos de controle da ativação exógena (pelo estresse) do eixo HPA. Estes últimos são bem menos conhecidos do que os primeiros, mas uma maquinaria paralela é alvo de investigação. Neste sentido, o PVN destaca-se em receber “inputs” centrais e, a partir dele, ativar o eixo HPA de modo independente aos SCNs.

O PVN tem papel central em mediar respostas hipotalâmicas ao estresse, comportamento alimentar (tanto “de comer” como “de beber”), participando numa variedade de respostas autonômicas (SWANSON e MOGENSON, 1981; SAWCHENCKO et al., 1996; SAWCHENKO, 1998; ELMQUIST et al., 1999). O PVN

possui duas sub-populações celulares, a saber: magnocelular e parvocelular (ARMSTRONG et al., 1980; SWANSON e KUYPER, 1980). A sub-população magnocelular é responsável pela produção e liberação de oxitocina (OXT) (SAWCHENKO et al., 1996). Já a sub-população parvocelular é responsável pela produção e liberação de CRF de forma mais representativa, e também, de vasopressina – VP ou arginina-vasopressina - AVP (do inglês, *vasopressin* ou *arginina-vasopressin*) (SAWCHENKO et al., 1984). Na verdade, a porção parvocelular tem co-expressão de CRF e outros seis neuropeptídeos além da vasopressina, citando: encefalina, neurotensina, agiontensina II, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo histidina-isoleucina (PHI) e colecistoquinina (CCK) (SWANSON et al., 1983 e 1986).

Muitos estudos demonstram que diferentes tipos de estresses causam um aumento significativo dos níveis sanguíneos de OXT, mas não modificam os de VP (LANG et al. 1983; GIBBS, 1984; KASTING, 1988). Desta forma, têm-se sugerido que a OXT secretada dos neurônios magnocelulares do PVN é um hormônio do estresse, ao menos em ratos (JEZOVA et al., 1993), com irrelevância para a fisiologia do eixo HPA sem a presença do estresse sendo somente produzido nos estresses físicos (WOTJAK et al., 1996; WOTJAK et al., 1998; ENGELMANN et al., 1999) do que nos processivos (EIBL-EIBESFELDT, 1952).

Vale ressaltar que, a oxitocina (OXT) bem como a vasopressina (VP) proveniente do núcleo supraóptico (SON) desempenham quase exclusivamente funções gerais de organização da vida como equilíbrio hidro-eletrolítico na ausência de estresse, em machos (revisto por CUNNINGHAM e SAWCHENKO, 1991). Contudo, quando estresse se faz presente VP e OXT exercem efeitos duais sobre o eixo HPA, inibição da secreção de ACTH quando liberados nos dendritos e somata de neurônios do SON e

PVN e, opostamente, estimulação da secreção de ACTH quando liberados dos axônios e terminais axonais (revisto por ENGELMANN et al., 2004). Portanto, VP e OXT acabam por representar mecanismos adicionais de controle do eixo HPA, os quais variam conforme magnitude/intensidade do estresse além de duração do mesmo. Deste modo, em estresse agudo VP e OXT exercem controle inibitório adicional sob o eixo HPA de modo a retornar a homeostase, já em estresse crônico ou agudo severo estes acabam por exercerem um controle estimulatório sob o eixo HPA de modo a manter a produção de corticosterona, mesmo com efeitos de retroalimentação negativo do ACTH e da própria corticosterona.

Importante lembrar que, corticosterona é produzida pelas glândulas adrenais após estimulação por ACTH proveniente da adeno-hipófise, o qual foi por sua vez estimulada pelo CRF (classicamente) proveniente do hipotálamo (PVN). Portanto, conhecer quem controla a secreção de ACTH significa, em grande parte, entender como a corticosterona é controlada. O controle da secreção de ACTH é pesquisado desde a década de 50 do século passado (revisto por KLAVDIEVA, 1996). Inicialmente, foi implicado que o sistema neurohipofisário-hipotalâmico controlava a secreção de ACTH via liberação de VP dos neurônios magnocelulares (MCCANN e BROBECK, 1954; MARTINI e MONPURGO, 1955). Já na década de 70, ficou constatado que VP era também expressa em outros tipos celulares dentro do hipotálamo, destacando neurônios parvocelulares do PVN que secretavam VP diretamente no sistema porta-hipofisário ao nível da eminência média. Adicionalmente, ficou comprovado que neurônios parvocelulares do também sintetizavam CRF (VALE et al., 1981), o qual já se sabia há mais de 50 anos ser um potente ACTH-secratogogo (GUILLEMIN e ROSENBERG,1955; SAFFRAN et al., 1955). Atualmente, é aceito que VP e CRF agem

sinergicamente a estimular a produção de ACTH pelas células corticotrópicas da hipófise anterior (revisto por ANTONI, 1993).

A administração de CRF libera o hormônio adrenocorticotrópico – ACTH, além de angiotensina II, noradrenalina, adrenalina e, VP (VALE et al., 1981 e 1983). A liberação de vasopressina, após administração de CRF, foi posteriormente corroborada por diversos autores (BUGNON et al., 1983; TRAMU et al., 1983; SAWCHENKO et al., 1984; RAUX-DEWAY e GIRARD, 1985). Além disto, foi verificada aumento de vasopressina após adrenalectomia (WOLFSON et al. 1985), o que sugere uma alça de retroalimentação negativa por corticosterona.

Na dependência da natureza, intensidade, duração e frequência do estressor, o eixo HPA pode apresentar habituação, onde a secreção de ACTH encontra-se diminuída (GROVES e THOMPSON, 1970), ou ainda, sensibilização com secreção aumentada de ACTH (PITMAN et al., 1990). Os mecanismos neuronais envolvidos na plasticidade do eixo HPA não estão completamente compreendidos. Adicionalmente, ambos CRF e VP produzidos no PVN são co-liberados, quando sobre estresse, estimulando sinergicamente a produção e a liberação de ACTH da hipófise anterior ou adeno-hipófise (GILLIES et al., 1982; RIVIER et al., 1984; OWENS e NEMEROFF, 1991; ANTONI, 1993).

A manutenção de níveis adequados de resposta do eixo HPA durante estresse crônico é importante para a sobrevivência. O nível de resposta da hipófise corticotrópica-responsiva (células basofílicas) é determinado pela regulação diferencial de reguladores hipotalâmicos (CRF e VP) e sensibilidade à retroalimentação negativa por glicocorticóide (AGUILERA, 1994). Modelos de estresse crônico mostram aumento da taxa de secreção CRF:VP como fator mais importante na manutenção da

capacidade secretória da hipófise, visto que a sensibilidade à retroalimentação negativa por glicocorticóide está diminuída, somente as variações dos níveis de receptores para vasopressina estão em paralelo com a responsividade da hipófise ao ACTH, o que constitui importante mecanismo de adaptação ao estresse crônico (AGUILERA, 1994).

Desde meados da década de 90, tem-se encontrado em modelos de estresse crônico relativa consistência na mudança na relação CRF:VP, que pode ser explicado pelos níveis distintos de vasopressina mais intimamente relacionado com os níveis de ACTH do que com os de CRF, sugerindo um papel dinâmico da vasopressina na atividade do eixo HPA durante estresse. Em estudos com pacientes humanos com depressão, foi verificado aumento dos níveis de vasopressina nestes pacientes (SCOTT e DINAN, 1998). Em outro estudo com humanos, onde existia hiperatividade do eixo HPA, não foi encontrada associação entre níveis elevados de vasopressina e anorexia nervosa (CONNAN et al., 2007). A possível contribuição da vasopressina na hiperatividade deste eixo, em sinergia com CRF, é relativamente escassa na literatura.

Ratos adrenalectomizados, com reposição de corticosterona em água de bebida por cinco dias, foram submetidos ao estresse de contenção por trinta minutos, e foi verificado aumento dos níveis elevados de ACTH com aumento dos hnRNA tanto de CRF como de VP no PVN em comparação aos animais falso-operados. Sendo que não existia corticosterona circulante no momento do desafio (estresse por contenção), o impacto diferencial da reposição de corticosterona na expressão gênica do PVN pode refletir dependência diferencial desta expressão na presença prévia deste hormônio, podendo agir outros ACTH-secretagogos, como vasopressina (PACE et al., 2009).

Noutro estudo, ratos submetidos ao estresse crônico (modelo de contenção por 20 minutos durante 14 dias repetidos) foi associada com aumento da co-expressão de

CRF e VP na eminência média e, somente aumento de VP, mas não de CRH na hipófise. Pontua-se que neste estudo não foram encontradas diferenças dos níveis séricos de corticosterona (MERALI et al., 2009).

De forma semelhante aos estressores, as citocinas IL-1b e TNF aumentam a atividade do eixo HPA, e também, o “turnover” monoaminérgico em sítios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos. Após administração de TNF, foi observada co-expressão aumentada de CRF e VP na eminência média, com pico 7 a 14 dias após tratamento, a qual foi associada com sensibilização prévia à corticosterona (ANISMAN et al., 2003). Lembrar que a eminência média faz parte dos órgãos circunventriculares (OCV), assim o conteúdo químico nela produzido (ou nela chegado) pode alcançar à glândula pineal, que também faz parte dos OCV (DUVERNOY e RISOLD, 2007).

Estudo com modelo de estresse inflamatório ou nociceptivo (artrite reumatóide) verificou aumento da expressão de VP no hipotálamo quando da estabilização do processo inflamatório. Além disto, as concentrações plasmáticas de VP, ACTH, OXT e corticosterona encontravam-se aumentadas aos 15 e 22 dias pós-indução do processo. Estes resultados sugerem que as concentrações aumentadas de ACTH e corticosterona em ratos com estresse por inflamação foram induzidas por VP de origem hipotalâmica (SUZUKI et al., 2009).

Conforme extensivamente relatado a resposta ao estresse está centrada principalmente na atividade do eixo HPA. Adicionalmente, o funcionamento do eixo HPA está submetido ao controle de outras porções do cérebro, que não somente hipotálamo e hipófise, incluindo-se ainda hipocampo, amígdala (núcleos: central, medial e cortical) e, outros sítios límbicos.

Em especial ao hipocampo, sabe-se que é uma área de regulação importante no

processo de resposta, porém é afetado diretamente pelo estresse (HEUSER e LAMMERS, 2003). Essa porção neural possui altas densidades de receptores para glicocorticóides (GR), assim modulando a liberação desses hormônios por meio de efeitos inibitórios sobre o eixo HPA (HERMAN e CULLINAN, 1997). Além disso, o hipocampo está associado com diversos aspectos do aprendizado e da memória (MORGADO, 2005) bem como com aspectos cognitivos da resposta ao estresse (MCEWEN e SAPOLSKY, 1995). Dessa maneira, aumentos agudos dos níveis de glicocorticóides e também de catecolaminas facilitam a formação da memória relacionada a estímulos considerados emocionais (ROOZENDAAL, 2000). Corroborando, é reconhecido na literatura que a manutenção alta e prolongada de hormônios relacionados ao estresse, sobretudo glicocorticóides, promove prejuízo significativo das funções cognitivas (LUPIEN e MCEWEN, 1997).

De maneira semelhante ao hipocampo, a amígdala também possui altas densidades de GRs, porém está mais envolvida na regulação do medo e da ansiedade (KORTE, 2001). Além disso, a amígdala é conhecida por rápidas respostas comportamentais e cardiovasculares ao estresse (DAVIS, 1992).

Por último, o sistema límbico conecta amígdala e hipocampo com regiões hipotalâmicas e do tronco cerebral, assim controlando funções homeostáticas (HERMAN e CULLINAN, 1997).

De forma controversa, o envolvimento de outros componentes neuroanatômicos, tais como: *locus coeruleus* (noradrenérgico) e núcleos da *raphe* (serotoninérgico) bem como outros sistemas neurotransmissores, tais como: acetilcolinérgicos e glutamatérgicos, ainda não estão consensualmente implicados na resposta a qualquer tipo de estresse, ou seja, uns só estão aceitos como envolvidos

na resposta a tipos específicos de estresse (HERMAN e CULLINAN, 1997).

2.2.4 Síntese da Corticosterona

Os dois principais glicocorticóides endógenos são a corticosterona e o cortisol. A corticosterona é produzida pelos roedores em geral (ratos, camundongos, hamsters, coelhos, lebres, esquilos, capivara) e pelas aves (aparentemente toda a classe). Já o cortisol é produzido pelos canídeos (cães e familiares selvagens), felídeos (gatos e familiares selvagens), suídeos (suínos e familiares selvagens), eqüídeos (cavalos e familiares selvagens) e primatas, incluindo o ser humano (GREENSPAN e GARDNER, 2004). Pelo fato deste estudo apresentar como espécie experimental o rato, consequentemente, as quantificações feitas para avaliar o estresse partirem do mesmo, corticosterona foi a substância aqui usada, por tudo, o uso do termo corticosterona será preferencialmente usado.

Somente em 1946, as ações da corticosterona, ainda não isolada, são descritas na literatura como “salt active and sugar active adrenal steroids” (SELYE, 1946). No mesmo ano, Selye e Jensen sugeriram a adoção dos termos “mineralocorticoid and glucocorticoid”, respectivamente. Isto levou por anos, a atribuição de função dos mineralocorticóides única e exclusivamente no equilíbrio hidro-eletrolítico, e dos glicocorticóides sob o metabolismo de açúcares. Na verdade, ambos agem no equilíbrio hidro-eletrolítico e no metabolismo de açúcares, porém os mineralocorticóides mais intensamente no primeiro e os glicocorticóides no segundo.

A síntese da corticosterona ($C_{21}H_{30}O_4$) se inicia a partir do colesterol, proveniente em torno de 60 a 80 % da conversão do LDL (do inglês, *Low-Density Lipoprotein*), o mal

dito “colesterol ruim” (GREENSPAN e GARDNER, 2004). O colesterol é hidroxilado a 20αOH-colesterol pela enzima 20α-hidroxilase, a seguir, outra hidroxilação pela 22-hidroxilase produz 20,22-$(OH)_2$-colesterol, o qual é convertido a pregnenolona pela enzima 20,22-desmolase (DRAZNER, 1987). A conversão do colesterol a pregnenolona é a etapa limitante da biossíntese, sendo assim, dependente da ação do ACTH que promove a conversão acelerada (GOWER, 1979 apud DRAZNER, 1987[15]). A pregnenolona é convertida a progesterona pelas enzimas 3βol-dehidrogensae e Δ^{5-4} Isomerase, progesterona é hidroxilada a 17-OH-progesterona pela enzima 17α-hidroxilase, formando 11-deoxicortisol pela enzima 21-hidroxilase e, por fim, corticosterona pela ação da enzima 11β-hidroxilase (DRAZNER, 1987). Todas as reações ocorrem dentro do retículo endoplasmático liso, exceto a última que ocorre na mitocôndria.

Cumpre lembrar que, estados de hipocolesterolemia promovem diminuição geral na síntese de hormônios esteroidais, inclusive os glicocorticóides (GREENSPAN e GARDNER, 2004).

2.2.5 Farmacologia da Corticosterona

A seguir serão apresentados brevemente alguns apontamentos da farmacocinética e farmacodinâmica da corticosterona.

[15] GOWER, D.B. Steroid hormones. London: Croom Helm, 1979.

a) Farmacocinética da Corticosterona

A corticosterona é secretada e distribuída ao organismo animal em cerca de 90% ligado às proteínas plasmáticas, sendo 75% a uma proteína carreadora específica, a CBG (do inglês, *corticosteroid-binding globulin*) e o restante (15%) à albumina, sendo 10% na forma livre, ou seja, sem ligação às proteínas plasmáticas (GREENSPAN e GARDNER, 2004). Isto tem três implicações essenciais. Primeira, uma hipoproteinemia modifica a meia-vida plasmática da corticosterona, consequentemente, seus efeitos biológicos, o que poderia ser ampliado para situações de estresse. Segunda, reposição de albumina ou suplementação protéica não apresenta efeitos imediatos. Terceira, os níveis de CBG podem estar aumentados (estrógeno aumentado, hipertiroidismo, diabetes) ou diminuídos (hipotiroidismo, hipoproteinemia global, algumas inflamações), o que prejudica a resposta fisiológica à corticosterona nas concentrações rítmicas ou mesmo estressantes.

Mais de 80 % da corticosterona sofre biotransformação hepática, estas envolvem principalmente reduções (reações de fase I) e conjugações (reações de fase II) (GREENSPAN e GARDNER, 2004). A conjugação dos principais metabólitos das reações de fase I ainda pouco hidrofílicos, os tetrahidrocorticóides, se dá de duas formas, a saber: (1) conjugação com UDP-ácido glicurônico originando tetrahidrocortisolglicuronídeo, o que determina a excreção por via biliar e, (2) conjugação com sulfato originando tetrahidrocortisolsulfato, o que determina a excreção pela via renal (MÖSTL et al., 2005). Esta conjugação diferencial, e consequentemente excreção, ocorre em diferentes proporções de acordo com a espécie animal, assim os cães eliminam aproximadamente 77% dos metabólitos via

urina e 23% via fezes, já os gatos na proporção de 18:82, os eqüinos em 59:41, as ovelhas em 72:28, os coelhos em 92:08, os suínos na proporção de 93:07 (PALME et al., 1996; TESKEY-GERSTL et al., 2000; SCHATZ e PALME, 2001), sendo a proporção de eliminação para os seres humanos bem próxima dos suínos (GREENSPAN e GARDNER, 2004).

Vale salientar que, hipertiroidismo aumenta tanto a biotransformação como a excreção de forma geral, e assim dos glicocorticóides também, sendo que o hipotiroidismo apresenta efeitos opostos (GREENSPAN e GARDNER, 2004).

b) Farmacodinâmica da Corticosterona

Existem dois tipos de receptores para os hormônios esteroidais produzidos pelas adrenais (corticosteróides), os Receptores para Mineralocorticóides (MRs) e os Receptores para Glicocorticóides (GRs). Opostamente à terminologia, os glicocorticóides ligam-se a ambos os tipos de receptores e não exclusivamente aos GRs como sugerido. Os MRs estão localizados em estruturas límbicas e, eles apresentam afinidade à corticosterona cerca de dez vezes maior (K_D≈0,5 nM) que os GRs (K_D≈5,0 nM), porém a distribuição destes últimos é ubíqua no organismo animal (DE KLOET et al., 1998). Por isto, as funções dos mesmos são diferentes, assim a função dos MRs é chamada de “feedback proativo” já que exerce efeitos em concentrações basais de corticosterona, enquanto a dos GRs é chamada de “feedback reativo” pelo fato de exercer seus efeitos somente quando excesso de corticosterona existe, como nos casos de estresse (DE KLOET et al., 1998).

Inicialmente, dois subtipos de receptores (α e β) foram identificados para cada

um dos receptores. Atualmente, são reconhecidos três subtipos para os GRs, a saber: GR-α, GR-β e GR-P, sendo que somente GR-α liga-se aos glicocorticóides (REVOLLO e CIDLOWSKI, 2009). Os GRs são receptores citosólicos (não-membrana) constituídos por um complexo protéico principal, o receptor propriamente dito (GR) associado comumente a três outros complexos protéicos, a saber: proteínas de choque térmico (do inglês, *heat shock proteins* – HSP) 70 e 90, além de imunofilina (HARDMAN et al., 2001).

Existem duas formas de ação dos GRs, a saber: (1) por mecanismos genômicos e, (2) por mecanismos de interação proteína-proteína; sendo que o primeiro mecanismo pode funcionar de duas maneiras, (1a) por ativação ou (1b) por repressão transcricionais, também chamadas de transativação e transrepressão, respectivamente (VAN DER LAAN e MEIJER, 2008).

O mecanismo clássico de ação da corticosterona (e dos glicocorticóides) é a transativação. Esta pode ser descrita passo-a-passo da seguinte maneira: (1) diante das células-alvo, corticosterona é dissociada da proteína carreadora CBG (maior fração) entrando na célula como cortisona (forma inativa); (2) dentro da célula, cortisona sofre ação da enzima 11βHSD2 (do inglês, *11β-hydroxysteroid dehydrogenase 2*), presente em certos tipos celulares como células epiteliais do túbulo renal, que impede sua ação sobre MRs; (3) cortisona é convertida a cortisol (forma ativa) pela enzima 11βHSD1 (do inglês, *11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1*), assim podendo agir sobre GR; (4) após cortisol liga-se ao GR localizado no citoplasma, então é formado um complexo glicorticóide-receptor; (5) este complexo transloca-se ao núcleo, onde se liga a elementos responsivos aos glicorticóides – GRE (do inglês, *glucocorticoid response elements*) na região promotora de genes-alvos (variáveis

conforme o tipo celular), o que resulta na regulação da expressão gênica (ODERMATT e GUMY, 2008). Exemplos deste mecanismo de ação incluem: (1) formação de Iκ-B, o qual é responsável pela ativação da cascata de sinalização do NF-κB; (2) formação de MKP-1, o qual bloqueia a ativação (dentre outros) de p38, o que resulta na menor tradução de citocinas pró-inflamatórias (revisto por SMOAK e CIDLOWSKI, 2004).

Outro mecanismo de ação da corticosterona, também dos outros glicocorticóides, é a transrepressão, mecanismo oposto à transativação. Neste mecanismo, o glicocorticóide também forma um complexo com o receptor, porém este não se liga aos GRE e sim a outros fatores de transcrição inibindo-os de realizar a transcrição (revisto por NEWTON e HOLDEN, 2007). Exemplos deste mecanismo de ação incluem: (1) interação com o fator de trancrição AP-1, o qual é responsável pela formação de colagenase, IL-2 e COX; (2) interação com o fator de trancrição NF-KB, o qual é responsável pela formação da citocina IL-1 e da enzima PLA2 (revisto por SMOAK e CIDLOWSKI, 2004).

Os exemplos anteriormente demonstrados deixam claro que os glicocorticóides agem tanto por transativação como por transrepressão, o que acaba por modularem genes-alvos e não-alvos relacionados ao sistema imune e outros sistemas. Portanto, isto é um mecanismo pleoitrópico indesejável por resultar em efeitos não exclusivos ao sistema imune, mas também, sobre as funções metabólicas e até mesmo pulmonares. Deste modo, glicocorticóides sintéticos capazes de reprimir apenas genes do sistema imune são extensivamente investigados. Neste sentido, foi demonstrado em camundongos geneticamente modificados com GR incapaz de ligar-se ao DNA ($GR^{dim/dim}$) que estes ainda eram responsivos (me menor grau) aos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides, enquanto a atelectasia observada em *knockouts*

($GR^{-}/^{-}$) não ocorria, assim demonstrando que os efeitos genômicos não são fundamentais para a sobrevivência (REICHARDT et al., 1998).

O mecanismo dos glicocorticóides, tal como a corticosterona, por meio da interação proteína-proteína foi somente recentemente demonstrado (CROXTALL et al, 2002). Este mecanismo é o responsável por uma série de efeitos rápidos dos glicocorticóides, pois é independente da regulação da transcrição gênica. Um exemplo deste mecanismo é a inibição rápida, por certos glicocorticóides, da produção da prostaglandina PGE2, que é revertido pelo antagonista mifepristone e não é afetado por inibidores de síntese protéica, assim mecanismos genômicos são descartados (REVOLLO e CIDLOWSKI, 2009).

2.2.6 Papeis Biológicos da Corticosterona

A corticosterona apresenta inúmeros efeitos sob a fisiologia dos mamíferos, os quais podem ser agrupados em três grandes categorias, a saber: sobre o desenvolvimento, sobre o metabolismo e sobre o sistema imune.

Os efeitos sobre o metabolismo são os mais remotamente estudados e correspondem a grande parte dos artigos especializados, já sobre o desenvolvimento o número é pouco mais que dez por cento dos artigos sobre corticosterona, enquanto, os efeitos da corticosterona sobre o sistema imune alberga o menor número de estudos com crescimento pronunciado nas duas últimas décadas, por ter relação com a presente tese, esta última categoria de efeitos da corticosterona recebeu especial interesse no desenvolvimento e na confecção desta tese.

A seguir serão apresentados brevemente alguns papéis biológicos da

corticosterona relacionados ao contexto da presente tese.

a) Sobre o Metabolismo

Pelo fato dos receptores do tipo GR estarem ubiquamente distribuídos, a corticosterona age em praticamente todos os órgãos do organismo animal.

Efeitos da corticosterona sobre o cérebro incluem: alterações de humor, cognição, padrões de sono e percepção sensorial. Sobre ossos, citam-se diminuição da atividade dos osteoblastos e aumento da atividade dos osteoclastos, portanto, perda de massa óssea. Sobre a pele, diminuição da deposição de colágeno, podendo resultar em flacidez e alopecia. Sobre o trato grastintestinal, diminuição da absorção intestinal de cálcio, antagonizando os efeitos da vitamina D, o que pode levar a calciúria e hiperparatiroidismo secundário. Sobre o equlíbrio hidro-eletrolítico, a corticosterona apresenta efeito mineralocorticóide maior do que os glicocorticóides sintéticos, estes são retenção de sódio e perda de potássio. Como visto a corticosterona age sobre o cérebro, os ossos, a pele, o trato grastintestinal e os rins (revisto por NUSSEY e WHITEHEAD, 2001). Além disto, a corticosterona age sobre o metabolismo de açúcares, proteínas e lipídios conforme será apresentado adiante (GREENSPAN e GARDNER, 2004).

Sobre o metabolismo dos açúcares, a corticosterona promove a formação de glicose a partir de aminoácidos (gliconeogênese). Sobre o metabolismo das proteínas, a corticosterona possui dois efeitos, em doses fisiológicas apresenta efeito catabólico, já em doses farmacológicas possui efeito catabólico. Sobre o metabolismo dos lipídeos, os efeitos são também duais, agudamente promovem lipólise e, cronicamente

promovem redistribuição da gordura.

b) Sobre o Sistema Imune

Antecipadamente à descrição dos efeitos dos glicocorticóides sobre o sistema imune, não se pode esquecer que esta comunicação é bidirecional (WRONA, 2006) e, que obviamente, o próprio sistema imune se auto-regula (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). Sobre os efeitos dos glicocorticóides sobre o sistema imune, vale o apontamento de Barnes (2006) que afirma a regulação da imunidade também é uma questão de integração da resposta aos glicocorticóides dentro de uma diversidade enorme de fatores regulatórios, incluindo múltiplos mediadores e células.

Nos tempos atuais, é amplamente reconhecido que diversos estímulos provenientes do SNC, incluindo estresse, são capazes de modular uma resposta imune (STERNENBERG, 1997; WEBSTER et al., 2002), com participação relevante do sistema endócrino (ROWAT, 1998). Neste sentido, o sistema endócrino, em especial o eixo HPA, é um dos principais responsáveis por vários elos de ligação entre os sistemas imune e nervoso (LICINIO e FROST, 2000). Somado a isso, sistema nervoso autônomo (BLALOCK, 1989) e também medicamentos de ação central, como benzodiazepínicos (MASSOCO e PALERMO-NETO, 2003) e haloperidol (LOURENÇO et al., 2005) interferem com a resposta imune.

De modo inoportuno, a resposta ao estresse pode ser exacerbada, sobretudo pela hipersecreção de glicocorticóides (HERMAN e CULLINAN, 1997), o que representa considerável ameaça à manutenção da homeostase. Nesse sentido, a regulação inapropriada da resposta ao estresse foi implicada na patogênese de diversos agravos

à saúde humana, como asma e hipertensão (MCEWEN e STELLAR, 1993), depressão e outras desordens psicológicas (TAGAY et al., 2005) e, até mesmo com a doença de Alzheimer (LANDFIELD et al., 1991). Diversas constatações similares, descritas em anos anteriores, levaram os pesquisadores Dinarello e Savage (1989) a denominarem a causa de certas doenças como de etiologia neuroimunológica.

A literatura científica aponta forte relação do estresse com alterações do sistema imune, muitas das quais prejudiciais, já outras poucas benéficas. É preciso diferenciar claramente os efeitos dos glicocorticóides exógenos administrados ao organismo daqueles provenientes dos glicocorticóides endógenos produzidos pelo organismo. De forma ampla, o estresse está erroneamente (ou simplificadamente) relacionado à imunossupressão. Todavia, a imunossupressão só é uma verdade nos casos de estresse crônico ou agudo de alta severidade em que os mecanismos adaptativos são cessados e uma má-adaptação fisiológica ocorre; de modo oposto, o estresse agudo quando de baixa severidade promove imunoestimulação (DHABHAR e MCEWEN, 1997). Além disto, as respostas em quaisquer dos sentidos depende fundamentalmente do parâmetro avaliado do sistema imune, o que em grande parte dos artigos é restrita não permitindo uma conclusão forte em nenhum sentido. Lembrar que, imunossupressão predispõe o organismo a infecções, mas diminui as chances de desenvolvimento de doenças auto-imunes (ou ameniza quando já presentes); diferentemente, imunoestimulação previne o desenvolvimento de infecções, porém aumenta as chances de doenças auto-imunes se desenvolverem (ou agrava quando já presentes).

Existem diferenças, recentemente, apontadas entre a resposta ao estresse crônico pela periferia e o sistema nervoso central. Neste sentido, o estresse crônico por

apresentar concentrações persistentemente elevadas de corticosterona acaba por desempenhar uma ação anti-inflamatória massiva na periferia, porém a corticosterona agindo centralmente libera glutamato (excitotoxicidade), o qual, dentre outras ações, promove aumento da ativação da enzima TACE (do inglês, tumour necrosis factor converting enzyme), assim TNF é formado, este acaba por ativar a via de sinalização do NF-KB, como conseqüente, ativação de COX-2 e iNOS, o que promove formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que uma vez acumuladas levam à alteração da funcionalidade da barreria hematoencefálica e, portanto, permitindo danos centrais oriundos da periferia (revisto por MUNHOZ et al., 2008; SORRELS et al., 2009).

Estudos conduzidos a respeito dos efeitos do estresse na hipersensibilidade tardia demonstraram que um estresse agudo aumenta a resposta de hipersensibilidade (DHABHAR et al., 2000). De forma adversa, a aplicação de um estresse crônico, por 3 a 5 semanas, promoveu supressão da resposta de hipersensibilidade (DHABHAR e MCEWEN, 1999).

Ressalta-se que a controvérsia encontrada na literatura acerca do tema está implicada principalmente pelos diferentes tipos de estresse (físico ou psicológico, ou ainda ambos) e duração do estresse (agudo ou crônico), além da importância do tipo de resposta imune avaliada. Dessa forma, Herman e Cullinan (1997) salientam que fatores relacionados ao estresse, como: severidade, duração e tipo, além da resposta comportamental dos animais ao estressor são fatores determinantes na magnitude e na qualidade das mudanças celulares avaliadas. Entretanto, Palermo-Neto et al. (2003) observaram uma maior contribuição do conflito cognitivo promovido pelo estresse do que o tipo de estresse (físico ou psicológico), visto que observaram em ratos expostos a

um estresse físico inescapável, choque nas patas, apresentava os mesmos efeitos imunossupressores que um estresse psicológico (testemunhar outro animal ser exposto ao choque). Diferentemente, ratos expostos a um estresse físico escapável, choque nas patas, não apresentavam nenhuma alteração comportamental e nem imune inata (atividade de macrófagos peritoneais). Portanto, aquele estudo (PALERMO-NETO et al., 2003) reforça o pensamento de que a habilidade em controlar ou escapar da situação estressante é um fator crítico tanto para respostas comportamentais como imunes ao estresse, o que é também abordado em Korte et al. (2005).

Primeiramente, mudanças prejudiciais imunes dos animais ou dos humanos quando submetidos ao estresse foram implicadas às ações dos glicocorticóides. De forma concordante, altas doses de glicocorticóides possuem efeito imunossupressor (FELSZEGHY et al., 1996). Todavia, importante estudo conduzido por Kass et al. (1991) mostraram que corticosterona exógena tinha papel significativo na recuperação de infecções experimentais em animais adrenalectomizados. Anteriormente, Keller et al. (1983) observaram que a imunossupressão em resposta ao estresse era fato em animais tanto intactos como adrenalectomizados. Assim, a participação de outros fatores, além da ativação do eixo HPA, foi confirmada no tocante à alteração imune. Posteriormente, verificou-se que a supressão da proliferação de linfócitos em resposta ao estresse é independente da liberação de hormônios hipofisários e estaria relacionada aos sistemas catecolaminérgicos centrais bem como periféricos (KELLER et al., 1988). Nesta mesma direção, Friedman e Irwin (1997) afirmaram que o sistema nervoso autônomo simpático participaria de forma relevante na resposta ao estresse e também na modulação da atividade imune.

Um mecanismo de modulação do sistema imune, por corticosterona, ocorreria

por meio de efeitos sobre o balanço Th1/Th2 (BLOTTA et al., 1997; DeKRUYFF et al., 1998). Para melhor compreensão dessa afirmação serão a seguir recordados rapidamente alguns conceitos sobre o sistema imune. Primeiro, as respostas imunes são reguladas por células apresentadoras de antígenos (monócitos/macrófagos, células dendríticas e outros fagócitos) as quais são componentes da resposta dita inata e, também por linfócitos das subclasses Th1 e Th2, esses compõem a resposta dita adquirida. Basicamente, a diferença dessas duas subpopulações de linfócitos é o perfil de citocinas que liberam (ELENKOV et al., 2004).

A subpopulação de linfócitos Th1 é secretora de certas citocinas, como IL-12, IFN-γ e TNF; essas citocinas atuam como promotores da atividade imune celular. Já a subpopulação de linfócitos Th2 libera, entre outras citocinas, IL-4, 9, 10 e 13, que por sua vez, estimulam a atividade imunidade humoral (LEDERER et al., 1996; MOSMANN e SAD, 1996). Pontua-se que as principais citocinas influenciadoras da diferenciação dos linfócitos para padrão Th1 ou Th2 são IL-12 e TNF, produtos de células do sistema imune inato; tanto IL-12 como TNF estimulam a diferenciação para padrão Th1, o que resulta em incremento da resposta imune celular (TRINCHIERI e SCOTT, 1995).

Cumpre salientar, respostas Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias. Por exemplo, a secreção de IL-12 e IFN-γ promove inibição de respostas do tipo Th2, já IL-4 e IL-10 inibem respostas Th1. Esse fenômeno de equilíbrio Th1/Th2 foi denominado como efeito de “prato de balança” (LEDERER et al., 1996; MOSMANN e SAD, 1996).

Pensando no efeito “prato de balança”, o estresse via secreção de glicocorticóide atuaria favorecendo principalmente respostas do tipo Th2 (IWAKABE et al., 1998). Pois, a corticosterona atua sobre monócitos, macrófagos e células dendríticas, inibindo a

produção de IL-12, TNF e IFN-γ, conseqüentemente, a diferenciação dos linfócitos em Th1. Assim, citocinas Th1 cessariam a inibição daquelas citocinas importantes para resposta Th2, ou seja, o ”prato da balança” penderia para a diferenciação dos linfócitos em Th2 (BLOTTA et al., 1997; DEKRUYFF et al., 1998). Com isso, ocorre diminuição da resposta imune celular e aumento concomitante da resposta imune humoral, o que permitiria compreender o aumento induzido por estresse da susceptibilidade às alergias e às doenças auto-imunes mediadas por anticorpos (ELENKOV et al., 2004).

Em relação ao incremento da resposta imune humoral em aumentar a susceptibilidade às alergias (ELENKOV et al., 2004), diversos trabalhos relataram que esse desequilíbrio Th1 para Th2 foi capaz de tornar indivíduos (experimentais) mais susceptíveis a determinados tipos de alergias (BASSO et al., 2001 e 2003; COSTA-PINTO et al., 2005).

Em relação ao incremento da resposta imune humoral promovido pelo estresse no sentido de aumentar a susceptibilidade às doenças auto-imunes (ELENKOV et al., 2004), já havia há tempos demonstrada por trabalho pioneiro de Solomon e Amkraut (1981), que correlacionaram a história de vida e a personalidade de pacientes com artrite reumatóide com o risco dessa doença auto-imune para parentes dos mesmos; os resultados, sinteticamente, foram que diversos familiares dos pacientes eram positivos para o fator reumatóide, porém sem desenvolvimento da doença àqueles com baixa pontuação de ansiedade, depressão, ou alienação.

Nesse momento, pelas diversas observações sobre estresse e sistema imune pode-se concluir com segurança que aumento ou diminuição da resposta imune depende fundamentalmente do parâmetro analisado. Neste sentido, na avaliação da resposta imune humoral (mediada por anticorpos), a exposição ao estresse tende a

aumentar esta resposta, pelo desequilíbrio no sentido da resposta do tipo Th2 (ELENKOV et al., 2004). Em adição, na avaliação da resposta imune celular, o estresse tende a diminuir esta resposta, novamente pelo desequilíbrio no sentido da resposta do tipo Th2 (ELENKOV et al., 2004). Portanto, o estresse altera a imunocompetência, pois o equilíbrio de respostas Th1/Th2 é altamente necessário para uma resposta imune adequada (KIDD, 2003).

A inibição da transcrição de inúmeras citocinas pelos glicocorticóides, como interleucinas: 1, 5, 6, 8 e 13; TNF e fator estimulante de colônia (GM-CSF), é bem reconhecida pela literatura científica (GUYRE et al., 1988). Contudo, glicocorticóides interferem por meio de outros mecanismos além do dito anteriormente, a saber: diminuição de receptores para IL-4 (SO et al., 2002), diminuição da migração/quimiotaxia de eosinófilos (SUGIMOTO et al., 2003) e de neutrófilos (VAN OVERVELD et al., 2003), aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e IL-6 (ZHOU et al., 1993), aumento dos níveis séricos de IL-6 e IFN-γ (CAO e LAWRENCE, 2002). Além disso, diversas substâncias produzidas pelo sistema nervoso, como neuropeptídeos, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), endorfinas, encefalinas, tireotrofina, prolactina, hormônio do crescimento e tantas outras também têm atividade sobre o sistema imune (BLALOCK, 1989; MADDEN e FELTEN, 1995).

As respostas do sistema imune à reação de alarme, via sistema nervoso autônomo simpático, também foram bem demonstradas por Sigola e Zinyama (2000). Neste importante trabalho, eles mostraram que a adrenalina inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Outro importante estudo revelou que a incubação de macrófagos peritoneais com noradrenalina aumentou a fagocitose destas células (ORTEGA et al., 2000). Estudo *in vivo* conduzido por Sanders

(1998) mostrou que a liberação de noradrenalina ou adrenalina por axônios ativava a proliferação e até mesmo a produção de citocinas por células T. Interessante observação do mesmo autor foi a de que, células T *helper* 1 que induzem imunidade do tipo Th1 expressam adrenoceptores beta-2; já células T *helper* 2 induzem preferencialmente imunidade do tipo Th2 não expressam receptores adrenoceptores beta-2. Além disso, adrenalina, noradrenalina e dexametasona inibem a produção de IL-12 e aumentam a produção de IL-10 por macrófagos (ELENKOV et al., 1996).

Atualmente, forte relevância tem sido fornecida também aos estudos que correlacionam estresse e crescimento tumoral. A relação entre estresse psicológico (social) e tumor foi bem demonstrada por Strange et al. (2000); eles mostraram que camundongos machos quando submetidos a estresse social e inoculados com um tumor andrógeno responsivo (AR SC115) apresentavam menor sobrevida. Em outro importante trabalho, Palermo-Neto et al. (2001) observaram, entre outras coisas, que estresse pré-natal determinava aumento do crescimento do Tumor de Ehrlich tanto na forma sólida como ascítica. Adicionalmente, Palermo-Neto et al. (2003) relataram alterações comportamentais e imunológicas produzidas por estresse tanto físico como psicológico em camundongos adultos.

É altamente relevante destacar que a relação entre sistema nervoso e sistema imune (sistema neuroimune) é bidirecional, ou seja, o sistema imune pode alterar o funcionamento do sistema nervoso, o que já foi amplamente revisto (HOPKINS e ROTHWELL, 1995; ROTHWELL e HOPKINS, 1995; BESEDOVSKY e DEL REY, 1996; CONNOR et al., 1998; MULLER e ACKENHEIL, 1998). Nesse sentido, vale lembrar a importante observação feita por Blalock (1984, 1994, 2005) de que o sistema imunológico funcionaria como um sistema sensorial complementar, amplo/difuso e

dinâmico, e em constante adaptação que capacitaria o SNC a receber estímulos e mensagens que seriam, de outro modo, imperceptíveis, pelas vias sensoriais clássicas. Entretanto, não existe um amplo consenso na literatura sobre as vias pelas quais o sistema imune sinalizaria para o sistema nervoso (DUNN, 2002).

Em relação às vias sinalizadoras do sistema imune para o sistema nervoso, Dunn (2002), em revisão, aponta três mecanismos principais de ação dos mediadores do sistema imune: (1º) ação direta em locais de barreira hematoencefálica permeável, como nos órgãos circunventriculares (endotélio fenestrado ao invés de contínuo); (2º) ação indireta por meio das aferências periféricas do sistema nervoso (sobretudo nas terminações do nervo vago); (3º) ação direta em locais de interface entre sistema imune e nervoso, sem necessidade da transferência direta do mediador para dentro do último (por exemplo, ligação de citocinas a receptores endoteliais na microvasculatura cerebral gerando mensageiros lipídicos, como prostanóides). O mecanismo, amplamente, aceito na literatura é a ação indireta dos mediadores do sistema imune via estimulação de terminações vagais, que levam a respostas comportamentais (BRET-DIBAT et al., 1995) e até mesmo à febre (WATKINS et al., 1995). Outros estudos realizando vagotomia subdiafragmática (não-hepática) mostraram a eficácia da mesma na prevenção da redução dos níveis noradrenalina hipotalâmica e na ativação do eixo HPA (FLESHNER et al., 1995).

Consensualmente, os efeitos gerais da corticosterona são anti-inflamatórios por mecanismos genômicos e não-genômicos, conforme explicado anteriormente. Merecem especial atenção também os efeitos da corticosterona sobre os diferentes componentes do processo inflamatório, assim os efeitos sobre as células serão apontados a seguir (revisto por KACSOH, 2000). Nesta oportunidade serão aqui também retratados os

efeitos da corticosterona sobre os eritrócitos e as plaquetas, os quais não são considerados classicamente como células do sistema imune.

Sobre os eritrócitos, a corticosterona promove aumento dos níveis de hemoglobina e das hemácias circulantes (policitemia). Sobre os neutrófilos, promove aumento na circulação sangüínea. De forma oposta, promove diminuição dos eosinófilos circulantes. Já sobre os basófilos e mastócitos, os efeitos da corticosterona *in vivo* são ausentes. Sobre os monócitos, a corticosterona promove tanto diminuição do número como na diferenciação dos mesmos a macrófagos, assim diminui a apresentação de antígeno e a produção das interleucinas 1 e 6 bem como TNF, portanto, diminui a montagem da resposta inflamatória. Diretamente sobre os macrófagos já formados, a corticosterona diminui a expressão dos receptors Fc, o que diminui a fagocitose de células já opsonizadas. Sobre os linfócitos, a corticosterona diminui o número destas células circulantes de forma mais proeminente em células do tipo B do que T, assim diminuía reposta imune humoral. Sobre as plaquetas, há diminuição da agregação plaquetária. Cumpre salientar que, a atrofia tímica relacionado ao desenvolvimento animal está sob influência da corticosterona, podendo ser acelerada em animais em desenvolvimento sob tratamento com glicocorticóides exógenos (KACSOH, 2000).

Em virtude de todas as observações anteriores, o estresse como modalidade de alteração do estado psicológico considerado normal constitui uma importante ferramenta para a avaliação das interações corpo-mente bem como das possíveis interações dos componentes neurais entre si.

2.3 Eixo Imune-Pineal

Desde 1966 é sabido que pinealectomia de ratos neonatos leva a alteração da arquitetura tímica (CSABA et al., 1966), o que foi consistentemente corroborado 20 anos depois (MAESTRONI et al., 1986). Vários trabalhos se seguiram a esses mostrando ações da melatonina sobre a resposta imune, em sua quase plenitude, utilizaram-se doses farmacológicas da mesma. Nos últimos anos, foi demonstrado que a melatonina pode ser sintetizada também por células imunocompetentes no decorrer de um processo inflamatório, o que implica em alta concentração local desta indolamina (CARRILLO-VICO et al., 2004; MARTINS et al., 2004; PONTES et al., 2006).

Cumpre salientar que, para diversos autores, a ação antioxidante seria uma função primordial diretamente relacionada à modulação de células imunocompetentes (REITER e MAESTRONI, 1999).

Revisão de Markus et al. (2007) apresenta que a fototransdução da pineal, pela produção e liberação de melatonina, é potenciada ou suprimida na dependência do tipo de modulador da inflamação. De forma específica, a ação do hormônio corticosterona (anti-inflamatório) ou da citocina TNF (pró-inflamatória) modula a função da glândula pineal.

Sobre os efeitos da corticosterona, na presença deste hormônio ocorre a potenciação da produção de melatonina verificada em diferentes situações experimentais, a saber: glândulas em cultura (FERREIRA et al., 2005), situações de estresse (COUTO-MORAES et al., 2009) e, perfusão direta deste hormônio sob a glândula pineal (FERNANDES et al., 2009). A respeito do mecanismo de ação, corticosterona age por meio de receptores para glicocorticóide (GR), e também, pela via

de transcrição do NFκB (FERREIRA et al., 2005), aumentando a transcrição do gene da enzima AA-NAT, que é uma enzima da via biossintética de melatonina (FERNANDES et al., 2006 e 2009).

Sobre os efeitos do TNF, existe uma correlação inversa entre os níveis desta citocina no leite e os níveis de melatonina no sangue em parturientes com mastite aguda, inclusive células imunocompetentes passando a produzir melatonina localmente (PONTES et al., 2006). Sabe-se que o bloqueio da síntese de melatonina é mediado pela ativação do fator de transcrição NFκB que inibe a transcrição do gene da enzima AA-NAT (FERREIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006). Lembrar que esse fator de transcrição possui papel central nas respostas inflamatórias (MEFFERT e BALTIMORE, 2005).

Estudos sobre respostas inflamatórias tanto crônicas (LOPES et al., 1997 e 2001) como aguda (PONTES et al., 2006 e 2007), e também, sobre mecanismos vasculares relevantes para a resposta inflamatória (LOTUFO et al., 2001 e 2006) sugerem que a produção central (pineal) de melatonina é abolida na fase pró-inflamatória, passando esta indolamina a ser produzida por células imunocompetentes (CARRILLO-VICO et al., 2004; MARTINS et al., 2004; PONTES et al., 2006) e retorna na fase anti-inflamatória (MARKUS et al., 2007; COUTO-MORAES et al. 2009; FERNANDES et al., 2009).

Em suma, mediadores da inflamação (citocinas e glicocorticóides) modulam a função pineal por promover supressão (citocina pró-inflamatória) ou potenciação (glicocorticóide) da síntese noturna de melatonina (MARKUS et al., 2007; COUTO-MORAES et al. 2009).

Interessante verificar consistência no papel da glândula pineal na modulação do sistema imune, e vice-versa, pois esta glândula é um alvo de citocinas centrais e periféricas, visto que está localizada numa região especial - órgãos circunventriculares, assim podendo interagir com moléculas presentes tanto do sangue como do líquor (DUVERNOY e RISOLD, 2007).

Cumpre salientar que, a modulação oposta da biossíntese central/endócrina (pineal) da melatonina pela citocina (pró-inflamatória) TNF (FERNANDES et al., 2006) e pelo hormônio (anti-inflamatório) corticosterona (FERREIRA et al., 2005; COUTO-MORAES et al., 2009) reforça fortemente a existência de um Eixo Imune-Pineal (MARKUS et al., 2007).

Achados obtidos com camundongos submetidos à inflamação crônica reforçam a idéia que o tônus aumentado de liberação do hormônio da córtex da adrenal é de crucial importância na manutenção do pico noturno de melatonina, pois o edema de pata induzido pelo bacilo BCG-Calmette-Guérin mostra variação cíclica diária, a qual é abolida sob condições de luz constante ou pinealectomia (LOPES et al., 1997) e adrenalectomia (cirúrgica ou farmacológica por metirapona) (LOPES et al., 2001), ambas condições podendo ser revertidas pela administração de melatonina.

Couto-Moraes et al. (2009) confirmam a existência de interação entre glândula adrenal e glândula pineal. Esta comunicação permite ampliar o entendimento acerca da glândula pineal, que agora pode ser vista como um importante sensor e efetor em estados de injúria, seja inflamação ou estresse.

Não se pode esquecer de reforçar que, fontes extra-pineais que sintetizam melatonina num padrão constitutivo (mucosa intestinal, BUBENICK, 2002) ou induzido (células imunocompetentes, CARRILLO-VICO et al., 2004; MARTINS et al., 2004;

PONTES et al., 2006) não contribuem para o ritmo circadiano de melatonina. Estas fontes são responsáveis unicamente por produzir melatonina em regiões específicas e, portanto, responsável pelo papel local (MARKUS et al., 2007).

Receptores de melatonina acoplados à membrana plasmática são encontrados em muitos órgãos/tecidos/células periféricos, incluindo por exemplo, órgãos linfóides e células imunes (SKWARLO-SONTA, 2002). Salienta-se que a expressão de genes para tais receptores dentro do sistema imune se mostra espécie-específica e órgão-específica (SKWARLO-SONTA, 2002).

Foi demonstrado que mudanças diurnas e sazonais na função imune ocorrem por meio de mudanças de amplitude e concentração da produção de melatonina pela glândula pineal (NELSON e DRAZEN, 1999; MOLINERO et al. 2000; MOORE e SIOPES, 2000; HALDAR et al., 2001).

Níveis reduzidos ou ausentes de melatonina refletem em diminuição de órgãos linfóides tanto de mamíferos (timo de roedores - CSABA et al., 1966; CSABA e BARATH, 1975; MAESTRONI et al., 1986) como de aves (baço e bursa de Fabrício de galinhas, JANKOVIC et al. 1994). De modo oposto, administração de melatonina reflete em aumento de órgãos/tecidos linfóides de roedores, tanto timo (HALDAR e SINGH, 2001) como baço (BRAINARD et al., 1988). De forma semelhante, função imune mediada por célula é aumentada pelo tratamento com melatonina (DEMAS e NELSON, 1998). Inversamente, pinealectomia diminui esta função (HALDAR e SINGH, 2001).

Outros trabalhos mostraram que tratamento com melatonina eleva tanto a resposta imune celular como humoral em codornas (MOORE e SIOPES, 2000). Adicionalmente, melatonina têm sido reportada em induzir diretamente a proliferação de mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) *in vitro* (KUHLWEIN e IRWIN,

2001). Todavia, os achados sobre a síntese de IFN-y por PBMCs são contraditórios, sendo reportado: inibição (DI STEFANO e PAULESU, 1994), estimulação (GARCIA-MAURINO et al., 2000), ou nenhum efeito (KUHLWEIN e IRWIN, 2001).

Células imunocompetentes de roedores (MAESTRONI et al., 1987 e 1988) e galinhas (MAJEWSKI et al., 2005) dependem, ao menos em parte, de resposta opoidérgica para responder ao estímulo exógeno após tratamento com melatonina. O mecanismo que poderia explicar tal achado seriam as ações hematopoiéticas da melatonina (MAESTRONI, 1999). Lembrando que ação antiinflamatória da melatonina em ratos é reportada na literatura (CUZZOCREA et al., 1998).

Estudos de Maestroni et al. (1987 e 1988) têm mostrado que a supressão da mletonina endógena (em camundongos) resulta em diminuição da atividade do baço e do timo bem como a resposta primária de anticorpos a antígenos T-dependentes, o que é revertido pela administração de melatonina. Além disto, a administração crônica de melatonina aumenta a atividade das células T-auxiliares e a produção da citocina IL-2 (CAROLEO et al., 1992) e suprime a expressão gênica da 5-lipoxigenase em linfócitos humanos (STEINHILBER et al., 1995). Melatonina endógena é implicada em regular a produção da citocina IL-1 por PBMCs (GARCIA-MAURINO et al., 1998).

Revisão de Poon e Pang (1996) sugerem alguns mecanismos de ação da melatonina sobre o sistema immune, os quais incluem estimulação da produção de peptídeos opióides por linfócitos T-auxiliares ativados e de certas citocinas (como IL-2 e IFN-γ) bem como inibição da ação imunossupressiva dos coritocosteróides.

Pelo fato da melatonina ser uma molécula pequena com alto coeficiente de partição óleo-água, assim podendo penetrar facilmente nas membranas celulares, é

preconizado seu papel de poderoso antioxidante aos diversos tecidos, incluindo o sistema imune (revisto por REITER e MAESTRONI, 1999). Desta forma, a melatonina teria uma ampla função orgânica já que atuaria sem a mediação de receptores. Contudo, existe a presença de receptores para melatonina no sistema imune.

A primeira demonstração da presença de receptores para melatonina no sistema imune foi feita por Niels (1989) no baço de hamsters. Posteriormente, foi verificado também nos órgãos linfóides de outros roedores (YU et al., 1991; LOPEZ-GONZALEZ et al., 1993a) e até mesmo em aves (YU et al., 1991) bem como em algumas células imunocompetentes humanas, linfócitos (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1992), neutrófilos (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1993b) e monócitos (BARJAVEL et al., 1998), e também, macrófagos peritoneiais de camundongos (GARCIA-PERGAÑEDA et al., 1999).

A melatonina tem sido consistentemente proposta também para tratamento anticâncer (MILLER et al., 2006). Estudos em animais têm evidenciado duas propriedades oncostáticas da melatonina, diminuição da geração e da progressão de tumores (revisto por PAWLIKOWSKI et al., 2002), especialmente em tumores hormônio-dependentes como os reprodutivos (HILL et al., 1992; HRUSHESKY e BLASK, 2004.). Pinealectomia em roedores acelera o crescimento de certos tumores, o que pode ser reduzido pela administração de melatonina (revisto por NELSON e DRAZEN, 1999).

A melatonina atua intracelularmente sem a necessidade de receptores, e também, por uma série de receptores (de membrana e intracelulares) que foram classificados e reclassificados conforme a espécie e as características funcionais dos mesmos, para maiores detalhes consultar revisão por Jockers et al. (2008). As diferentes vias de transdução do sinal ativadas por melatonina são amplamente

desconhecidas, embora saibam que existe um decréscimo dos níveis de cAMP, após elevação por tratamento prévio com forskolin em células imunes de mamíferos (GARCIA-PERGAÑEDA et al., 1997 e 1999), isto é prevenido com a pré-incubação com toxina pertussis o que indica mediação por proteína Gi. A observação que existe aumento da concentração de cGMP em monócitos humanos seguido do tratamento com melatonina sugere envolvimento de outros segundos mensageiros (SANDLER et al., 1975).

A expressão de receptores de citocinas nos pinealócitos ainda carece, contudo, por tudo já demonstrado, a presença dos mesmos pode ser deduzida por uma série de estudos *in vitro* usando diferentes ligantes, tais como: IFN-γ (WITHYACHUMNARNKUL et al. 1991), IL-1 (MUCHA et al., 1994) e TNF (FERNANDES et al., 2006). Portanto, existem ações diretas nos pinealócitos, por meio de citocinas e outros fatores imunológicos, os quais poderiam modular a função pineal por ações indiretas nas células gliais da pineal. Como suporte para tal afirmação, a presença de receptores para citocinas nas células gliais do SNC já foi mostrada em meados da década de 80 do século passado (SANETO et al., 1986; SANETO et al., 1987). Além disto, têm sido observados que as ações de diversas citocinas (como: IFN-γ e IL-1β) na função pineal *in vitro* são mediadas pela micróglia (TSAI e MCNULTY, 1999; TSAI et al., 2001a e 2001b), diferentemente do que observado por outros mediadores como TNF que exercem efeitos por ações diretas nos pinealócitos (FERNANDES et al., 2006). Entretanto, as moléculas envolvidas nesta comunicação glia-pinealócito ainda permanecem desconhecidas.

Atualmente, é aceito que a glândula pineal por meio da síntese rítmica de melatonina influencia a função do sistema imune (SKWARLO-SONTA, 2002), e

também, o desenvolvimento, a diferenciação e a função de órgãos/tecidos linfóides (MAESTRONI, 1998; REITER et al., 2000). O inverso também é verdadeiro como mostrado anteriormente neste texto. Portanto, ambos são reciprocamente modulados, ou seja, existe uma comunicação bidirecional. Desta forma, a melatonina pode ser compreendida como um imunomodulador.

Sobre o papel de imunomodulador da melatonina, Maestroni (2000) tem proposto um duplo papel da melatonina como imunomodulador: (1) imunomodulador rápido – onde ela promove a ativação do sistema immune após um desafio imunológico agudo (essencialmente, infecção bacteriana ou viral) pela potenciação da atividade celular da população Th1, da função dos macrófagos e da produção de citocinas; (2) imumodulador lento – onde a melatonina “zera” no longo-prazo o sistema imune pelos efeitos na hematopoiese e a taxa mitótica de timócitos.

Por tudo visto, fica claro a existência de uma comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imune, com a participação do sistema endócrino, particularmente a glândula adrenal. Desta forma, é um campo de investigação profícuo. A melatonina agora pode ser melhor entendida como um fator imunoregulador no desenvolvimento e maturação do sistema imune e na progressão da resposta imune. Do outro lado, o sistema imune parece regular reciprocamente a função da glândula pineal, principalmente via citocinas produzidas por células imunes ativadas, porém os mecanismos envolvidos nesta direção são amplamente desconhecidos.

3 OBJETIVOS

A seguir serão descritos os objetivos de maneira ampla e detalhadamente.

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral da presente tese é testar a hipótese que a pineal faz parte integrante da resposta ao estresse, da mesma forma que está integrada no processo inflamatório.

3.2 Objetivos Específicos

> Caracterizar os modelos experimentais de estresse por contenção;

> Caracterizar o modelo experimental de estresse pelo frio;

> Avaliar os efeitos do estresse por contenção sobre a glândula pineal *in vivo* por meio da determinação da produção de N-acetilserotonina e melatonina;

> Avaliar os efeitos do estresse pelo frio sobre a glândula pineal *in vivo* por meio da determinação da produção de N-acetilserotonina e melatonina;

> Avaliar os efeitos do estresse mediante inibição farmacológica da síntese de corticosterona ou bloqueio farmacológico da ação da corticosterona sobre a glândula pineal *in vivo* por meio da determinação da produção de melatonina;

> Avaliar os efeitos do estresse mediante inibição da síntese da citocina TNF sobre a glândula pineal *in vivo* por meio da determinação da produção de melatonina;

> Avaliar o papel da estimulação alfa-adrenérgica na presença ou não de cada modalidade de estresse sobre a glândula pineal *in vivo* por meio da determinação da produção de melatonina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão detalhados, de modo especificado, os materiais e métodos constantes deste trabalho de pesquisa.

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar comprados do biotério do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ) - Universidade de São Paulo (USP), por meio de cruzamentos sucessivos. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40 cm X 50 cm X 20 cm) mantidas em sala com temperatura e umidade controladas (20 ± 2 °C, 70 ± 5%; respectivamente) e com ciclo de luz artificial acionado por *timer* (06h00 às 18h00). Ração (Nuvilab CR1® - Nuvital Nutrientes S.A.) e água (filtrada em porcelana) foram fornecidas *ad libitum* durante todo procedimento experimental. Todos os procedimentos seguiram as recomendações e os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ–USP, a qual aprovou o presente projeto científico sob Protocolo Nº 1113/2007, com aprovação conseguinte da Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP e da Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB-USP (Protocolo Nº 043/2007). Atualizações do projeto foram devidamente comunicadas às comissões de ética.

4.2 Drogas, Reagentes e Soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas, reagentes e soluções em ordem alfabética, para os diversos procedimentos realizados, citando:

> álcool etílico absoluto (Synth®; Labsynth - Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil);

> cloreto de sódio (Synth®; Labsynth - Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil);

> conjunto diagnóstico comercial para quantificação da citocina TNF (Rat TNF-α ELISA, eBioscience®, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América);

> conjunto diagnóstico comercial para quantificação do hormônio corticosterona (ImmnuChem ^{125}I Corticosterone RIA, MP Biomedicals®, Solon, Ohio, Estados Unidos da América);

> dimetil sulfóxido (Merck®; Darmstadt, Hessen, Alemanha);

> excipiente (talco farmacêutico - Talco USP Plus®; Xilolite S.A., São Paulo, São Paulo, Brasil);

> fenilefrina (Nome Químico-IUPAC: 3-[(1R)-1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]phenol, Sigma–Aldrich®, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América);

> gás He (White Martins®; Osasco, São Paulo, Brasil);

> heparina sódica (Liquemine®, F. Hoffmann-La Roche Ltda., Basiléia, Suiça);

> metirapona (Nome Químico-IUPAC: 2-methyl-1,2-dipyridin-3-yl-propan-1-one, Sigma–Aldrich®, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América);

> mifepristone (Nome Químico-IUPAC: 11β-[p-(Dimethylamino)phenyl]-17β-hydroxy-17-

(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-one, Sigma–Aldrich®, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América);

> polietilenoglicol (Nome Químico-IUPAC: poly(oxyethylene), Synth®; Labsynth - Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil);

> sabão neutro inodoro (Biokill Clean®;Lumazil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil);

> talidomida (FUNED Talidomida®; Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

4.3 Objetos e Vidrarias

Foram utilizados os seguintes objetos e vidrarias, em ordem alfabética, para os diversos procedimentos realizados, citando:

> agulha hipodérmica (BD-Precision Glide®; 0,55 x 20 – 24G¾);

> bastão de vidro;

> bateria para “timer”;

> bebedouro de policarbonato;

> cadinho de porcelana;

> caixa de cotonetes;

> canetas para retroprojetor;

> cassete plástico;

> estante para microtubos de plástico;

> estante para tubos de ensaio de plástico;

> estante para tubos plásticos do tipo Falcon;

> fita adesiva marrom;

> forma de plástico para alocação de estante para tubos;

> frasco âmbar com tampa de rosca (capacidade de 50 mL);

> gaiola de polipropileno para camundongos (Elo's; dimensões: 30 x 20 x 13 cm);

> gaiola de polipropileno para ratos (Elo's; dimensões: 40 x 50 x 20 cm);

> lâmina de vidro (26 x 76 x 0,01 cm);

> lamínula;

> microtubo plástico de armazenamento (capacidade de 1,5 mL);

> papel absorvente;

> papel filtro;

> papel tipo *Kraft*;

> papel vegetal (Gateway®);

> parafilme (Parafilm M®);

> pilha 1,5 V para pistilo;

> pipetas de repetição (eppendorf®; volumes de ejeção de 200 uL e 2000 uL);

> pipetas graduadas (eppendorf®; capacidades de 10 uL, 100 uL, 200 uL e 1000 uL);

> pipetas multiponto (Multipette plus - eppendorf®; capacidades de 50 uL);

> pistilo;

> placa de parafina;

> placa de Petri;

> ponteiras comuns (capacidades de 10 uL, 100 uL, 200 uL e 1000 uL);

> ponteiras de repetição (eppendorf®; volumes de ejeção de 200 uL e 2000 uL);

> proveta de vidro graduada;

> rolo de alumínio;

> seringa de plástico (BD-Plastipack® insulina U-100);

> sonda uretral – calibre número 8 para gavage (EMBRAMED®);

> tubo de ensaio de plástico;

> tubo plástico do tipo Falcon (volume 15 mL);

> vasilhame plástico com vedação para descarte de líquido radioativo (garrafa PET);

> vasilhame plástico com vedação para descarte de sólido radioativo;

> vasilhame plástico para alocação de estante de tubos;

> vasilhame plástico para pesagem de animais (dimensões: 11 x 18 x 12 cm).

4.4 Instrumentos Cirúrgicos

Foram utilizados os seguintes instrumentos cirúrgicos, em ordem alfabética, para os diversos procedimentos realizados, citando:

> pinça tecidual Russa (RZ Medizintechnik®);

> pinça de corte ósseo de Liston (Erwin Guth®);

> pinça tecidual de Semkin (Edlo®);

> tesoura cirúrgica de Sistrunck (Edlo®).

4.5 Aparelhos

Foram utilizados os seguintes aparelhos, em ordem alfabética, para os diversos procedimentos realizados, citando:

> aparato de contenção para ratos (confecção própria);

> aparelho cromatográfico, com o seguinte sistema: bomba (Shimadzu® LC-6A), injetor (Reodyne® 7125 com loop de 20 μL), coluna C18 fase reversa (Waters® Resolve 150 x 3,9 mm, partícula esférica de 5 micra) e, detector eletroquímico (Shimadzu® L-ECD-6A) acoplado a computador.

> balança digital de precisão para pesagem de fármacos (Acculab®, V-1mg);

> balança digital de precisão para pesagem de sais (Precisa® 92SM-202A);

> caixa escura para transporte (confecção própria);

> centrífuga refrigerada para sangue (Sanyo® Harrier 18/80);

> centrífuga refrigerada para reagentes radioativos (Sorvall® Superspeed RC2-B);

> contador automático de radiação gama (Packard® Cobra II);

> contador de tempo inverso “timer” (SCMC® Timero 103);

> estereoscópio (Olympus® SZ51);

> fonte luminosa vermelha para revelação fotográfica (Konex® PFLR110, iluminação de 5 Lux) ;

> geladeira para exposição dos animais ao frio (Electrolux® R34);

> geladeira vertical para conservação das soluções (Reubly® VE-VM 51A);

> guilhotina (Insight®);

> lâmpada de emergência (FLC® 238);

> leitor de placas (Molecular Devices® Spectra Max 250);

> microscópio óptico (Nikon® Eclipse 80i);

> micrótomo (Leica® RM2245);

> multímetro digital (MINIPA® ET-2517);

> pistilo de teflon (Kontes®);

> sistema a vácuo com filtro (Millipore®)

> sonicador (Microsonic® SX-20);

> ultra-freezer para estocagem até procedimentos de quantificação (SO-LOW® C85-7);

> ultra-freezer para estocagem de alíquotas (SO-LOW® V85-18);

> vortex (Vortex® Genie 2).

4.6 Preparo dos Fármacos

As soluções dos fármacos, bem como de seus respectivos veículos, administradas aos animais foram preparadas de modo a serem utilizadas na proporção de volume da solução por peso corporal do animal, ou seja, 1,0 mL de solução para 1,0 kg de peso corporal. Destaca-se que as soluções de fármacos e de seus veículos sofreram sonicação por cinco minutos por cerca de 15 minutos antes da administração aos animais.

4.6.1 Preparo da Solução de Metirapona

A solução de metirapona foi preparada para administração na dose de 200 mg/kg. Para o preparo da solução de metirapona a 20% foram mensuradas duas alíquotas de 1000 mg da substância em balança de precisão, a seguir uma das alíquotas foi depositada em frasco âmbar. Após acrescentou-se 7,5 mL de solução salina a 0,9%, sendo transferido o frasco para sonicador permanecendo por 15 minutos. Finalizado este intervalo de tempo, a outra alíquota de igual peso foi adicionada e acrescentou-se 2,5 mL de polietilenoglicol, sendo novamente o frasco

transferido para o sonicador permanecendo por 10 minutos. A solução final permaneceu no mesmo frasco âmbar com tampa de rosca e foi devidamente identificada, daí acondicionada em geladeira nas condições de 8 ± 2 °C. Para o preparo do respectivo veículo foram cumpridas as mesmas etapas anteriormente descritas, exceto a adição do fármaco em questão que foi devidamente substituído por excipiente no sentido de dar similar viscosidade da solução de fármaco e não prover diferenças na administração aos animais.

4.6.2 Preparo da Solução de Mifepristone

A solução de mifepristone foi preparada para administração na dose de 50 mg/kg. Para o preparo da solução de mifepristone a 5% foi mensurada uma alíquota de 300 mg da substância em balança de precisão, a seguir a alíquota foi depositada em frasco âmbar. Após acrescentou-se 600 uL de etanol absoluto, sendo a solução agitada suavemente com bastão de vidro. Após verificação visual de formação de uma solução, adicionou-se 2400 uL de polietilenoglicol escorrendo sobre o bastão de vidro, daí transferido o frasco para sonicador permanecendo por 15 minutos. Finalizado este intervalo de tempo, adicionou-se 3000 uL de polietilenoglicol, sendo novamente o frasco transferido para o sonicador permanecendo por 15 minutos. Ao final, a solução permaneceu no mesmo frasco âmbar com tampa de rosca e foi devidamente identificada, daí acondicionada em geladeira nas condições de 8 ± 2 °C. O preparo do respectivo veículo seguiu os mesmos procedimentos com a troca da substância por excipiente pela mesma razão descrita anteriormente no preparo da solução de metirapona.

4.6.3 Preparo da Solução de Talidomida

A solução de talidomida foi preparada para administração na dose de 50 mg/kg. Para o preparo da solução de talidomida a 5% foram usados comprimidos de 200 mg, sendo metade do peso para talidomida e a outra metade de excipiente, os mesmos foram individualmente triturados com auxílio de pistilo em cadinho de porcelana, após foi mensurada o peso total em balança de precisão, em seguida, uma alíquota de 1900 mg foi adicionada em proveta de vidro graduada. Após acrescentou-se dimetil sulfóxido até o volume de 15,0 mL, adicionado “peixinho”, levada a agitador magnético permanecendo por 10 minutos. Após verificação visual de formação de uma solução, adicionou-se dimetil sulfóxido até completar o volume de 19,0 mL, então, sendo transferida para sonicador permanecendo por 15 minutos. Ao final, a solução foi transferida para frasco âmbar com tampa de rosca e foi devidamente identificada, daí acondicionada em geladeira nas condições de 8 ± 2 °C. Os mesmos apontamentos feitos anteriormente para o preparo do respectivo veículo são válidos.

4.6.4 Preparo da Solução de Fenilefrina

A solução de fenilefrina foi preparada para administração na dose de 0,4 mg/kg. Para o preparo da solução de fenilefrina a 0,04% foi mensurada uma alíquota de 3,2 mg da substância em balança de precisão, a seguir a alíquota foi depositada em frasco âmbar. Após acrescentou-se 8,0 mL de solução salina a 0,9%, sendo o frasco transferido para sonicador permanecendo por cinco minutos. Ao final, a

solução permaneceu no mesmo frasco âmbar com tampa de rosca e foi devidamente identificada, daí acondicionada em geladeira nas condições de 8 ± 2 °C. Os mesmos apontamentos feitos anteriormente para o preparo do respectivo veículo são válidos.

4.7 Procedimentos

Neste item serão transcritos os procedimentos experimentais realizados diretamente nos animais ou em seus materiais biológicos.

4.7.1 Aplicação da Contenção

Os ratos foram submetidos à contenção pelo intervalo de 30 minutos ou 2 horas em aparato especialmente confeccionado (**Figura 1**), nos quais os animais tiveram apenas restrição dos movimentos, sem compreensão torácica ou abdominal, sudorese, hipertermia ou dor, conforme recomendações feitas por Pacak et al. (1992).

O aparato foi construído no Laboratório de Ambiência de Biotérios e Desenvolvimentos Alternativos, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de São Paulo com auxílio direto do Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse.

Figura 1. Fotografia do aparato de contenção para indução de estresse em ratos. Na vista lateral, observar as perfurações. Na vista frontal, visualizar a tampa de acrílico transparente. Na vista traseira, notar a reentrância para a cauda. Internamente, verificar a placa retilínea (não côncava) disposta como base.

Adiante segue um breve detalhamento do aparato com as razões albergadas dentro de cada aspecto de sua confecção. No sentido de evitar compreensão torácica ou abdominal, o aparato teve as seguintes medidas: 22 x 7 x 4 cm (comprimento x largura x altura), as quais permitiram a utilização de nossos animais na idade de até aproximadamente 130 dias com peso por volta de 450 gramas. Para evitar estase sangüínea na linha alba, o aparato recebeu na sua base (em contato com a porção ventral do animal) placa de madeira retilínea (não côncava como nos aparatos comerciais) encoberta por fórmica branca lisa. Para permitir que o animal tivesse percepção da luminosidade ambiental, a extremidade frontal do aparato foi feita de acrílico transparente. Para evitar hipertermia ou sudorese foram feitas perfurações ao

longo do comprimento do aparato em três linhas longitudinais (duas laterais e uma dorsal) para permitir ventilação. No sentido de evitar torção da cauda e, consequentemente dor, na tampa traseira foi feita reentrância para manutenção da cauda do animal fora do aparato.

Cumpre salientar que ao final do procedimento de contenção, cada aparato foi cuidadosamente lavado com sabão neutro inodoro, desinfetado com álcool 70% e deixado secar em ambiente no sentido de evitar a impregnação de odores de urina e fezes bem como ferormônios, os quais poderiam servir de pista ambiental aos outros animais a serem submetidos a tal procedimento.

4.7.2 Exposição ao Frio

Os ratos foram expostos ao frio pelo intervalo de 30 minutos ou 2 horas, por meio do acondicionamento individual em gaiolas de camundongo (30 x 20 x 13 cm) com maravalha rarefeita e, posterior alocação das mesmas em geladeira com temperatura ajustada por termostato para 5,0 ± 1,0 °C, segundo calibração por meio de multímetro digital (detalhes da mensuração: Termopar tipo K, amplitude de -50 a 1000 °C, precisão 0,1 °C). No sentido de manter o mesmo período ambiental do ciclo claro-escuro foi colocado lâmpada de emergência na geladeira, com as seguintes especificações: fluxo luminoso de 720 lm, potência de 16 W, eficiência luminosa de 45 lm/W e iluminação de 357,5 Lux. O modo de exposição ao frio pode ser visualizado na figura adiante (**Figura 2**).

Figura 2. Fotografia de gaiolas junto de lâmpada de emergência em geladeira para exposição dos ratos ao frio. Na porção superior, observar a lâmpada de emergência. Na porção central, visualizar a disposição das gaiolas. Na porção inferior, notar não ocupação do espaço para prover eficiente circulação de ar.

Salienta-se que cerca de duas horas antes da alocação das gaiolas de camundongos para exposição dos ratos ao frio, a geladeira era cuidadosamente desinfetada com álcool 70% com abertura após 15 minutos e provida troca completa do ar interno com a mesma razão da lavagem e desinfecção do aparato de contenção. Este procedimento de desinfecção era realizado cerca de uma hora após o término da exposição dos animais ao frio.

4.7.3 Horário dos Procedimentos de Estresse

A aplicação da contenção bem como da exposição ao frio foi sempre realizada durante a fase clara do ciclo de luz entre 15:00 (ZT9) e 17:50 (ZT12). De forma correlata, os procedimentos aos animais controle ocorreram neste mesmo horário.

A escolha deste período ocorreu por duas razões, uma relacionada ao eixo HPA e a outra à glândula pineal. Primeira razão, a corticosterona não resultante do estresse (estímulo exógeno) apresenta um ritmo circadiano com aumento de sua concentração a partir de ZT9 e pico em ZT11-12 em ratos (KALSBEEK e BUIJS, 2002). Isto implica que ao promover estresse justamente neste período da fase clara do ciclo de luz (ZT9-ZT12) estamos observando a contribuição real de um aumento de corticosterona ao funcionamento da glândula pineal, e não de um ligeiro aumento resultante do estresse seguido do pico fisiológico caso fosse feito na primeira metade da fase clara (período matutino, ZT0-ZT6) como preconizado por muitos experimentos com estresse. Segunda razão, a densidade de adrenoceptores beta na glândula pineal (os responsáveis pela ativação da cadeia biosintética da melatonina, SUGDEN et al., 1984; REITER, 1991) é aumentada cerca de 100 vezes no período de transição da fase clara para a fase escura do ciclo (ROMERO e AXELROD, 1974; PANGER et al., 1990).

4.7.4 Avaliação da Geração de Úlceras Gástricas

Os animais submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio foram eutanasiados imediatamente após ou 360 minutos. Da mesma maneira, os animais controle e não-experientes (do inglês, *naive*) foram eutanasiados no mesmo intervalo

de tempo.

A avaliação da geração de úlceras gástricas envolveu duas etapas, exame macroscópico (etapa 1) e exame microscópico (etapa 2). Toda técnica tanto para exame macroscópico como microscópico seguiu as recomendações adotadas pelas instituições européia RITA (do inglês, *Registry of Industrial Toxicology Animal-data*) e americana NACAD (do inglês, *North American Control Animal Database*), as quais são órgãos de aprovação/registro de medicamentos, produtos químicos e agrotóxicos (editadas por RUEHL-FEHLERT et al. 2003; KITTEL et al., 2004; MORAWIETZ et al., 2004), assim foram adotados procedimentos padronizados internacionalmente não sendo possível qualquer interpretação/diagnóstico particularizado.

Para o exame macroscópico, após eutanásia dos animais, os corpos foram dissecados e os estômagos retirados, abertos por meio de tesoura cirúrgica de Sistrunck pela curvatura maior e lavados delicadamente em solução salina a 0,9% sob placa de Petri sendo suspendidos por pinça tecidual Russa. A seguir, o estômago foi estendido por meio da fixação de alfinetes sob placa de parafina, daí fez-se a observação macroscópica do mesmo, com especial atenção para o aparecimento de lesões ulcerativas e aparecimento de estrias hemorrágicas, primeiramente a olho nu, em seguida, com auxílio de estereoscópio. Após esta análise, procedeu-se o corte (por meio de tesoura cirúrgica de Sistrunck) de um fragmento representativo da área fúndica (localização da mucosa gástrica) que foi disposto sobre papel filtro dentro de cassete plástico devidamente identificado e mergulhado em vasilhame de vidro com tampa de rosca contendo tampão formol a 10% na proporção de 1:20 (tecido:fixador).

Para avaliação histológica dos estômagos, após fixação em tampão formol a 10% por até 3 meses, os fragmentos coletados seguiram as etapas comuns de inclusão

em parafina, a saber: lavagem (em água corrente) de forma mecânica, desidratação (em gradação alcoólica crescente), diafanização (com xilol) e, inclusão em parafina. Em seguida, realizou-se o corte dos fragmentos em micrótomo na espessura de 5,0 um e montagem em lâmina de vidro. Posteriormente, foi realizada a coloração em hematoxilina (de Harris) e eosina (amarela). Ao final, acomodação e adesão de lamínula por meio de resina Permount. As amostras de estômagos em lâmina foram inspecionadas em toda sua extensão em microscópio óptico comum nos aumentos de 40, 100, 200 e 400x.

4.7.5 Coleta de Sangue e Obtenção de Plasma

Os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina e, conseguinte, foram coletados 3 mL de sangue em tubo tipo Falcon 15 mL, contendo heparina sódica no volume de 0,1 mL, para posterior dosagem da citocina TNF. O sangue foi mantido em gelo até centrifugação (5000 x g, 15 minutos, 25 ºC) e, ao final, coletou-se, por meio de pipeta graduada, o plasma em frações de 50 μL até completar, sempre que possível, o volume de 375 μL. O plasma obtido foi acondicionado em três alíquotas de mesmo volume (125 μL) em microtubos, então, armazenado em ultra-freezer (–80 ± 5 ºC) até os procedimentos de dosagem, os quais foram realizados dentro de até quatro semanas.

4.7.6 Coleta de Sangue e Obtenção de Soro

O mesmo procedimento anteriormente descrito (item 4.7.5.) foi realizado para dosagem do hormônio corticosterona, exceto pela adição de heparina sódica que não foi feita. O armazenamento segue a mesma descrição anterior, porém o tempo foi de até duas semanas.

4.7.7 Coleta da Glândula Pineal

Para coleta da glândula pineal, os ratos tiveram a gaiola moradia acomodada em caixa escura (especialmente confeccionada, **Figura 3**), então, sendo transportados da sala de manutenção (biotério) para sala escura de eutanásia (apêndice dentro do próprio Biotério do Depto. de Patologia da FMVZ/USP), daí submetidos à eutanásia individualmente por decapitação em guilhotina.

A retirada desta glândula foi realizada a partir do arrebatamento da pele cranial por meio de tesoura cirúrgica de Sistrunck, após foram incisadas, por meio do mesmo instrumental, as musculaturas laterais do crânio localizadas sob os processos zigomáticos do osso frontal e frontal do osso zigomático, a seguir, foi inserido a ponta da pinça de corte ósseo de Liston pelo forame magno promovendo, desta forma, o corte da ossatura lateral da cabeça. Depois de arrebatamento da calota craniana, a glândula pineal situada (no rato) dorsalmente entre os dois hemisférios cerebrais ou na junção de confluência dos seios sagital superior e transversos (bregma) foi coletada por meio de pinça tecidual de SemKin. A glândula pineal coletada foi depositada, individualmente, em microtubo do tipo *eppendorf* e, armazenada em ultra-freezer

(- 80 ± 5 ºC) até processo de quantificação em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography* – HPLC) dentro de até quatro semanas. Para tais procedimentos, uma fonte luminosa vermelha para revelação fotográfica (iluminação de 5 Lux) foi usada na sala escura auxiliando os procedimentos.

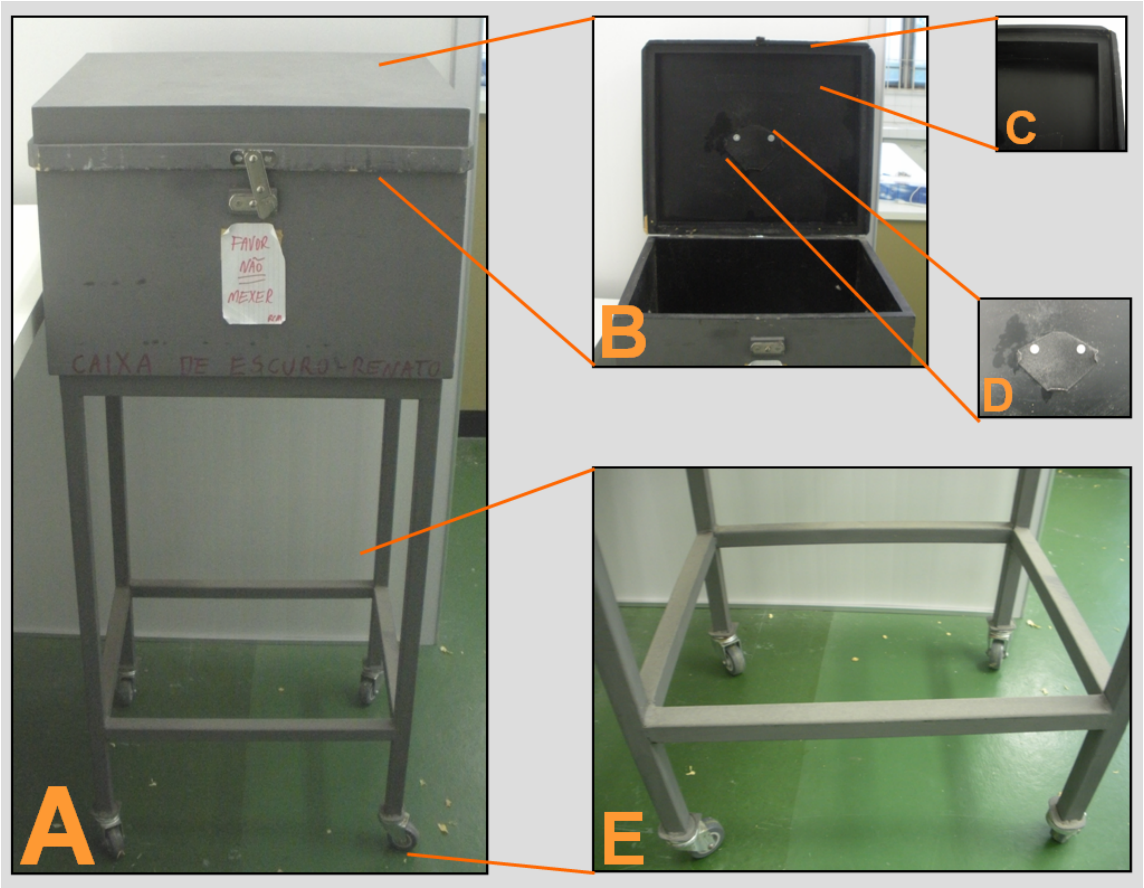

Figura 3. Fotografia da caixa escura de transporte da sala de manutenção para sala escura de eutanásia. Na fotografia A, observar a caixa propriamente dita. Na fotografia B, visualizar a pintura na cor preta na parte interna. Na fotografia C, oservar a tampa com borda excedente para vedação de frestas. Na fotografia D, observar o suporte para alocação de lâmpada vermelha para auxílio na coleta dos animais no escuro para procedimento de eutanásia. Na fotografia E, notar o suporte de ferro com rodinhas (“carrinho”) para suave deslocamento.

4.7.8 Horário da Coleta da Glândula Pineal

A coleta da glândula pineal foi sempre realizada durante a fase escura do ciclo de luz entre 00:30 (ZT 18) e 01:30 (ZT20). De igual forma, os animais controle foram eutanasiados neste mesmo horário.

A escolha deste período do ciclo claro-escuro para coleta desta glândula deve-se ao fato que entre ZT18-ZT20 ocorre o pico de produção de melatonina em ratos (FERNANDES et al., 2009), momento em que o gene aa-nat já foi traduzido na enzima AA-NAT conforme explicado detalhadamente na seção de revisão de literatura da presente tese.

4.7.9 Quantificação de TNF

Para quantificação da citocina TNF em plasma dos ratos utilizou-se a técnica imunoenzimática conhecida como ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*), por meio de conjunto diagnóstico comercial desenvolvido para avaliação quantitativa desta citocina. Os procedimentos e os cálculos seguiram as instruções do protocolo do fabricante.

Resumidamente, a placa do ensaio foi adsorvida com anticorpo de captura, anti-TNF, diluído em diluente do ensaio por cerca de 16 horas a 4 °C. Numa nova etapa, foram feitas repetidas lavagens com tampão de lavagem e, a placa foi incubada com diluente do ensaio por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, novas lavagens foram realizadas, os padrões e as amostras de plasma foram adicionados e a placa incubada por cerca de 16 horas a 4 °C. Ao término deste intervalo de tempo,

novamente procedeu-se repetidas lavagens com tampão, em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção marcado com peroxidase, sendo a placa incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram feitas sucessivas lavagens com tampão e a adição da solução de substrato, com incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi interrompida pela adição de solução de parada. Todos os reagentes necessários são fornecidos no conjunto, com exceção do tampão de lavagem (1x PBS, 0,05% Tween-20) e a solução de parada (1M H3PO4).

Ao final, as absorbâncias foram lidas em leitor de placas com comprimento de onda de 450 nm. Para conversão da densidade óptica (DO) em concentrações de TNF em pg/mL foram realizados cálculos seguindo as instruções do protocolo do fabricante.

4.7.10 Quantificação de Corticosterona

Para quantificação do hormônio corticosterona em soro dos ratos utilizou-se a técnica de radioimunoensaio, em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial desenvolvido para avaliação quantitativa deste hormônio no soro murino. Tal conjunto diagnóstico utiliza como elemento traçador o hormônio de investigação marcado com 125[I], o qual apresenta baixa reação cruzada com metabólitos específicos do hormônio corticosterona e outras substâncias químicas endógenas de estrutura química semelhante. Os procedimentos e os cálculos seguiram as instruções do protocolo do fabricante.

Resumidamente, as amostras de soro foram descongeladas em banho de gelo por cerca de 30 minutos, sendo uma alíquota de 10 µL de cada amostra diluída na proporção de 1:200 com diluente próprio do conjunto. Em seguida, as amostras foram

tratadas com solução contendo anti-corticosterona, agitadas por Vortex e, incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Finalizado este intervalo de tempo, as amostras receberam solução precipitante, agitadas por Vortex e, foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos a 5 ± 2 °C e, o sobrenadante foi desprezado por inversão dos tubos, ainda em posição contrária os mesmos tiveram captura de líquido remanescente por meio de cotonete, sendo posicionados com abertura para cima na estante e cobertos por papel alumínio de modo individual até a contagem da radioatividade. A leitura da radioatividade remanescente no precipitado foi feita por meio de Contador Automático de Radiação Gama. Para conversão das Contagens por Minuto (CPM) em concentrações de corticosterona em ng/mL foram realizados cálculos seguindo as instruções do protocolo do fabricante.

4.7.11 Quantificação de N-Acetilserotonina e Melatonina

Para quantificação de N-acetilserotonina (NAS) e melatonina (MEL) na glândula pineal dos ratos utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography* – HPLC) com detecção eletroquímica, conforme método adaptado pelo grupo (FERREIRA et al., 1994).

O aparelho cromatográfico (já descrito) teve detector mantido com potencial de +0,90 V no eletrodo de trabalho (versus eletrodo de referência Ag/AgCl). Solução estoque de 1mM das substâncias foi preparada em HCl 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA e diluída, no instante da análise, em ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA para obtenção de concentrações da ordem de 0,05 a 8,0 ng. As glândulas pineais foram,

após descongelamento em banho de gelo, homogeneizadas com pistilo de teflon em intervalo de tempo em torno de 10 segundos, ainda em banho de gelo, por um volume de 120 μL de uma solução de ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de metabissulfito de sódio e 0,02% de EDTA. Após, este material foi, então, centrifugado a 13000 x g por 5 minutos a 4 °C, ao final um volume de 20 μL do sobrenadante foi injetado no aparelho cromatográfico. A fase móvel utilizada para a análise das indolaminas era constituída de acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM, metanol (91/9 a 92/8, V/V para N-acetilserotonina e 73/27 a 75/25, V/V para melatonina), pH ajustado para 3,7, fluxo de 0,8 a 1,0 mL/min. Pontua-se que, a fase móvel foi previamente filtrada num sistema a vácuo com filtro de 0,22 μm e, continuamente degaseificada com uso de gás He.

4.8 Delineamento Experimental Geral

O presente projeto está subdividido em quatro grandes partes, a saber:

Parte I: Caracterização dos modelos de estresse

O objetivo desta parte foi caracterizar, em diferentes esferas, os modelos de estresse aqui adotados (contenção e frio).

Parte II: Efeitos do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*

O objetivo desta parte foi avaliar a atividade da glândula pineal *in vivo* frente a cada tipo de estresse.

Parte III: Papel da corticosterona sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo* frente ao estresse

O objetivo desta parte foi avaliar o papel da corticosterona sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* mediante inibição farmacológica da síntese de corticosterona ou bloqueio farmacológico da ação da corticosterona por meio do uso de agentes farmacológicos específicos (metirapona e mifepristone, respectivamente) bem como mediante inibição farmacológica da síntese da citocina TNF (por talidomida).

Parte IV: Papel da estimulação alfa-adrenérgica na vigência do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*

O objetivo desta parte foi avaliar o papel da estimulação alfa-adrenérgica na vigência do estresse sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* por meio do uso de agente farmacológico específico (fenilefrina).

4.9. Formação dos Grupos Experimentais

No sentido de facilitar a compreensão das diferentes manipulações feitas aos animais, apresentar-se-á a categorização dos animais em 26 grupos usados ao longo da presente tese, a saber:

> Grupo Naive: sem qualquer manipulação experimental com eutanásia em torno das 17h00min ± 15 minutos (NAIVE Dia) e, com eutanásia em torno das 20h00min ± 15 minutos (NAIVE Noite).

> Grupo Controle: isolamento social em gaiola moradia por 30 minutos (CTRL 0.5h) ou 120 minutos (CTRL 2h). O último grupo ainda sofreu nenhuma administração de fármaco (sem notação), administração de metirapona (CTRL 2h + MET), mifepristone (CTRL 2h + MIF), talidomida (CTRL 2h + TLM) ou fenilefrina (CTRL 2h + FEN) bem como de seus respectivos veículos (CTRL 2h + V.MET; CTRL 2h + V.MIF; CTRL 2h +V.TLM; CTRL 2h +V.FEN).

> Grupo Estresse por Contenção: restrição dos movimentos em aparato específico por 30 minutos (REST 0.5h) ou 120 minutos (REST 2h). O último grupo ainda sofreu nenhuma administração de fármaco (sem notação), administração de metirapona (REST 2h + MET), mifepristone (REST 2h + MIF), talidomida (CTRL 2h + TLM) ou fenilefrina (REST 2h + FEN) bem como de seus respectivos veículos (REST 2h + V.MET; REST 2h + V.MIF; REST 2h + V.TLM; REST 2h +V.FEN).

> Grupo Estresse pelo Frio: acondicionamento em geladeira (5 ± 1 °C) por 30 minutos (COLD 0.5h) ou 120 minutos (COLD 2h). O último grupo ainda sofreu nenhuma administração de fármaco (sem notação), administração de metirapona (COLD 2h + MET), mifepristone (COLD 2h + MIF), talidomida (CTRL 2h + TLM) ou fenilefrina (COLD 2h + FEN) bem como de seus respectivos veículos (COLD 2h + V.MET; COLD 2h + V.MIF; REST 2h + V.TLM; COLD 2h +V.FEN).

Salienta-se a diferença entre os grupos naive e controle. No primeiro caso, o animal não sofreu ambientação ou qualquer manipulação além do simples transporte da gaiola moradia da sala de moradia para a sala de eutanásia. Já no grupo controle, o animal foi submetido ao mesmo processo de ambientação e manipulação experimental do grupo estressado, sem no entanto, ser acondicionado em aparato ou em geladeira.

4.10. Análise dos Dados

A variabilidade das dispersões (homocedasticidade) foi testada pelo teste de *Barllet* permitindo decidir se os dados apresentam uniformidade de distribuição. Todos nossos dados apresentaram distribuição paramétrica, então, para número de grupos experimentais igual a dois foi realizado o teste "t" de Student não-pareado e quando maiores que dois grupos foi feito a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de *Tukey-Kramer* para comparação cruzada de todos os grupos. O nível de erro α admitido foi de 5% ($p<0,05$). A análise estatística foi feita por meio do programa de computador GraphPad Prism© versão 4.00 (GraphPad Software®). O ajuste de curvas tempo-efeito foi feito utilizando o programa de ajuste não linear do GraphPad Prism©. Na oportunidade foi testado o desvio de linearidade e a aderência à equação de relação entre tempo e efeito, uma relação exponencial. Os dados foram apresentados como média e respectivos erro-padrão da média (epm). Salienta-se que erros na realização dos ensaios estatísticos foram minuciosamente averiguados ao final, seguindo as diversas recomendações apresentadas na série de artigos de Lang (2003a, 2003b, 2004, 2005a, 200b, 2005c, 2006).

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Nesta seção, após um delineamento e resultados gerais, será apresentado o delineamento de cada experimento juntamente dos seus respectivos resultados.

5.1 Delineamento Experimental Geral

No total deste trabalho foram empregados 414 ratos Wistar machos adultos divididos em 26 grupos (já apresentados em item específico) alocados de acordo com o racional de cada um dos experimentos, os quais, por sua vez, foram didaticamente agrupados em quatro grandes partes, apresentados novamente a seguir: **Parte I -** Caracterização dos modelos de estresse; **Parte II -** Efeitos do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo;* **Parte III -** Papel da corticosterona sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo* frente ao estresse; **Parte IV -** Papel da estimulação alfa-adrenérgica na vigência do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo.*

O método de avaliação consistiu da coleta e análise dos seguintes parâmetros: formação de úlceras gástricas pela promoção independente de duas modalidades de estresse (*experimento 1*), mensuração plasmática da citocina TNF após aplicação separada de duas modalidades de estresse (*experimento 2*), mensuração sérica do hormônio corticosterona após aplicação separada de duas modalidades de estresse (*experimento 3*), quantificação de N-acetilserotonina e melatonina de glândulas pineais em animais submetidos (de forma isolada) previamente a duas modalidades de estresse (*experimento 4*), quantificação de melatonina de glândulas pineais em animais submetidos (de forma isolada) previamente a duas modalidades de estresse sob bloqueio da síntese de corticosterona (*experimento 5*), quantificação de melatonina de

glândulas pineais em animais submetidos (de forma isolada) previamente a duas modalidades de estresse sob bloqueio da ação da corticosterona (*experimento 6*), quantificação de melatonina de glândulas pineais em animais submetidos (de forma isolada) previamente a duas modalidades de estresse sob bloqueio da síntese da citocina TNF (*experimento 7*) e, quantificação de melatonina de glândulas pineais em animais submetidos (de forma isolada) previamente a duas modalidades de estresse sob estimulação farmacológica alfa-adrenérgica (*experimento 8*).

5.2 Resumo Geral dos Resultados

Os resultados parciais podem ser consultados ao final de cada parte (itens: **5.3.4**, **5.4.2**, **5.5.3** e, **5.6.2**). Todos os resultados obtidos na presente estão resumidamente apresentados ao final desta seção (item **5.7**).

5.3 Delineamento - Parte I

Caracterização dos modelos de estresse

O objetivo desta parte foi caracterizar, em diferentes esferas, os modelos de estresse aqui adotados: contenção e frio.

Foram empregados, nesta parte, 254 ratos machos adultos com idade entre 84 e 119 dias divididos em nove grupos: NAIVE Dia (n=38), NAIVE Noite (n=38), CTRL 0.5h (n=12), CTRL 2h (n=12), REST 0.5h (n=31), REST 2h (n=46), COLD 0.5h (n=31) e, COLD 2h (n=46). O método de avaliação consistiu da coleta de material e posterior análise dos seguintes parâmetros: avaliação de úlceras gástricas, concentração plasmática de TNF e concentração sérica de corticosterona.

Cumpre ressaltar que, os animais submetidos ao estresse por contenção (REST) ou pelo frio (COLD) foram analisados separadamente sempre agrupados para comparação com os animais dos grupos NAIVE e/ou CTRL, assim o número de animais destes últimos grupos foram de metade do valor total demonstrado para cada agrupamento (NAIVE, CTRL e REST – NAIVE e REST ou NAIVE, CTRL e COLD – NAIVE e COLD).

5.3.1 Experimento 1

Efeitos da aplicação da contenção ou da exposição ao frio sobre a formação de úlcera gástrica

a) Delineamento

Para avaliação da formação de úlcera gástrica, foram utilizados 72 ratos Wistar, com idade de 84 a 119 dias, agrupados em nove grupos: NAIVE Dia (n=12), NAIVE Noite (n=12), CTRL 0.5h (n=12), CTRL 2h (n=12), REST 0.5h (n=6), REST 2h (n=6), COLD 0.5h (n=6) e COLD 2h (n=6). Metade dos animais foram eutanasiados imediatamente após os referidos procedimentos (isolamento social ou estresse) e a outra metade aos 360 minutos, exceto os animais naive, que nenhuma manipulação sofreram, sendo eutanasiados em mesmo horário (n=3/horário, n=3/agrupamento).

b) Resultados

A análise macroscópica tanto a olho nu como em estereoscópio não revelou alterações indicativas da presença de úlceras ou de quaisquer outras alterações patológicas nos estômagos dos ratos de todos os grupos. Isto foi criteriosamente confirmado pela análise histológica por técnica de rotina.

5.3.2 Experimento 2

Efeitos da aplicação da contenção ou da exposição ao frio sobre a concentração plasmática de TNF

a) Delineamento

Para avaliação da concentração plasmática de TNF, foram utilizados 42 ratos Wistar, com idade de 107 a 117 dias, agrupados em quatro grupos: NAIVE Dia (n=6), NAIVE Noite (n=6), REST 2h (n=15) e COLD 2h (n=15). As coletas de sangue foram realizadas nos seguintes intervalos de tempo após o estresse: 0, 10, 30, 60 e 120 minutos, exceto aos animais dos grupos NAIVE que apenas forneceram amostras nos pontos extremos do intervalo de coleta, ou seja, em horário compatível à finalização dos estresses (tempo 0 - NAIVE Dia) e 120 minutos (NAIVE Noite) após a volta dos animais submetidos aos estresses para a caixa moradia. Vale notar que o número de animais por ponto de coleta foi igual a três para cada um dos grupos.

b) Resultados

A quantificação das concentrações plasmáticas de TNF por meio da técnica de ELISA não revelou níveis detectáveis nos animais de quaisquer grupos. Sendo que o valor de detecção é de 16 pg/mL e, em certas modalidades de estresse, o rato produz esta citocina em valores em torno de 394 pg/mL (KENTNER et al., 2002), então, é correto afirmar que não houve produção desta citocina pró-inflamatória em ambas as modalidades de estresse aqui empregadas.

5.3.3 Experimento 3

Efeitos da aplicação da contenção ou da exposição ao frio sobre a concentração sérica de corticosterona

a) Delineamento

Para avaliação da concentração sérica de corticosterona, foram utilizados 140 ratos Wistar, com idade de 109 a 119 dias, agrupados em seis grupos: NAIVE Dia (n=20), NAIVE Noite (n=20), REST 0.5h (n=25) e COLD 0.5h (n=25), REST 2h (n=25) e COLD 2h (n=25). As coletas de sangue foram realizadas nos seguintes intervalos de tempo após o estresse: 0, 10, 30, 60 e 120 minutos, exceto aos animais dos grupos NAIVE que apenas forneceram amostras nos pontos extremos do intervalo de coleta, ou seja, em horário compatível à finalização dos estresses (tempo 0 - NAIVE Dia) e 120 minutos (NAIVE Noite) após a volta dos animais submetidos aos estresses para a caixa moradia. Vale notar que o número de animais por ponto de coleta foi igual a cinco para cada um dos grupos.

b) Resultados

A primeira observação importante é que o grupo NAIVE Dia (tempo 0) e NAIVE Noite (tempo 120 minutos) não apresentaram diferença entre si quando empregados como controle no ensaio com estresses por 30 minutos (p=0,7148; t=0,3924; gl=4) bem como no ensaio com estresses por 2 horas (p=0,5167; t=0,7103; gl=4). Como foi abordado na seção Materiais e Métodos e será abordado na discussão, os valores encontrados estão de acordo com os obtidos durante o período de preparo para a vigília e durante a vigília.

A concentração plasmática de corticosterona dos animais submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio mostrou que estes tipos de estresse induzem um rápido aumento da concentração de corticosterona, que volta aos níveis observados nos animais NAIVE em 120 minutos de observação. O perfil de variação de corticosterona após ambos os estresses nos dois intervalos de tempo (30 minutos ou 2 horas) segue uma equação exponencial (K=0,09188; r^2=0,7682 e gl=12 para REST 0.5h; K=0,5462; r^2=0,7349 e gl=12 para COLD 0.5h; K=0,05965; r^2=0,8234 e gl=12 para REST 2h; K=0,02912; r^2=0,7606 e gl=12 para COLD 2h).

As análises de variância revelaram diferenças estatisticamente significativas em ambos os ensaios para os valores das concentrações séricas de corticosterona (*contenção por 30 minutos:* F(6/14)=7,923; p=0,0007 e *frio por 30 minutos:* F(6/14)=8,860; p=0,0004).

Diferenças estatisticamente significativas foram reveladas pelo teste de Tukey-Kramer entre os grupos NAIVE Dia e REST 0.5h (p<0,01), NAIVE Noite e REST 0.5h (p<0,01), NAIVE Dia e COLD 0.5h (p<0,01) e, NAIVE Noite e COLD 0.5h (p<0,001) somente quando avaliados imediatamente após o estresse (tempo 0).

Sendo os efeitos do estresse por contenção e pelo frio ambos por 30 minutos ocorrerem de modo semelhante sob os níveis de corticosterona (curva de decaimento com valores diferentemente significativos imediatamente após os estresses) a comparação entre os mesmos se justifica. O teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 0.5h e COLD 0.5h em todos os pontos da curva, especificando: imediatamente após o estresse (p=0,3659; t=1,019; gl=4), aos 10 minutos (p=0,2324; t=1,406 gl=4), aos 30 minutos (p=0,1582; t=1,733;

gl=4), aos 60 minutos (p=0,6631; t=0,4695; gl=4) e, aos 120 minutos (p=0,9285; t=0,09551; gl=4). Convém lembrar que, os grupos NAIVE Dia e NAIVE Noite não apresentaram diferenças (p=0,7148; t=0,3924; gl=4), conforme já explanado.

A **Figura 4** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio, ambos por 30 minutos, sobre os níveis plasmáticos de corticosterona em diferentes intervalos de tempo após encerramento dos mesmos.

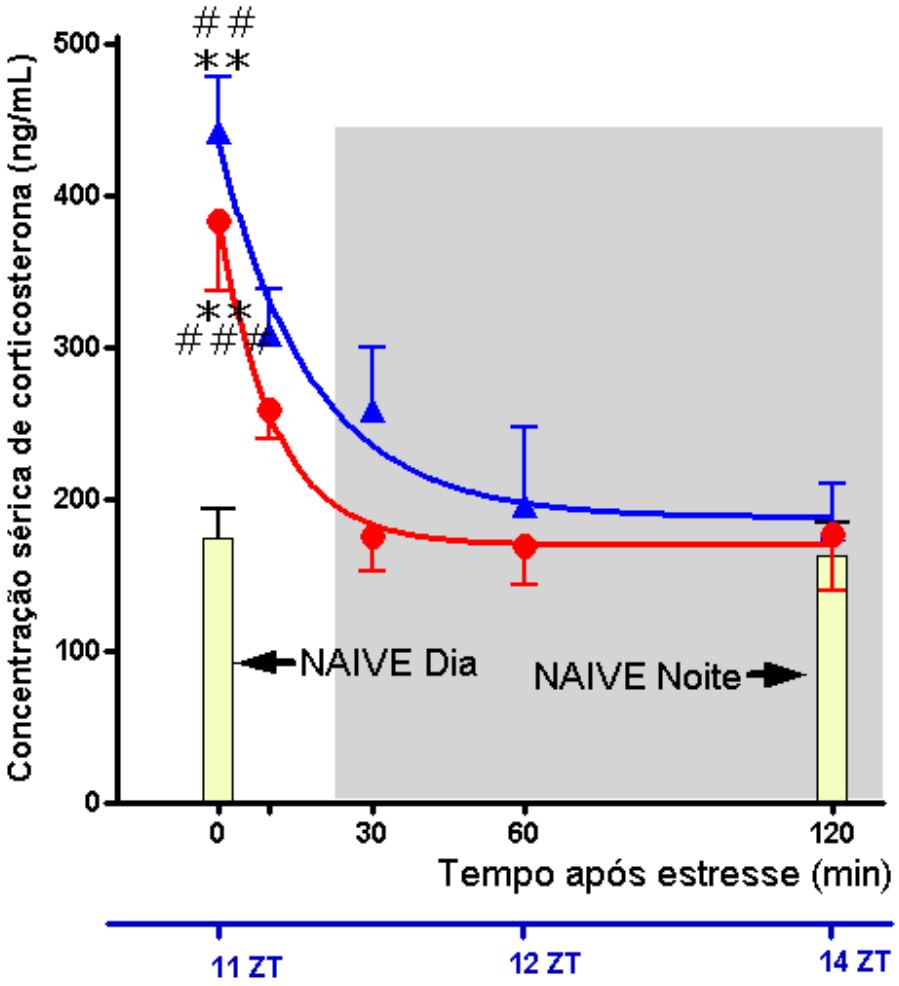

Figura 4. Curva temporal da concentração sérica de corticosterona de ratos submetidos a aplicação de contenção ou a exposição ao frio por 30 minutos. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer. Os círculos representam animais do grupo REST 0.5h. Os triângulos representam animais do grupo COLD 0.5h.

(**):p<0,01, em relação ao grupo NAIVE Dia
(##): p<0,01; (###): p<0,001, em relação ao grupo NAIVE Noite

As análises de variância revelaram diferenças estatisticamente significativas em ambos os ensaios para os valores das concentrações séricas de corticosterona (*contenção por 2 horas:* F(6/14)=10,484; p=0,0002 e *frio por 2 horas:* F(6/11)=7,296; p=0,0025).

Diferenças estatisticamente significativas foram reveladas pelo teste de Tukey-Kramer entre os grupos NAIVE Dia e REST 2h (p<0,01), NAIVE Noite e REST 2h (p<0,001), NAIVE Dia e COLD 2h (p<0,01) e, NAIVE Noite e COLD 2h (p<0,001) quando avaliados imediatamente após o estresse (tempo 0); diferença estatisticamente significativa se manteve até 10 minutos após finalizada a sessão de estresse entre NAIVE Dia e REST 2h (p<0,05), NAIVE Noite e REST 2h (p<0,05) bem como entre NAIVE Dia e COLD 2h (p<0,05) e, NAIVE Noite e COLD 2h (p<0,01).

Sendo os efeitos do estresse por contenção e pelo frio ocorrerem de modo semelhante sob os níveis de corticosterona (curva de decaimento com valores diferentemente significativos até 10 minutos) a comparação entre os mesmos se justifica. O teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 2h e COLD 2h em todos os pontos da curva, especificando: imediatamente após o estresse (p=0,4243; t=0,8889; gl=4), aos 10 minutos (p=0,2242; t=1,4370; gl=4), aos 30 minutos (p=0,0766; t=2,3720; gl=4), aos 60 minutos (p=0,2034; t=1,5190; gl=4) e, aos 120 minutos (p=0,7804; t=0,2982; gl=4). Convém lembrar que, os grupos NAIVE Dia e NAIVE Noite não apresentaram diferenças (p=0,5167; t=0,7103; gl=4), conforme já explanado.

A **Figura 5** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio, ambos por 2 horas, sobre os níveis plasmáticos de corticosterona em diferentes intervalos de tempo após encerramento dos mesmos.

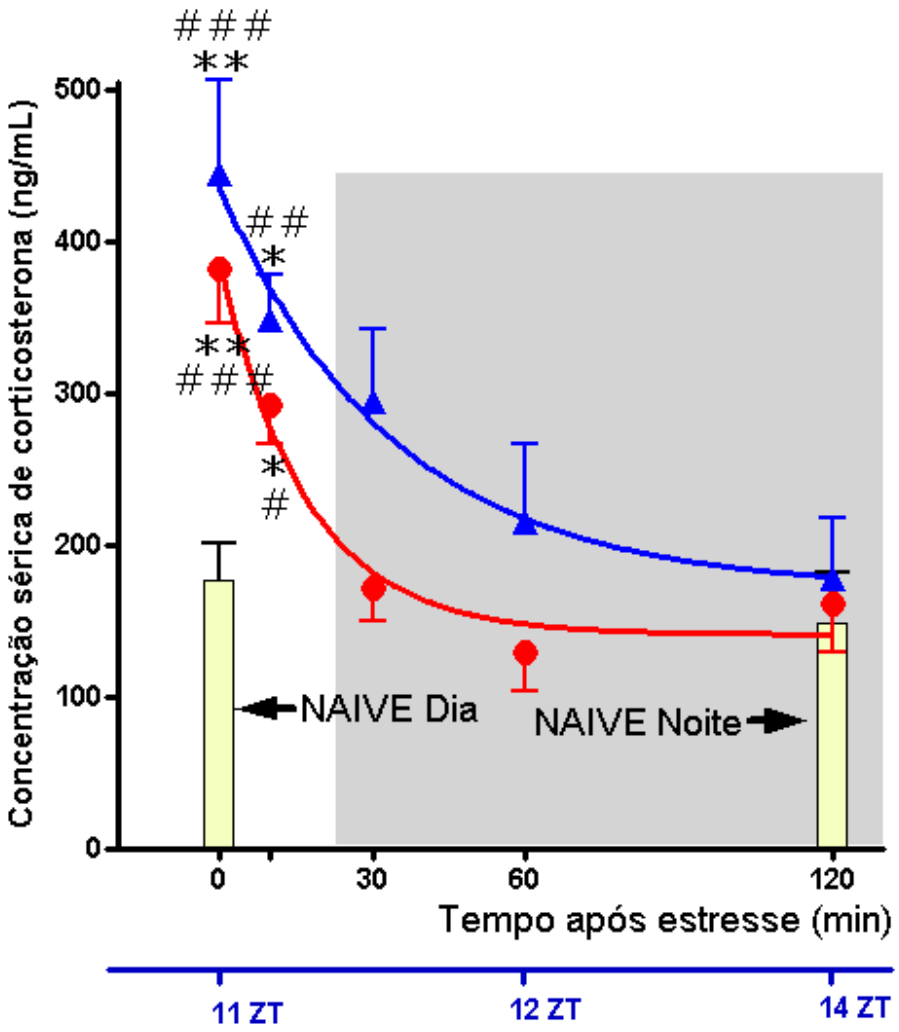

Figura 5. Curva temporal da concentração sérica de corticosterona de ratos submetidos a aplicação de contenção ou a exposição ao frio por duas horas. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer. Os círculos representam animais do grupo REST 0.5h. Os triângulos representam animais do grupo COLD 0.5h.

(*):p<0,05; (**):p<0,01, em relação ao grupo NAIVE Dia
(#):p<0,05; (##): p<0,01; (###): p<0,001, em relação ao grupo NAIVE Noite

Os efeitos do estresse por contenção e pelo frio sob os níveis de corticosterona são diferentes, sendo que a curva de decaimento apresenta valores diferentemente significativos observados somente imediatamente após ambos os estresses por 30 minutos, diferentemente, observados até 10 minutos após ambos os estresses por 2 horas. Desta forma, uma comparação mais detalhada é interessante. O teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 0.5h e REST 2h em todos os pontos da curva, especificando: imediatamente após o estresse (p=0,9861; t=0,01857; gl=4), aos 10 minutos (p=0,3657; t=1,019; gl=4), aos 30 minutos (p=0,9125; t=0,1170; gl=4), aos 60 minutos (p=0,3236; t=1,125; gl=4) e, aos 120 minutos (p=0,7819; t=0,2960; gl=4). Noutra comparação, o teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: COLD 0.5h e COLD 2h em todos os pontos da curva, especificando: imediatamente após o estresse (p=0,9770; t=0,03069; gl=4), aos 10 minutos (p=0,3855; t=0,9734; gl=4), aos 30 minutos (p=0,6043; t=0,5616; gl=4), aos 60 minutos (p=0,8000; t=0,2707; gl=4) e, aos 120 minutos (p=0,9503; t=0,06639; gl=4).

5.3.4 Resumo dos Resultados - Parte I

Nesta primeira parte, foram caracterizados os modelos de estresse (contenção e frio) nas seguintes esferas: patológica, imunológica e endócrina.

Na esfera patológica, ambas as modalidades de estresse em nenhum dos intervalos de tempo aqui usados (30 ou 120 minutos) promoveram a formação de úlceras gástricas. Já na esfera imunológica, não foram encontradas concentrações plasmáticas de TNF em quaisquer dos grupos. Quanto à caracterização dos estresses na esfera endócrina, a quantificação da concentração sérica de corticosterona avaliada em diferentes intervalos de tempo após o estresse por contenção ou pelo frio por 30 minutos ou 2 horas (0, 10, 30, 60 e 120 minutos após a finalização do mesmo) revelou que estes promoveram aumento pronunciado de corticosterona, o qual seguiu uma curva exponencial de decaimento atingindo valores iguais aos dos animais não estressados (NAIVE) após 10 minutos do término da aplicação da contenção ou da exposição ao frio por 30 minutos e após 30 minutos quando estes estresses por 2 horas, sendo que os grupos NAIVE não apresentaram diferenças.

Ambos os estresses aqui empregados são categorizados diferentemente (conforme apresentado na Revisão de Literatura), sendo o estresse por contenção como modelo de natureza psicológica e o estresse pelo frio como modelo de natureza física, inclusive com neurocircuitárias bem diferenciadas ao núcleo paraventricular. Todavia, pelos parâmetros aqui analisados, na presente caracterização (Parte I), não existiram diferenças que seriam diretamente importantes para o presente trabalho.

5.4 Delineamento - Parte II

Efeitos do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*

O objetivo desta parte foi avaliar a atividade da glândula pineal *in vivo* frente a cada modalidade de estresse.

Foram empregados, nesta parte, 40 ratos machos adultos com idade entre 93 e 110 dias divididos em seis grupos: CTRL 0.5h (n=10), CTRL 2h (n=10), REST 0.5h (n=5), REST 2h (n=5), COLD 0.5h (n=5) e COLD 2h (n=5). O método de avaliação consistiu da coleta e posterior análise dos seguintes parâmetros: conteúdo de N-acetilserotonina (NAS) e conteúdo de melatonina (MEL) obtidos de glândulas pineais extraídas no meio do período de escuro (6 a 8 horas após o apagar das luzes, ZT18-ZT20).

Cumpre ressaltar que, os animais submetidos ao estresse por contenção (REST) ou pelo frio (COLD) foram analisados separadamente sempre agrupados para comparação com os animais do grupo CTRL, ou seja, os controles não eram os mesmos. Assim, o número de animais do grupo CTRL foi de metade do valor total demonstrado para cada ensaio experimental, estresse por contenção (CTRL e REST) e estresse pelo frio (CTRL e COLD).

5.4.1 Experimento 4

Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio sobre a síntese *in vivo* de N-acetilserotonina e melatonina pela glândula pineal

a) Delineamento

Para avaliação dos conteúdos de N-acetilserotonina e melatonina da glândula pineal, foram utilizados 40 ratos Wistar, com idade de 93 a 110 dias, agrupados em seis grupos: CTRL 0.5h (n=10), CTRL 2h (n=10), REST 0.5h (n=5), REST 2h (n=5), COLD 0.5h (n=5) e COLD 2h (n=5). As coletas das pineais foram realizadas entre 00h30min e 01h30min (ZT18-ZT20).

b) Resultados

As análises de variância não revelaram diferenças estatisticamente significativas dos grupos comparados para os valores de N-acetilserotonina da glândula pineal *in vivo* tanto nos ensaios do estresse por contenção ($F(3/12)=0,3425$; $p=0,7952$) como do estresse pelo frio ($F(3/12)=0,2636$; $p=0,8503$). Diferentemente, o conteúdo de melatonina apresentou diferenças entre os grupos comparados para ambos os ensaios (*contenção:* $F(3/13)=9,379$; $p=0,0014$ - *frio:* $F(3/12)=13,416$; $p=0,004$).

Com relação ao conteúdo de melatonina da glândula pineal *in vivo*, o teste de Tukey-Kramer revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos: CTRL 0.5h e REST 2h ($p<0,01$), CTRL 2h e REST 2h ($p<0,05$), REST 0.5h e REST 2h ($p<0,05$), CTRL 0.5h e COLD 2h ($p<0,001$), CTRL 2h e COLD 2h ($p<0,01$) e, COLD 0.5h e COLD 2h ($p<0,05$). Ainda, a regressão linear mostrou que o conteúdo de melatonina dobrou de modo significativo estatisticamente REST 0.5h para REST 2h

(p=0,0333; r^2=0,4995; F=6,982) enquanto nenhuma regressão no tempo foi detectada para os animais controle - CTRL (p=0,1619; r^2=0,2977; F=2,544). De maneira semelhante, o conteúdo de MEL aumentou 1,8 vezes de COLD 0.5h para COLD 2.0h (p=0,00225; r^2=0,6077; F=9,295), sendo que novamente não houve regressão para os animais controle (p=0,1879; r^2=0,2690; F=2,208).

Sendo os efeitos do estresse por contenção e pelo frio ocorrerem na mesma direção sob o funcionamento da glândula pineal (aumento do conteúdo de melatonina) a comparação entre os mesmos se justifica. O teste "t" não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 0.5h e COLD 0.5h (p=0,6425; t=0,4849; gl=7) bem como REST 2h e COLD 2h (p=0,2490; t=1,276; gl=6). Vale destacar que os grupos controles (CTRL) quando devidamente comparados não apresentaram diferenças, especificando: CTRL 0.5h do ensaio de estresse por contenção e CTRL 0.5h do ensaio de estresse pelo frio (p=0,7029; t=0,4001; gl=6) bem como CTRL 2h do ensaio de estresse por contenção e CTRL 2h do ensaio de estresse pelo frio (p=0,9088; t=0,1195; gl=6).

A **Figura 6** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio sobre o conteúdo de N-acetilserotonina (NAS) e de melatonina (MEL) da glândula pineal *in vivo*.

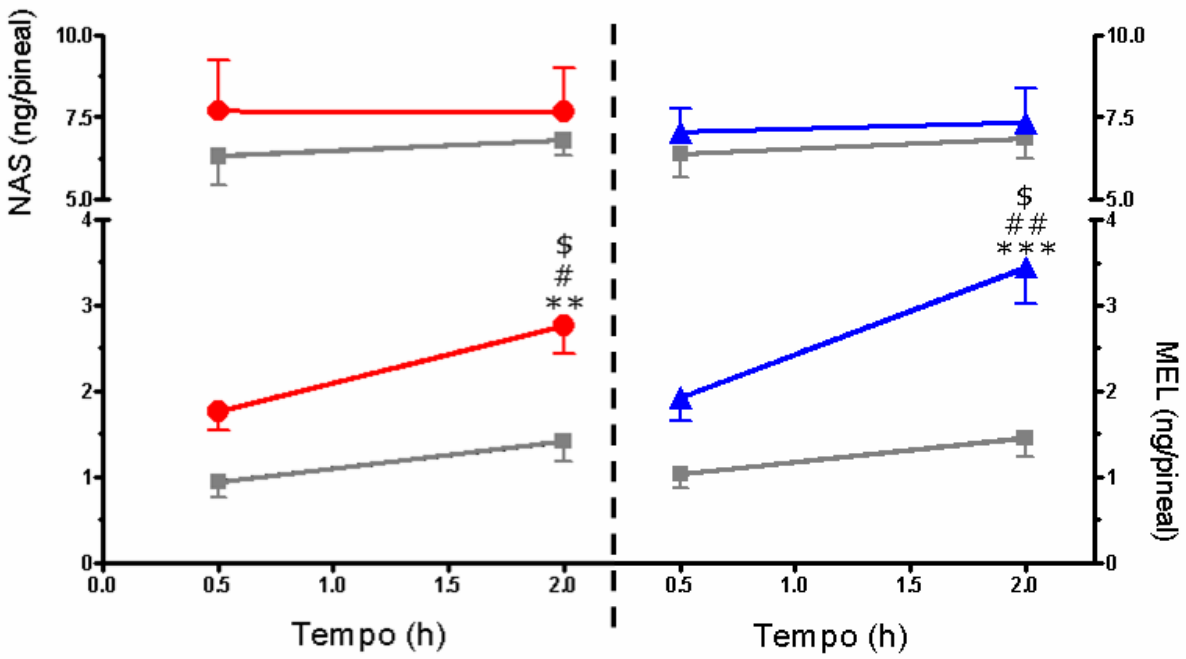

Figura 6. Conteúdo de N-acetilserotonina (NAS) e de melatonina (MEL) da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer. Os círculos representam animais do grupo REST. Os triângulos representam animais do grupo COLD. Os quadrados representam animais do grupo CTRL.

(**):p<0,01; (***):p<0,001, em relação ao respectivo grupo CTRL 0.5h
(#):p<0,05; (##): p<0,01, em relação ao respectivo grupo CTRL 2h
($):p<0,05, em relação ao grupo REST 0.5h ou COLD 0.5h

5.4.2 Resumo dos Resultados - Parte II

Nesta segunda parte foram avaliados os efeitos de ambas as modalidades de estresse sobre a atividade da glândula pineal *in vivo*.

As quantificações dos conteúdos de N-acetilserotonina (NAS) e de melatonina (MEL) em pineais revelaram que somente em duas horas do estresse por contenção ou pelo frio houve aumentos significativos da produção de melatonina, sem diferenças nos níveis do precursor N-acetilserotonina. Somado a isto, estes efeitos sobre a glândula pineal foram indistintos sob a modalidade de estresse, visto que houve inexistência de diferenças entre cada modalidade de estresse em ambos intervalos de tempo (30 minutos ou duas horas).

5.5 Delineamento - Parte III

Papel da corticosterona sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo* frente ao estresse

O objetivo desta parte foi avaliar o papel da corticosterona sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* mediante inibição farmacológica da síntese de corticosterona ou bloqueio farmacológico da ação da corticosterona por meio do uso de agentes farmacológicos específicos (metirapona e mifepristone, respectivamente). Complementarmente, verificar o papel da corticosterona sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* sem a presença de níveis cerebrais de TNF mediante inibição farmacológica de sua síntese (por talidomida).

Foram empregados, nesta parte, 90 ratos machos adultos com idade entre 95 e 105 dias divididos em 18 grupos: CTRL 2h + V.MET (n=5), CTRL 2h + MET (n=5), REST 2h + V.MET (n=5), REST 2h + MET (n=5), COLD 2h + V.MET (n=5), COLD 2h + MET (n=5), CTRL 2h + V.MIF (n=5), CTRL 2h + MIF (n=5), REST 2h + V.MIF (n=5), REST 2h + MIF (n=5), COLD 2h + V.MIF (n=5), REST 2h + MIF (n=5), CTRL 2h + V.TLM (n=5), CTRL 2h + TLM (n=5), REST 2h + V.TLM (n=5), REST 2h + TLM (n=5), COLD 2h + V.TLM (n=5), REST 2h + TLM (n=5). Lembra-se que aos animais em que foi administrado veículo este era específico a cada droga como apresentado na seção Materiais e Métodos. O método de avaliação consistiu da coleta e posterior análise do seguinte parâmetro: conteúdo de melatonina de glândulas pineais retiradas no meio do período de escuro (6 a 8 horas após o apagar das luzes, ZT18-ZT20).

5.5.1 Experimento 5

Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com metirapona sobre a síntese de melatonina da glândula pineal in vivo

a) Delineamento

Para avaliação do conteúdo de melatonina da glândula pineal, foram utilizados 30 ratos Wistar, com idade de 95 a 104 dias, agrupados em seis grupos: CTRL 2h + V.MET (n=5), CTRL 2h + MET (n=5), REST 2h + V.MET (n=5), REST 2h + MET (n=5), COLD 2h + V.MET (n=5) e, COLD 2h + MET (n=5). A solução de metirapona foi administrada subcutaneamente na dose de 200 mg/kg duas horas antes da promoção de cada um dos estresses, em mesmo intervalo foi administrado veículo específico.

b) Resultados

As análises de variância revelaram diferenças estatisticamente significativas dos grupos comparados para os valores de melatonina da glândula pineal *in vivo* ($F(5/18)=14,042$; $p=0,0001$). Ainda, o teste de Tukey-Kramer revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com veículo, a saber: CTRL 2h + V.MET e REST 2h + V.MET ($p<0.05$), CTRL 2h + V.MET e COLD 2h + V.MET ($p<0.01$). Então, a administração de veículo não modificou as diferenças promovidas pelo estresse, que já tinham sido mostradas anteriormente (*Experimento 4*). E também, houve diferenças dos animais controle tratados com metirapona em relação aos estressados tratados com veículo: CTRL 2h + MET e REST 2h + V.MET ($p<0.01$) e, CTRL 2h + MET e COLD 2h + V.MET ($p<0.001$). Desta forma, o tratamento com

metirapona foi efetivo em inibir a síntese de corticosterona nos animais isolados socialmente (controle), assim, promovendo ampliação das diferenças estatísticas em relação aos animais estressados (contenção ou frio).

Além disto, diferenças entre os animais estressados tratados com veículo e metirapona existiram, sendo: REST 2h + V.MET e REST 2h + MET ($p<0.01$) e, COLD 2h + V.MET e COLD 2h + MET ($p<0.001$). Portanto, o protocolo de administração de metirapona foi efetivo em inibir a síntese de corticosterona mesmo quando da aplicação dos estresses, assim, o causante dos efeitos dos estresses sobre a glândula pineal fica evidenciado.

Diferentemente, o teste de Tukey-Kramer revelou a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os animais controle tratados e não com metirapona (CTRL 2h + V.MET e CTRL 2h + MET), controle tratados com metirapona e os estressados (CTRL 2h + MET e REST 2h + MET, CTRL 2h + MET e COLD 2h + MET) bem como dos animais estressados tratados ou não com metirapona (REST 2h + V.MET e COLD 2h + V.MET e, REST 2h + MET e COLD 2h + MET).

A reiterada inexistência de diferenças dos efeitos do estresse por contenção e pelo frio sob o funcionamento da glândula pineal mesmo quando da administração de veículo justifica novamente uma comparação estatística mais apurada. Neste sentido, o teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 2h + V.MET e COLD 2h + V.MET ($p=0,5034$; $t=0,7117$; $gl=6$) e, REST 2h + MET e COLD 2h + MET ($p=0,7213$; $t=0,3740$; $gl=6$). Portanto, ambos os estresses simplesmente (sem qualquer manipulação farmacológica) ou ambos os estresses sob inibição da síntese de corticosterona são idênticos nos efeitos sobre a glândula pineal. Cumpre notar que, os grupos controles (tratado ou não com metirapona) não

apresentaram diferenças (p=0,1601; t=1,603; gl=6).

A **Figura 7** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com metirapona sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*.

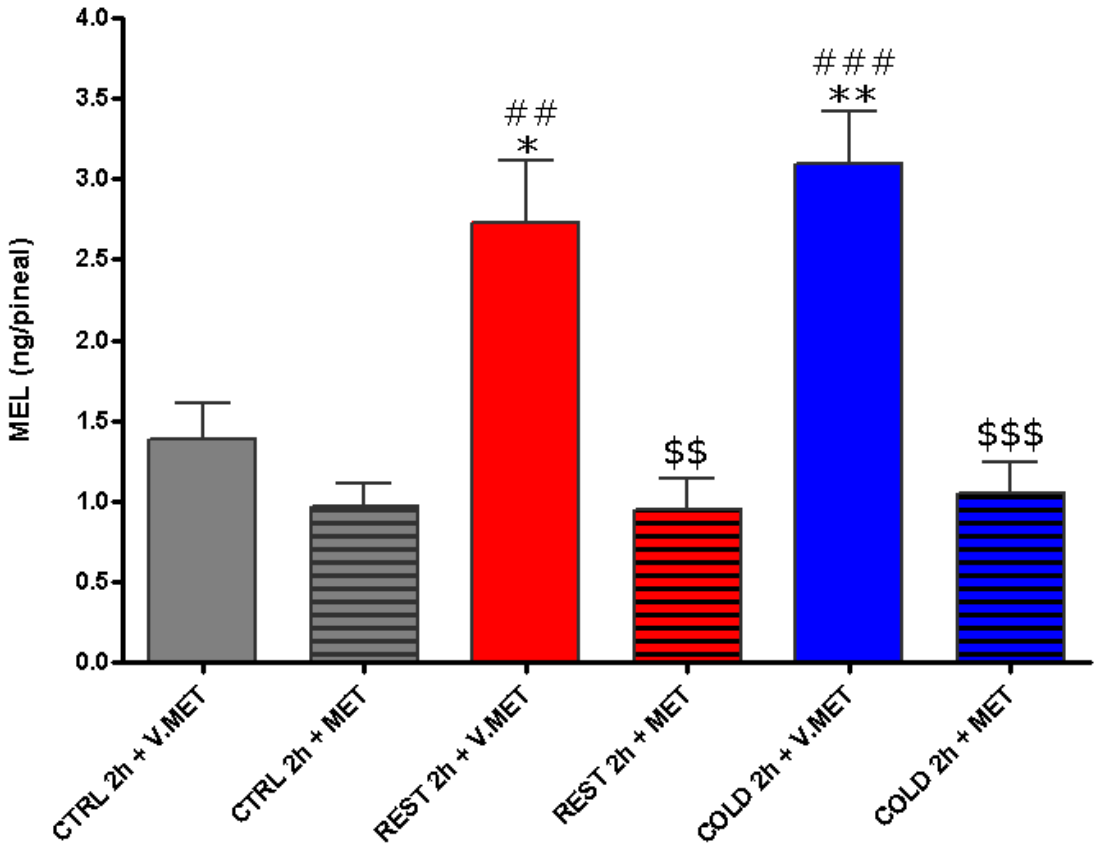

Figura 7. Conteúdo de melatonina (MEL) da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados previamente com metirapona. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer.

(*):p<0,05; (**):p<0,01, em relação ao grupo CTRL 2h + V.MET
(##):p<0,01; (###): p<0,001, em relação ao grupo CTRL 2h + MET
($$):p<0,01; ($$$):p<0,001, em relação ao grupo REST 2h + V.MET ou COLD 2h + V.MET

5.5.2 Experimento 6

Efeitos do estresse por contenção e pelo frio mediante tratamento prévio com mifepristone sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*

a) Delineamento

Para avaliação do conteúdo de melatonina da glândula pineal, foram utilizados 30 ratos Wistar, com idade de 96 a 105 dias, agrupados em seis grupos: CTRL 2h + V.MIF (n=5), CTRL 2h + MIF (n=5), REST 2h + V.MIF (n=5), REST 2h + MIF (n=5), COLD 2h + V.MIF (n=5) e, COLD 2h + MIF (n=5). A solução de mifepristone foi administrada subcutaneamente na dose de 50 mg/kg uma hora antes da promoção de cada um dos estresses, em mesmo intervalo foi administrado veículo específico.

b) Resultados

As análises de variância revelaram diferenças estatisticamente significativas dos grupos comparados para os valores de melatonina da glândula pineal *in vivo* ($F(5/18)=8,158$; $p=0,0004$). Ainda, o teste de Tukey-Kramer revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com veículo, a saber: CTRL 2h + V.MIF e REST 2h + V.MIF ($p<0.05$), CTRL 2h + V.MIF e COLD 2h + V.MIF ($p<0.01$). Novamente, a administração de veículo não modificou as diferenças promovidas pelo estresse, que já tinham sido mostradas anteriormente (*Experimento 4 e Experimento 5*). E também, houve diferenças dos animais controle tratados com mifepristone em relação aos estressados tratados com veículo: CTRL 2h + MIF e REST 2h + V.MIF ($p<0.05$) e, CTRL 2h + MIF e COLD 2h + V.MIF ($p<0,01$).

Além disto, diferenças entre os animais estressados tratados com veículo e mifepristone existiram, sendo: REST 2h + V.MIF e REST 2h + MIF ($p<0.05$) e, COLD 2h + V.MIF e COLD 2h + MIF ($p<0,01$). Portanto, o protocolo de administração de mifepristone foi efetivo em inibir a ação da corticosterona mesmo quando da aplicação dos estresses, assim, novamente o causante dos efeitos dos estresses sobre a glândula pineal fica evidenciado.

Diferentemente, o teste de Tukey-Kramer revelou a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre os animais controle tratados e não tratados com mifepristone (CTRL 2h + V.MIF e CTRL 2h + MIF), controle e estressados tratados com mifepristone (CTRL 2h + MIF e REST 2h + MIF, CTRL 2h + MIF e COLD 2h + MIF) bem como dos animais estressados tratados ou não com mifepristone (REST 2h + V. MIF e COLD 2h + V. MIF e, REST 2h + MIF e COLD 2h + MIF).

Novamente, foi encontrada inexistência de diferenças dos efeitos do estresse por contenção e pelo frio sob o funcionamento da glândula pineal mesmo quando da administração de veículo, então uma comparação estatística mais apurada se justifica. Assim, o teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 2h + V.MIF e COLD 2h + V.MIF ($p=0,7288$; $t=0,3633$; $gl=6$) e, REST 2h + MIF e COLD 2h + MIF ($p=0,3401$; $t=1,036$; $gl=6$). Portanto, ambos os estresses simplesmente (sem qualquer manipulação farmacológica) ou ambos os estresses sob bloqueio da ação corticosterona (tratamento com mifepristone) são idênticos nos efeitos sobre a glândula pineal. É importante ressaltar que, os grupos controles (tratado ou não com mifepristone) não apresentaram diferenças ($p=0,9517$; $t=0,06319$; $gl=6$).

A **Figura 8** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com mifepristone sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*.

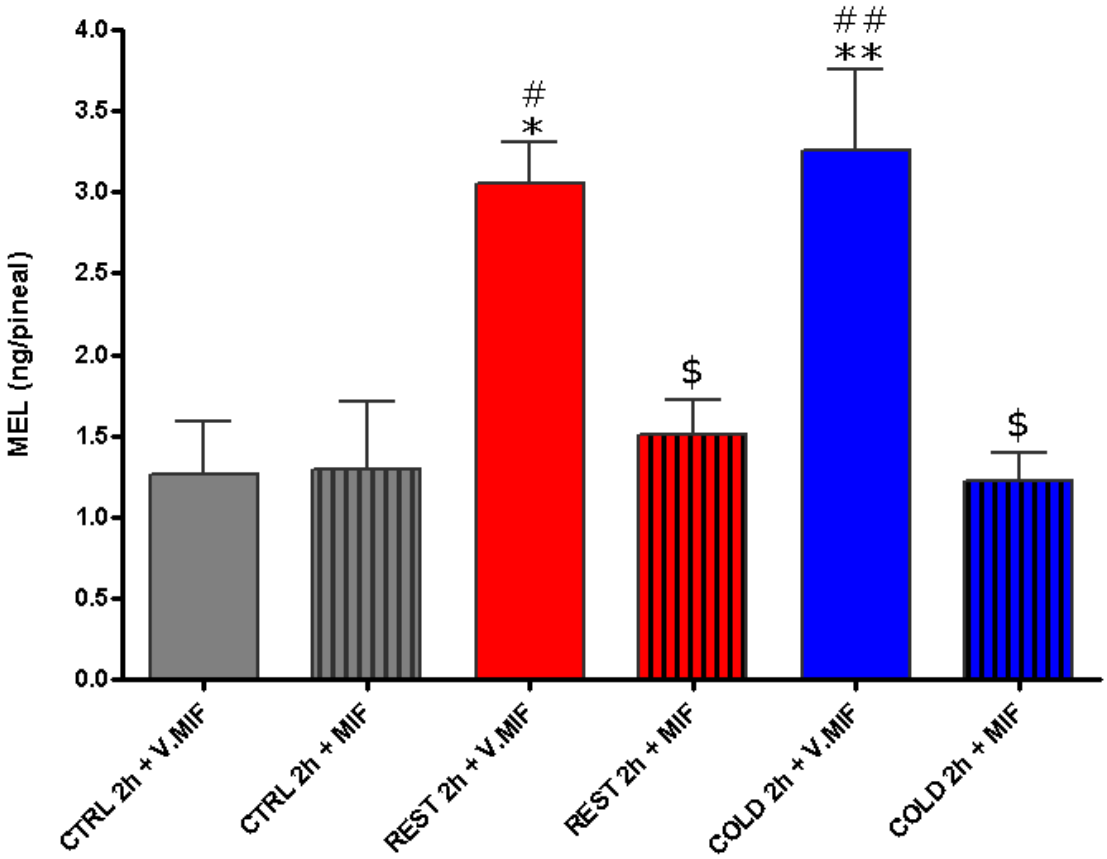

Figura 8. Conteúdo de melatonina (MEL) da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados previamente com mifepristone. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer.

(*):p<0,05; (**):p<0,01, em relação ao grupo CTRL 2h + V.MIF
(#):p<0,05; (##): p<0,01, em relação ao respectivo grupo CTRL 2h + MIF
($):p<0,05, em relação ao grupo REST 2h + V.MIF ou COLD 2h + V.MIF

5.5.3 Experimento 7

Efeitos do estresse por contenção e pelo frio mediante tratamento prévio com talidomida sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*

a) Delineamento

Para avaliação do conteúdo de melatonina da glândula pineal, foram utilizados 30 ratos Wistar, com idade de 95 a 105 dias, agrupados em seis grupos: CTRL 2h + V.TLM (n=5), CTRL 2h + TLM (n=5), REST 2h + V. TLM (n=5), REST 2h + TLM (n=5), COLD 2h + V. TLM (n=5) e, COLD 2h + TLM (n=5). A solução de talidomida foi administrada por gavage na dose de 50 mg/kg uma hora antes da promoção de cada um dos estresses, em mesmo intervalo foi administrado veículo específico.

b) Resultados

As análises de variância revelaram diferenças estatisticamente significativas dos grupos comparados para os valores de melatonina da glândula pineal *in vivo* ($F(5/18)=8,839$; $p=0,0002$). Ainda, o teste de Tukey-Kramer revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com veículo, a saber: CTRL 2h + V.TLM e REST 2h + V.TLM ($p<0,05$), CTRL 2h + V.TLM e COLD 2h + V.TLM ($p<0,05$). Novamente, a administração de veículo não modificou as diferenças promovidas pelo estresse, que já tinham sido mostradas anteriormente (*Experimentos 4, 5 e 6*). E também, houve diferenças dos animais controle tratados com talidomida em relação aos estressados tratados com veículo: CTRL 2h + TLM e REST 2h + V.TLM ($p<0,05$) e, CTRL 2h + TLM e COLD 2h + V.TLM ($p<0,05$).

Além disto, indiferenças entre os animais estressados tratados com veículo e talidomida exisitiram. Portanto, o protocolo de administração de talidomida não interferiu nos efeitos dos estresses sobre a glândula pineal.

Novamente, foi encontrada inexistência de diferenças dos efeitos do estresse por contenção e pelo frio sob o funcionamento da glândula pineal mesmo quando da administração de veículo, então uma comparação estatística mais apurada se justifica. Assim, o teste “t” não-pareado mostrou a inexistência de diferenças entre os grupos: REST 2h + V.TLM e COLD 2h + V.TLM (p=0,9011; t=0,1296; gl=6) e, REST 2h + TLM e COLD 2h + TLM (p=0,7626; t=0,3162; gl=6). Portanto, ambos os estresses simplesmente (sem qualquer manipulação farmacológica) ou ambos os estresses sem a presença da citocina TNF em quaisquer compartimentos (tratamento com talidomida) são idênticos nos efeitos sobre a glândula pineal. É importante ressaltar que, os grupos controles (tratado ou não com talidomida) não apresentaram diferenças (p=0,9770; t=0,03; gl=6).

A **Figura 9** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com talidomida sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*.

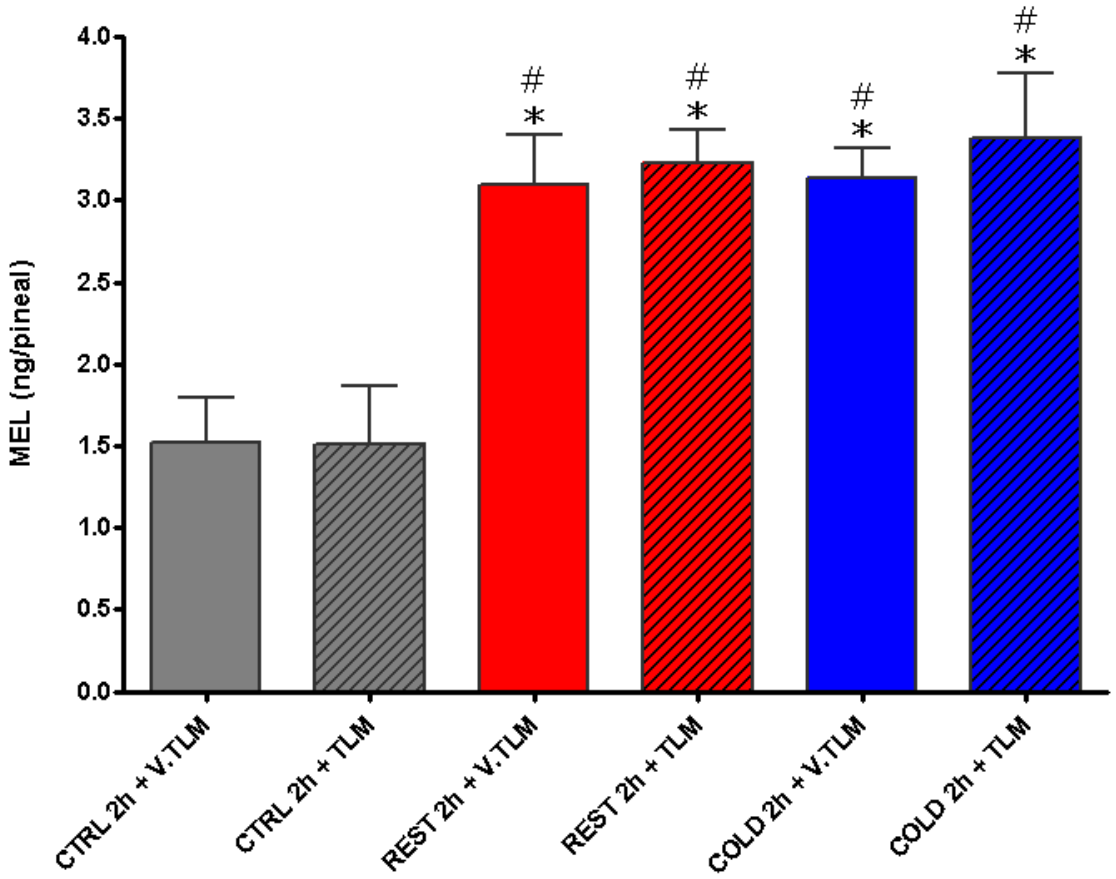

Figura 9. Conteúdo de melatonina (MEL) da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados previamente com talidomida. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer.

(*):p<0,05, em relação ao grupo CTRL 2h + V.TLM
(#):p<0,05, em relação ao grupo CTRL 2h + TLM

5.5.4 Resumo dos Resultados - Parte III

Nesta terceira parte foi avaliado o papel da corticosterona sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* mediante inibição farmacológica da síntese de corticosterona ou bloqueio farmacológico da ação da corticosterona por meio do uso de agentes farmacológicos específicos (metirapona e mifepristone, respectivamente).

A quantificação do conteúdo de melatonina (MEL) em pineais revelou que ambos os estresses, estresse por contenção ou pelo frio, por duas horas são capazes de promover aumentos significativos da produção de melatonina. Adicionalmente, este efeito sobre a glândula pineal foi independente da modalidade de estresse, o que foi reforçado sobre cada uma das manipulações farmacológicas, as quais mantiveram estas diferenças.

De forma interessante, o tratamento com veículo específico em cada experimento aos animais controle não promoveram diferenças nos efeitos sob a glândula ($p=0,7613$, $t=0,3180$; $gl=6$). Da mesma forma, o tratamento de veículo específico aos animais estressados não promoveram diferenças (REST 2h + V.MET e REST 2h + V.MIF: $p=0,5089$, $t=0,7022$, $gl=6$; COLD 2h + V.MET e COLD 2h + V.MIF: $p=0,7899$, $t=0,2786$, $gl=6$). Portanto, o veículo foi inerte tanto nos efeitos fisiológicos da administração como nos efeitos farmacológicos de ação.

Curiosamente, o tratamento prévio ao estresse com metirapona ou mifepristone aboliu igualmente os efeitos sob a glândula (REST 2h + MET e REST 2h MIF: $p=0,0958$, $t=1,974$, $gl=6$; COLD 2h + MET e COLD 2h + MIF: $p=0,52$, $t=0,6831$, $gl=6$). Portanto, os agentes farmacológicos foram indistintos em abolir os efeitos de ambos os estresses em aumentar significativamente o conteúdo de melatonina da glândula pineal.

Ainda, foi observado que o tratamento com talidomida para abolir (eventuais) níveis cerebrais de TNF não modificou os efeitos de ambos os estresses, que poderiam estar sendo diminuídos pela ação da corticosterona junto da citocina TNF.

5.6 Delineamento - Parte IV

Papel da estimulação alfa-adrenérgica na vigência do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*

O objetivo desta parte foi avaliar o papel da estimulação α-adrenérgica na vigência do estresse sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* por meio do uso de agente farmacológico específico (fenilefrina).

Foram empregados, nesta parte, 30 ratos machos adultos com idade entre 98 e 104 dias divididos em seis grupos: CTRL 2h + V.FEN (n=5), CTRL 2h + FEN (n=5), REST 2h + V. FEN (n=5), REST 2h + FEN (n=5), COLD 2h + V. FEN (n=5) e, COLD 2h + FEN (n=5). O método de avaliação consistiu da coleta e posterior análise do seguinte parâmetro: conteúdo de melatonina de glândulas pineais retiradas no meio do período de escuro (6 a 8 horas após o apagar das luzes, ZT18-ZT20).

5.6.1 Experimento 8

Efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento conseguinte com fenilefrina sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*

a) Delineamento

Para avaliação do conteúdo de melatonina da glândula pineal, foram utilizados 30 ratos Wistar, com idade de 98 a 104 dias, agrupados em seis grupos: CTRL 2h + V.FEN (n=5), CTRL 2h + FEN (n=5), REST 2h + V.FEN (n=5), REST 2h + FEN (n=5), COLD 2h + V.FEN (n=5) e, COLD 2h + FEN (n=5). A solução de fenilefrina foi administrada intraperitonialmente na dose de 0,4 mg/kg imediatamente após o término de cada um dos estresses, em mesmo intervalo foi administrado veículo específico.

b) Resultados

As análises de variância revelaram diferenças estatisticamente significativas dos grupos comparados para os valores de melatonina da glândula pineal *in vivo* ($F(5/18)=3,781$; $p=0,0162$). Ainda, o teste de Tukey-Kramer revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com veículo, a saber: CTRL 2h + V.FEN e REST 2h + V.FEN ($p<0,05$), CTRL 2h + V.FEN e COLD 2h + V.FEN ($p<0,05$). Não havendo diferenças entre os animais controle tratados com veículo e com fenilefrina ($p=0,7799$; $t=0,2923$; $gl=6$), as diferenças dos animais controle tratados com fenilefrina em relação aos estressados tratados com veículo existiram, como indicado: CTRL 2h + FEN e REST 2h + V.FEN ($p<0.05$) e, CTRL 2h + FEN e COLD 2h + V.FEN ($p<0,05$). Contudo, diferenças entre os animais

estressados tratados com veículo e fenilefrina foram inexistentes. Portanto, o protocolo de administração de fenilefrina não modificou o aumento de melatonina promovido por ambos estresses.

A **Figura 10** ilustra os efeitos do estresse por contenção ou pelo frio mediante tratamento prévio com mifepristone sobre a síntese de melatonina da glândula pineal *in vivo*.

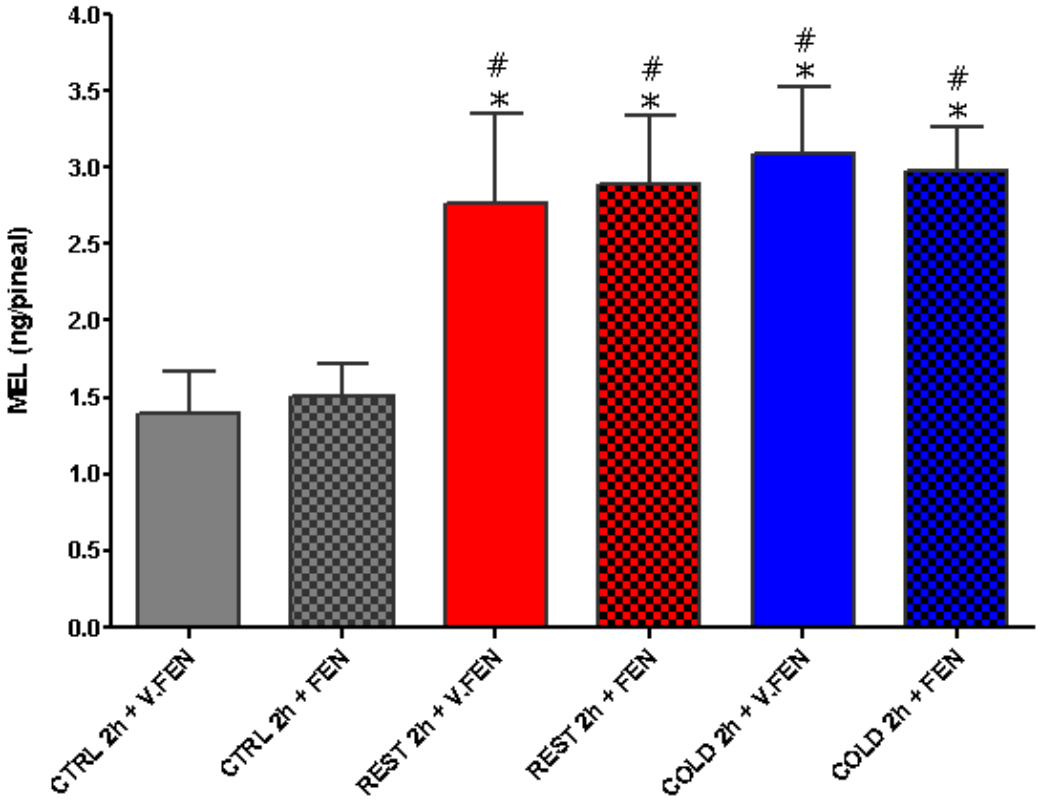

Figura 10. Conteúdo de melatonina (MEL) da glândula pineal de ratos submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio tratados conseguinte com fenilefrina. Dados apresentados como média ± epm. P<0,05: ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer.

(*):p<0,05, em relação ao grupo CTRL 2h + V.FEN
(#):p<0,05, em relação ao grupo CTRL 2h + FEN

5.6.2 Resumo dos Resultados - Parte IV

Nesta última parte foi avaliado o papel da estimulação α-adrenérgica na vigência do estresse sobre a atividade da glândula pineal *in vivo* por meio do uso de agente farmacológico específico (fenilefrina).

A quantificação do conteúdo de melatonina (MEL) em pineais revelou que ambos os estresses mesmo quando do tratamento com fenilefrina são capazes de manter os aumentos significativos da produção de melatonina. Portanto, a estimulação α-adrenérgica (por fenilefrina) juntamente da β-adrenérgica (do estado fisiológico da glândula) não interfere com os efeitos da corticosterona (do estresse) sobre o funcionamento da glândula pineal.

5.7 Resumo Geral dos Resultados

Cada uma das quatro partes desta tese revelaram importantes resultados para o entendimento geral dos efeitos do estresse sobre o funcionamento da glândula pineal. Assim, na **Parte I** (Caracterização dos modelos de estresse) foi observado que ambas as modalidades de estresse (contenção ou frio) não são capazes de formar úlceras gástricas nem produzir TNF em nível plasmático. Além disto, os estresses por contenção ou pelo frio promoveram aumento pronunciado de corticosterona que permaneceu significativo até os 10 minutos após aplicação dos mesmos.

Já na **Parte II** (Efeitos do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*) mostrou-se que somente em duas horas do estresse por contenção ou pelo frio existe aumento significativo da produção de melatonina, porém os níveis do precursor N-acetilserotonina não são modificados. Somado a isto, estes efeitos sobre a glândula pineal não dependeram da modalidade de estresse aqui aplicados.

Na **Parte III** (Papel da corticosterona sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo* frente ao estresse) foi observado que tanto o tratamento com metirapona como com mifepristone foram capazes de abolir os efeitos de ambos os estresses em aumentar significativamente o conteúdo de melatonina da glândula pineal, ainda, esta abolição apresentou efeitos iguais. Ainda, foi observado que o tratamento com talidomida para abolir (aventuais) níveis cerebrais de TNF não modificou os efeitos de ambos os estresses, que poderiam estar sendo diminuídos pela ação da corticosterona junto da citocina TNF.

Na **Parte IV** (Papel da estimulação alfa-adrenérgica na vigência do estresse sobre a funcionalidade da glândula pineal *in vivo*) foi visto que o tratamento com

fenilefrina não modifica os efeitos observados nos estresses aplicados isoladamente. Portanto, a estimulação α-adrenérgica (por fenilefrina) juntamente da β-adrenérgica (do estado fisiológico da glândula) não interfere com os efeitos da corticosterona (do estresse) sobre o funcionamento da glândula pineal.

6 DISCUSSÃO

Nosso objetivo foi testar se a corticosterona aumentada pelo estresse poderia alterar a produção de melatonina pela glândula pineal em ratos. No início, duas estratégias foram elaboradas para avaliar esta hipótese. A primeira abordagem foi submeter os ratos a um modelo de estresse psicológico (ou processivo), então foi escolhida a contenção (DAYAS et al., 2001; SCHIMITZ et al., 2002; MADRIGAL et al., 2003). A segunda abordagem foi comparar os resultados prévios obtidos com um modelo de estresse físico (ou sistêmico), então escolhemos o frio (ZOELLER et al., 1990; BAFFI e PALKOVITS, 2000). Salientamos que a neurocircuitária de aferência a estes estresses são bem diferentes, sendo melhor descritos ao estresse por contenção (CULLINAN et al., 1995; IMAKI et al., 1995; DAYAS et al., 2001; VIAU e SAWCHENKO, 2002) do que ao estresse pelo frio (PACAK e PALKOVITS, 2001). No entanto, nós lembramos que a eferência é comum, o hormônio corticosterona (HERMAN e CULLINAN, 1997). A caracterização de ambos os modelos foram importantes em mostrar que são semelhantes em parâmetros importantes no contexto deste projeto, assim a ausência de qualquer manifestação fisiopatológica detectável, revela a influência apenas, num primeiro momento, da ativação do eixo HPA sobre a glândula pineal. Os achados de ambos os estresses sobre a glândula pineal foram idênticos o que nos levou a elaborar as seguintes questões: O aumento de melatonina foi coincidente com o pico de corticosterona? Ou desencadeado por corticosterona? Desta forma, nós realizamos dois experimentos com ferramentas farmacológicas clássicas (metirapona e mifepristone) para responder a estes questionamentos. Adicionalmente, nós pensamos que durante o estresse há a produção aumentada de corticosterona que juntamente a uma atividade β-adrenérgica na glândula pineal, acaba por potencializar a produção de melatonina, contudo se a estimulação α-adrenérgica

também estivesse presente poderia levar a uma modificação desta resposta? Para testar esta hipótese, os animais foram tratados com o agonista α-adrenérgico fenilefrina.

Lembramos que, o resumo dos resultados pode ser revisto ao final da seção *Delineamento Experimental e Resultados* (item **5.7**).

Pelo fato do estresse promover uma resposta complexa coordenada centralmente, envolvendo alterações de funções autonômicas, endócrinas, comportamentais e cognitivas (DAYAS et al., 2001), além de imunológicas (BESEDOVSKY e DEL REY, 2000). Ainda, uma gama considerável de peculiaridades existente na aplicação do estresse. É justificado certo grau de caracterização de cada um dos estresses aqui empregados para melhor entendimento dos efeitos sobre a atividade da glândula pineal. Assim, cada um dos estresses foi caracterizado sob diferentes esferas, a saber: patológica, imunológica e endócrina. Somado a isto, o uso de duas modalidades de estresse de natureza distinta (psicológica ou física segundo classificação feita por SAWCHENKO et al., 1996) foi escolhido no sentido de auxiliar no entendimento dos efeitos do estresse sobre a glândula pineal, e ainda, em virtude das semelhanças na caracterização promoverem melhor robustez nos resultados encontrados. Desta forma, foi primeiramente escolhido o estresse por contenção e, posteriormente, o estresse pelo frio.

No sentido de avaliar a severidade dos estresses a diferentes intervalos de tempo empregados neste projeto, foi realizada a análise macroscópica dos estômagos a fim de verificar a presença ou não de úlceras. A investigação macroscópica bem como a microscópica não evidenciou a presença de úlceras gástricas em quaisquer grupos experimentais, o que indica ausência de concentrações plasmáticas de TNF,

pois o tratamento com altas doses de indometacina em camundongos para induzir úlcera gástrica promove diminuição no aparecimento das mesmas quando houve tratamento com talidomida e também em animais *knockout* para o receptor TNF-R1 (SOUZA et al., 2004). Neste trabalho, as concentrações plasmáticas de TNF de fato foram ausentes. Sendo a úlcera gástrica uma manifestação fisiopatológica bem característica nos roedores em situações severamente estressantes (SILENE, 1988; SENAY e LEVINE, 1967; DAS et al., 1997), entendemos que a aplicação da contenção como a exposição ao frio são modelos moderados de estresse.

A aplicação do estresse por contenção como pelo frio em ratos foi capaz de desenvolver úlceras gástricas por outros autores (SENAY e LEVINE, 1967). Já estudos de hipotermia em ratos observaram aumento das concentrações plasmáticas de TNF mesmo sem a presença de úlcera gástrica (KENTNER et al., 2002; FAIRCHILD et al., 2004), existindo também níveis desta citocina quando estresse pelo frio com úlceras gástricas (JIA et al., 2007).

Quanto à caracterização na esfera imunológica foi avaliada a concentração plasmática da citocina TNF. Os dois tipos de estresse empregados em diferentes intervalos de tempo não promoveram a produção plasmática de TNF conforme apresentado anteriormente. É também justificada a mensuração desta citocina pelo fato do uso de modelos de estresse neste estudo, os quais elevam as concentrações de glicocorticóides (HERMAN et al., 2003), e estes últimos em estado elevado agem por meio de receptores GR (revisto por DE KLOET et al. 1998), os quais quando ativados podem promover inibição dos efeitos de citocinas inflamatórias que atuam pela vias de sinalização do NF-κB (REICHARDT et al., 1998), sendo que tanto GR como a via do

NF-κB estão comprovadamente presentes na glândula pineal (FERREIRA et al., 2005). Adicionalmente, TNF atua por meio desta via de sinalização (revisto por MEFFERT e BALTIMORE, 2005). Estas relações inibitórias entre NF-κB e GR ativados sugerem mecanismos para a compreensão dos efeitos anti-inflamatórios da corticosterona (SMOAK e CIDLOWSKI, 2004). Cumpre relatar que o estímulo estressante pode levar à produção da citocina pró-inflamatória TNF em nível plasmático (LIU et al., 2007) ou em nível cerebral (MADRIGAL et al., 2002; MUNHOZ et al., 2004), então a produção de melatonina poderia ser reduzida ou suprimida pela inibição da maquinaria enzimática por efeito desta citocina (FERNANDES et al., 2006).

O estresse leva à produção de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) e glicorticóides (LAPIZ et al., 2000; MCEWEN, 2000), os quais são capazes de modular a produção de citocinas (HADDAD et al., 2002; PADGETT e GLASER, 2003; SEKIYAMA et al., 2006), além de outros aspectos do sistema imune na dependência do tipo e duração do estresse (DHABHAR, 2003). Classicamente, níveis aumentados de glicocorticóides estimulam a resposta do tipo Th2 e inibem a resposta do tipoTh1, assim o estresse induz uma desregulação do balanço de citocinas Th1/Th2 (ELENKOV, 2004). Dentre as citocinas, o TNF e a IL-6 (citocinas pró-inflamatórias) destacam-se por serem moléculas pleiotrópicas produzidas por uma variedade de tipos celulares tanto da periferia como do SNC (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). Desta forma, é importante avaliar citocinas pró-inflamatórias, particularmente TNF que é produzido em grande quantidade frente a processos inflamatórios e em alguns tipos de estresse, no sentido de interpretar de forma ampla as respostas fisiológicas ao estresse.

A interação entre hormônios e citocinas durante estresse térmico pode influenciar

a resposta imune em resposta aos desafios ambientais (DUGUE e LEPPANEN, 2000). Em humanos, estresse pelo frio aumenta as concentrações de IL-6, IL-2 e TNF (RHIND et al., 2001). Em frangos de corte, o estresse pelo frio aumenta os níveis de IL-1 (HANGALAPURA et al., 2006). Em ratos, o estresse por contenção como pelo frio por imersão (ambos por 30 minutos) promoveram diminuição das concentrações séricas de IL-2 e aumento das concentrações séricas de IL-6 e TNF (LIU et al., 2007). Ainda em ratos, o estresse por contenção por uma hora aumenta as concentrações de TNF no sistema nervoso central (MADRIGAL et al., 2002). Já em camundongos, o estresse por contenção aumenta as concentrações plasmáticas de IL-6 por meio de catecolaminas tanto centrais como periféricas (TAKAKI et al., 1994; HIDEYUKI et al., 2001), além de inibir a transcrição da citocina IFN-γ sem alterar as concentrações da IL-4 (IWAKABE et al., 1998), ainda, uma única sessão de 2,5 horas é capaz de aumentar a expressão gênica de TNF (VISWANATHAN et al., 2005). O tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais anti-IL-6 (MP5-20F3) permite aumento de ACTH e corticosterona plasmáticos quando os animais foram submetidos ao estresse por contenção, porém os níveis plasmáticos de TNF nos animais tratados apresentaram significativamente aumentados até duas horas após término do estresse, o que indica IL-6 regulando negativamente os níveis de TNF de modo a colaborar na manutenção da homeostase (NUKINA et al., 1998). Vale destacar que, TNF é um fator importante na adaptação de curto-prazo ao estresse crônico (MUNHOZ et al., 2004), pois aumenta a liberação de ACTH (WALTON e CRONIN, 1989), ou seja, age como um ACTH-secratogogo. Novamente, lembramos que ambas as modalidades de estresse empregadas não promoveram a produção plasmática de TNF. O resumo destas informações sobre estresse e balanço de citocinas pode ser visto na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Relação entre estresse e balanço de citocinas.

Tipo de estresse	Espécie	Alterações de Citocinas	Literatura
Frio	Humanos	Aumenta IL-6, IL-2 e TNF.	RHIND et al., 2001
Frio	Frangos de Corte	Aumenta IL-1.	HANGALAPURA et al., 2006
Frio	Ratos	Diminuição IL-2 e, Aumenta IL-6 e TNF.	LIU et al., 2007
Imobilização	Ratos	Diminui IL-2 e, aumenta IL-6 e TNF.	LIU et al., 2007
Contenção	Ratos	Aumenta TNF no SNC.	MADRIGAL et al., 2002
Contenção	Camundongos	Aumenta IL-6.	TAKAKI et al., 1994; HIDEYUKI et al., 2001
Contenção	Camundongos	Inibe a transcrição de IFN-γ e, não altera IL-4.	IWAKABE et al., 1998
Contenção	Camundongos	Aumenta a expressão gênica de TNF.	VISWANATHAN et al., 2005

Quanto à caracterização na esfera endócrina, a avaliação das concentrações séricas de corticosterona serve como uma mensuração indireta da ativação do eixo HPA. Cumpre lembrar que, o eixo HPA faz parte da fisiologia normal dos organismos (revisto por BUCKINGHAM, 2006), sendo que a corticosterona apresenta um ritmo circadiano, o qual apresenta um pico que prepara o organismo para o despertar (KALSBEEK et al., 1996). Durante o estresse, este eixo é reforçado, assim o hormônio corticosterona é produzido de forma mais intensa, e ligado ao tempo de estresse e não ao despertar (HERMAN et al., 2003).

A concentração sérica de corticosterona dos ratos submetidos ao estresse por contenção ou ao estresse pelo frio, ambos por duas horas, revelou que estes produziram um rápido e transiente aumento da concentração deste hormônio, que permaneceu aumentado até os 10 minutos após a finalização dos estresses, então retornando aos valores observados nos animais *naive*, que seguiram valores

compatíveis aos encontrados nos ratos em períodos imediatamente antes e depois do período noturno (KALSBEEK et al., 1996). Portanto, ambos os modelos de estresse aqui empregados (contenção e frio) promoveram ativação pronunciada do eixo HPA, observada pelo aumento significativo das concentrações séricas de corticosterona.

O estudo de Bowers et al. (2008) fazendo uso, entre outros tipos de estresse, do estresse por contenção em aparato e do estresse pelo frio em câmara fria a 4 °C, ambos por duas horas, observaram aumento marcante na concentração sérica de corticosterona em torno de 410 e 350 ng/mL, respectivamente. Todavia, é difícil confrontar os valores aqui encontrados para corticosterona devido às inúmeras peculiaridades na aplicação do estresse, e ainda, as significativas diferenças para: o horário de aplicação, os intervalos de tempo, os aparatos de contenção e a temperatura do frio, entre outros. Neste sentido, cumpre apontar que grande parte dos estudos com estresse por contenção promovia dissociação entre a fase clara ou escura quando da aplicação desta modalidade de estresse, pois o aparato/aparelho comercial não leva em consideração a manutenção da intensidade luminosa. Isto aponta em duas direções importantes. Estes estudos promoveram de alguma maneira uma dessincronização e, em conseqüência, a confecção de aparato próprio foi altamente justificada. Salienta-se também o uso de lâmpada durante a aplicação do estresse pelo frio, o que não foi motivo de preocupação de estudos fazendo uso da aplicação do frio em câmara (e não por imersão).

A glândula pineal produz como principal produto de secreção a indolamina melatonina (LERNER et al., 1958). A quantificação desta indolamina a partir de glândulas pineais *in vivo* permite verificar o funcionamento das mesmas. Nesta

verificação, foram encontrados aumentos das concentrações de melatonina nos animais submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio por duas horas quando comparados aos animais submetidos somente ao isolamento social em gaiola moradia (CTRL) e, animais submetidos aos estresses em menor intervalo de tempo (30 minutos; REST 0.5h e COLD 0.5h). Cumpre salientar que ambos os estresses foram idênticos nos efeitos sob a glândula pineal.

No processo de biossíntese da melatonina pela glândula pineal, o precursor imediato da melatonina destaca-se pela modulação da expressão e da atividade de sua enzima (AA-NAT) pela citocina TNF (FERNANDES et al., 2006) e pelo hormônio corticosterona (FERREIRA et al., 2005), o referido precursor é a N-acetilserotonina. Então, a quantificação da N-acetilserotonina a partir de glândulas pineais *in vivo* permite verificar, de alguma forma, a modulação externa ao funcionamento da glândula pineal. Na quantificação deste precursor, não foram encontradas mudanças significativas dos seus níveis nos animais submetidos ao estresse por contenção ou pelo frio por 30 minutos nem por 2 horas com relação aos animais controle. Desta forma, mesmo que TNF em nível cerebral quando da aplicação do estresse (MADRIGAL et al., 2002; MUNHOZ et al., 2004) estivesse presente este não teve efeitos marcantes sobre a glândula pineal.

Os estresses por contenção e pelo frio, por duas horas, aumentaram significativamente o conteúdo de melatonina da glândula pineal. Além disto, o tratamento com metirapona ou mifepristone aboliu esta modulação diferenciada, além destes tratamentos serem idênticos nesta resposta. Portanto, a potenciação na produção de melatonina é indubitavelmente causada pela corticosterona aumentada resultante do estresse. Todavia, nenhuma diferença no conteúdo do precursor

N-acetilserotonina foi observada o que não pode ser explicada somente por estas abordagens farmacológicas. A ação da corticosterona já foi descrita em glândulas pineais em cultura pelo nosso grupo. Um de nossos estudos mostrou que a corticosterona age na atividade da enzima AA-NAT e na transcrição de seu gene em cultura de pineais (FERREIRA et al., 2005). Outro estudo *in vitro*, mostrou que a co-incubação de corticosterona e noradrenalina aumentou a atividade da enzima AA-NAT em forma de sino, e ainda, aumentou a atividade da enzima HIOMT de forma dose-dependente (FERNANDES et al., 2009). Portanto, a modulação da pineal pelo estresse somente com potenciação da produção de melatonina e não da produção de N-acetilserotonina é totalmente coerente com a ação bimodal da corticosterona sob enzimas-chave da pineal envolvidas na síntese de melatonina. Além disto, a modulação fotoperiódica da síntese de melatonina ocorre pela modulação da enzima AA-NAT em nível de expressão gênica, já a da enzima HIOMT em nível transcricional (RIBELAYGA, et al., 1999), o que reforça o efeito observado somente sobre o produto final, melatonina.

Modulação da glândula pineal pelo estresse já tinha sido anteriormente observada também, porém com outras explicações sobre os efeitos do estresse sob esta glândula.

A regulação dos adrenoceptores beta da pineal já foi implicada na resposta ao estresse. O estresse de imobilização cronicamente reduziu a densidade destes receptores e a atividade da enzima AA-NAT, consequentemente os níveis de N-acetilserotonina. Contudo, a remoção da medula da adrenal não preveniu esta redução. Além disto, este mesmo estresse quando aplicado agudamente aboliu o aumento induzido pelo escuro da atividade da enzima AA-NAT bem como nos níveis de

N-acetilserotonina até 10 horas após a sessão do estresse, sem mudar a taxa de ligação dos adrenoceptores beta. Estes resultados indicaram que existiram mudanças ma atividade simpática neuronal e não diretamente mediado pelas elevações induzidas por estresse nas catecolaminas plasmáticas (YOCCA e FRIEDMAN, 1984). Entretanto, efeitos da corticosterona sobre a glândula pineal foram recusados.

Foi mostrado que o estresse por contenção combinado com o frio é capaz de aumentar os conteúdos de N-acetilserotonina e de melatonina de pineais (OXENKRUG e MCINTYRE, 1985). Este efeito foi parcialmente prevenido pelo pré-tratamento com lorazepam, visto que o “turnover” de serotonina encontrava-se diminuído em animais estressados, mas não em animais estressados pré-tratados com lorazepam, sugerindo a inibição da monoamina oxidade (MAO) induzida pelo estresse (OXENKRUG e MCINTYRE, 1985), na seqüência, elucidado que somente a inibição seletiva de MAO-A (por meio do tratamento com clorgilina) e não MAO-B (por meio do tratamento com selegilina) era a responsável pelo aumento nos níveis de melatonina (OXENKRUG et al. 1985). Posteriormente, foi comprovado por este mesmo grupo de pesquisa que de fato o estresse promovia inibição da MAO no SNC, pois o estresse por contenção combinado com o frio por duas horas aumentou significativamente as concentrações cerebrais de um inibidor endógeno da MAO, a tribulina (BHATTACHARYA et al., 1988). Portanto, neste conjunto de resultados os efeitos do estresse sobre a pineal foram implicados pela inibição indireta da MAO.

Outro estudo deste mesmo grupo descreveu os efeitos do precursor de serotonina, 5-hidroxitriptofano (5-HTP), sob a síntese de melatonina em ratos jovens e senis. A administração de 5-HTP aumentou os conteúdos de melatonina da pineal apenas em ratos senis, mas não em ratos jovens, ambos em condições de claro-escuro

12:12 horas. Todavia, condições de claro constante por 72 horas, os efeitos do 5-HTP foi oposto do achado anterior, ou seja, ele aumentou apenas melatonina em animais jovens, mas não em animais senis. Estes achados foram discutidos com base em estudos prévios sobre a “up-regulation” dos adrenoceptores beta pela luz constante em animais senis, e sugeriram que o decréscimo relacionado à idade na síntese de melatonina não está inteiramente relacionado a mudanças da maquinaria enzimática para a síntese de melatonina, participando também, os receptores (MCINTYRE e OXENKRUG, 1991). Sendo suportado por estudo anterior em que havia observado que corticosterona potencia a produção de melatonina da glândula pineal na presença de baixas concentrações de noradrenalina e, no sentido oposto na presença de altas concentrações (YUWILER, 1989).

Nesta direção, corticosterona pode ter um efeito dualístico sobre a glândula pineal, não exclusivamente dose-dependente e sim do estado fisiológico em que a glândula pineal encontra-se no momento de incubação com corticosterona ou de exposição à corticosterona. Na vigência da estimulação de adrenoceptores alfa e beta (altas concentrações de noradrenalina ou incubação das glândulas com agonistas α- e β-adrenérgicos), a corticosterona inibe a produção de melatonina, opostamente, na vigência de estimulação apenas de adrenoceptores beta (baixas concentrações de noradrenalina ou incubação apenas com agonista seletivo β-adrenérgico), a corticosterona potencia a produção de melatonina (FERNANDES, 2009). Corticosterona alcança a glândula pineal de ratos conforme estudos de microdiálise (FERNANDES et al., 2009) e pode agir em receptores de GR presentes na mesma (FERREIRA et al., 2005). Assim, podemos inferir que as condições de estresse usadas neste trabalho agiram por meio da costicosterona sobre a glândula pineal num estado fisiológico em

que apenas (ou mais intensamente) adrenoceptores beta foram ativados. Somado a isto, ocorre ativação do sistema noradrenérgico quando da presença de estresse agudo, como os empregados aqui (revisto por MORILAK et al., 2005).

Lembrar que a inervação da pineal é feita principalmente pela porção autonômica simpática, provindo dos gânglios cervicais superiores (BLACKSHAW e SNYDER, 1997), que libera noradrenalina (KLEIN, 1985), sendo a cascata da via de transdução AMPc-proteína quinase A decorrente da estimulação de adrenoceptores beta-1 (SUGDEN et al., 1984). Estes receptores apresentam ritmicidade diária com maior densidade na transição de fases (ROMERO e AXELROD, 1974; PANGER et al., 1990), lembrando que o término da aplicação do estresse foi ao final da fase de claro, o que reforça a hipótese aqui formulada. Além disto, os efeitos aqui encontrados do estresse (independente de sua natureza) sobre a glândula pineal em aumentar a produção de melatonina sem alterar os níveis de seu precursor N-acetilserotonina podem ainda ser compreendido pelos achados *in vitro* em que a ação da corticosterona sobre a atividade da enzima AA-NAT na presença de noradrenalina ocorre na forma de sino, ou seja, concentrações menores potenciam esta atividade e concentrações maiores possuem efeito inverso e, também, corticosterona aumenta de modo dose-dependente a atividade da enzima HIOMT (FERREIRA et al., 2005). No mesmo sentido, a cultura de glândulas pineais de ratos adrenalectomizados mostrou que a estimulação destas por noradrenalina promovia alteração somente do conteúdo de melatonina e não dos outros componentes da reação de biossíntese, assim mostrando o papel destacado da corticosterona na última reação da biossíntese (FERNANDES, 2009).

Uma série de estudos reforça este efeito de resposta ao estresse em adrenoceptores alfa, e também, adrenoceptores beta. Um estudo pioneiro de Klein et al.

(1983) mostrou que a N-acetilstransferase da pineal foi regulada por noradrenalina por meio de adrenoceptores alfa e beta pós-sinápticos. Na seqüência, Sugden e Klein (1984) demonstraram a presença de adrenoceptores alfa nas membranas dos pinealócitos. A partir disto, a potenciação da produção de melatonina por meio dos adrenoceptores alfa em resposta a ativação do tempo-escuro foi sequencialmente demonstrada (KLEIN, 1985; KLEIN et al., 1992). Adicionalmente, uma seqüência de artigos conduzidos por Reiter (1991) implicou a verdadeira extensão da contribuição da produção de melatonina por adrenoceptores alfa, algo em torno de 15%. Entretanto, nenhum efeitos em ratos com idade superior a 8 semanas foram observados (RUBIO et al., 1993; WAGNER et al., 2000; TOBIN et al., 2002). Nós lembramos que o tratamento com fenilefrina em ratos estressados e não estressados ocorreu, nesta tese, em idade superior a 12 semanas o que reforça novamente nossa hipótese que a modulação diferenciada da pineal pelo estresse é devido à corticosterona.

Ambos os sistemas, simpato-adrenomedular periférico (SAS) e catecolaminérgico central, são ativados por muitos tipos de estresses (LAPIZ et al., 2000). Contudo, os efeitos do estresse sobre o sistema noradrenérgico pode ser negativo ou positivo; isto depende das condições do estresse, tais como: tempo, duração e natureza, bem como da estrutura neural avaliada.

Foi demonstrado que estímulos estressores, tais como: capsaicina, ácido clorídrico, pressão mecânica, quente e frio, são capazes de aumentar a adrenalina plasmática em ratos imobilizados (MRAVEC et al., 2008). De maneira semelhante aos estresses feitos aqui, imobilização (bandagem por duas horas; sessão única) diminuiu os estoques de catecolaminas (~39%) em tecidos centrais como periféricos, e o estresse pelo frio (4°C por duas horas; uma única sessão) não afetou os estoques

catecolaminérgicos do hipotálamo, mas reduziu a dopamina do hipocampo (~20%) como a noradrenalina em tecidos periféricos, enquanto os níveis de adrenalina permaneceram inalterados (DRONJAK e GAVRILOVIC, 2006).

O receptor CRF_1 (do inglês, *corticotropin-releasing factor receptor type 1*) no núcleo paraventricular modula a resposta ao estresse em dois níveis, o eixo HPA e o SAS, pois o bloqueio central de CRF_1 reduz os aumentos dos níveis plasmáticos de adrenalina (mas não de noradrenalina) e corticosterona durante a aplicação do estresse (imobilização), além de mostrar um mecanismo adicional de potenciação do ACTH em nível da pituitária (JEZOVA et al., 1999). Os adrenoceptores alfa-1 são capazes de modular os níveis de RNAm de CRF no núcleo paraventricular, visto que estes aumentam cerca de 131 % após administração i.c.v repetida (cada 6 horas até 24 horas) de metoxamina (agonista α1-adrenérgico) no PVN, mas estes níveis de RNAm não foram modificados 4 horas após uma única injeção desta droga; prazosin (antagonista α1-adrenérgico) não reverteu este aumento nos níveis do RNAm do CRF após 4 horas do estresse agudo (KISS e AGUILERA, 2003). Portanto, os adrenoceptores alfa-1 auxiliam o aumento de longo-prazo dos níveis do RNAm do CRF durante estresse prolongado. Modulação do CRF_1 e dos adrenoceptores beta-2 em resposta ao estresse foi reportada. O estresse por contenção agudamente (30 minutos; uma única sessão) em camundongos promoveu uma marcante indução de ICER (do inglês, *inducible cAMP early repressor*) no lobo intermédio (IL) da glândula pituitária (MAZZUCCHELLI e SASSONE-CORSI, 1999). Além disto, a estimulação adrenérgica direciona a indução de ICER no IL por meio da ativação de ambos, adrenoceptores beta-2 e CRF_1, sendo que estes receptores estão acoplados à via de sinalização da adenil ciclase, indução prévia de ICER no IL está envolvida na

expressão gênica em resposta ao estresse.

Estudos sobre a neurocircuitária de resposta ao estresse também consideraram o locus coeruleus (LC) localizado na região do tronco encefálico, este tem papel crucial na resposta de despertar e na resposta rápida ao estímulo estressante e de alerta. Lesões no LC (por injeção bilateral de 6-hidróxi-dopamina) reduziram o pico plasmático de ACTH e de corticosterona ao estresse agudo (contenção por 30 minutos, sessão única), opostamente, estas lesões não modificaram os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona ao estresse crônico (contenção por 30 minutos; 4 semanas). Desta maneira, o locus coeruleus é uma região HPA-excitatória para respostas ao estresse agudo (ZIEGLER et al., 1999). Existe uma conexão entre o PVN e o LC (HWANG et al., 1998) bem como uma relação entre LC e pineal observada mais evidente na presença de doenças neurodegenerativas, tal como Síndrome de Parkinson (SANDYK, 1989). O LC foi identificado como um componente “upstream” da neurocircuitária que parte do córtex pré-frontal dorso-medial (mPFC), o qual modula a ativação do eixo HPA no estresse psicológico (RADLEY et al., 2008). Ainda sobre o mPFC, o estresse pelo frio de forma crônica (5 °C; 2-3 semanas) foi capaz de aumentar a noradrenalina extracelular, o que foi parcialmente revertido pela administração i.c.v. prévia de antagonista de CRF (*D-Phe-corticotropin-releasing hormone*) indicando que CRF endógeno não modula a liberação de noradrenalina em resposta ao choque na cauda em ratos expostos cronicamente ao frio (MURPHY et al., 2003).

No mesmo sentido, outra estrutura relevante é a amígdala basolateral (BLA) por que esta responde a uma variedade de estressores ao passo que recebe massiva inervação noradrenérgica proveniente do LC. Exposição crônica ao frio promove

aumento de noradrenalina em grande parte de neurônios da BLA, o que produz uma facilitação de respostas evocadas pela estimulação de entradas corticais (entorhinal e sensorial), então respostas a um estímulo estressor agudo é possível mesmo quando estresse crônico existe (BUFFALARI e GRACE, 2009). Diferentemente, a função dos adrenoceptores alfa-2 no núcleo central da amígdala (CeA) foi implicada como necessário para hipoanalgesia induzida pelo estresse (ORTIZ et al., 2008). Curiosamente, há tempos já se sabe do envolvimento da amígdala na modulação da glândula pineal, visto que pinealectomia modifica em longo-prazo o sistema serotoninérgico da amígdala, diminuindo os níveis do ácido 5-hidróxi-indol-3-acético e a atividade da triptofano-hidroxilase (MIGUEZ et al., 1991).

Outra estrutura relacionada à resposta ao estresse, particularmente ao sistema noradrenérgico, é a amígdala medial (MeA), a qual têm sido implicada na modulação da ativação do eixo HPA quando o estímulo estressor ocorre. O estresse de imobilização agudamente eleva a noradrenalina em dialisados e o ACTH no plasma. Somado a isto, a administração na MeA de um antagonista de adrenoceptores alfa-1 (benoxathian) mostra diminuição da noradrenalina de modo dose-dependente, e também, os níveis plasmáticos de ACTH, mas injeção conjunta de antagonistas de adrenoceptores beta-1 e beta-2 na MeA não tem efeitos significativos. Então, a liberação de NA em resposta ao estresse ocorre na MeA e agem primariamente por meio de adrenoceptores alfa-1 (MA e MORILAK, 2005a). Estes mesmos autores mostraram efeitos semelhantes para o estresse pelo frio crônico e intermitente (4 °C; 7 dias; 6 horas/dia) nos níveis de NA do PVN (MA e MORILAK, 2005b). Neste trabalho, foi encontrado uma redução nos níveis de ACTH em animais estressados após a

microinjeção bilateral de antagonista de adrenoceptores alfa-1 (benoxathian) no PVN. Adicionalmente, eles mostraram que o estresse crônico aumentou de modo dose-dependente os níveis de ACTH pela microinjeção de fenilefrina no PVN. Assim, a secreção de ACTH em resposta ao estresse ocorre no PVN via adrenoceptores alfa-1 no estresse agudo (MA e MORILAK, 2005b). Estudo prévio tinha mostrado que a distribuição da imunoreatividade a adrenoceptores alfa-1B sobrepunha em parte com a distribuição da imunoreatividade a c-Fos induzida no PVN pelo estresse de contenção ou administração de solução salina hipertônica. Ainda, pré-tratamento sistêmico com prazosin falhou em atenuar expressão de c-FOS induzida pelo estresse no PVN bem como a secreção de corticosterona seguida ao estresse por contenção. Portanto, a resposta ao estresse depende dos adrenoceptores alfa-1 hipotalâmicos (WILLIAMS e MORILAK, 1997).

Salienta-se que os efeitos do estresse sobre adrenoceptores são bastante variados na dependência das condições do estresse anteriormente mencionadas e também dos tecidos estudados. Então, nós apresentamos dois estudos mais relacionados a este.

Um primeiro estudo, fazendo uso do estresse de contenção agudo em aparato por 2 horas, mostrou que efeitos cerebrais e cardíacos ocorrem somente via adrenoceptores alfa-1 e não por adrenoceptores alfa-2. Primariamente, este estudo mostrou que núcleos da estria terminal (BST) exercem papel nas respostas cardiovasculares ao estresse via sistema noradrenérgico, pois a microinjeção bilateral de um bloqueador sináptico inespecífico ($CoCl_2$, cloreto de cobalto) através da BST aumentou a freqüência cardíaca (taquicardia), enquanto o pré-tratamento na BST com antagonista seletivo de adrenoceptores alfa-1 (WB4101) causou efeitos semelhantes ao

cloreto de cobalto, indicando que a neurotransmissão noradrenérgica local está envolvida nos efeitos inibitórios da BST na freqüência cardíaca em resposta ao estresse. Adicionalmente, o tratamento na BST com doses equimolares de antagonista de adrenoceptores alfa-2 (RX821002) ou de antagonista de β-adrenoceptores (propanolol) não modificou a freqüência cardíaca. Portanto, a influência inibitória da BST na resposta cardíaca ao estresse de contenção é mediada por adrenoceptores alfa-1 (CRESTANI et al., 2009).

Um segundo estudo, fazendo uso do estresse pelo frio agudo e crônico (2 semanas) em sala com temperatura aclimatizada (5 °C) por 3 horas, mostrou que a termorregulação ocorre na área pré-óptica medial (mPOA) sobre a estimulação de adrenoceptores alfa-1 também. Neste estudo, o estresse pelo frio promoveu aumento significativo na temperatura corporal interna e na freqüência cardíaca, mas diminuíram a temperatura da pele da cauda em ambos os estresses, agudo ou crônico. Entretanto, o aumento dos níveis extracelulares de NA na mPOA devido ao estresse pelo frio foi observado somente na exposição aguda e não crônica, então os mesmos parâmetros foram mensurados durante a perfusão com antagonista de adrenoceptores alfa-1 (fenoxibenzamina) quando a exposição ao frio ocorria. Esta ferramenta farmacológica promoveu uma acentuada hipotermia com bradicardia somente na exposição aguda ao frio. Desta forma, a NA na mPOA modula a termoregulação em resposta ao estresse pelo frio agudo via adrenoceptores alfa-1 e não na sua forma crônica já que outros receptores estão agindo que não adrenoceptores alfa-1 (SAITO et al., 2008).

Juntos, frio e contenção (ambos agudamente), promovem estresse com efeitos em adrenoceptores alfa-2 em três estruturas cerebrais: hipocampo (decréscimo da

densidade destes receptores), amígdala (decréscimo da densidade e aumento da afinidade destes receptores) e mesencéfalo (aumento da densidade e diminuição da afinidade destes receptores). Estes resultados mostraram que as alterações pelo estresse por conteção-frio agudo ocorrem por mudanças nos níveis de NA nas seguintes estruturas hipocampo, amígdala e mesencéfalo com uma importante associação entre “turnover” do neurotransmissor e função do receptor (NUKINA et al., 1987). Ainda, estresse por contenção agudo (2 horas; sessão única) não tem efeitos nos sítios de ligação do transportador de noradrenalina (NET) ou dos adrenoceptores beta, diferentemente, quando aplicado cronicamente (2 horas/dia; 7 dias) diminui os sítios de NET na amígdala, hipotálamo e locus coeruleus, com discreto efeito nos adrenoceptores beta destas regiões (ZAFAR et al., 1997). A interação funcional entre receptores para opióides, adrenoceptores e estresse em modular aprendizado estado-dependente e memória também é relatado (HOMAYOUN et al., 2003).

O desamparo apreendido observado em resposta ao estresse é atribuído especificamente aos adrenoceptores alfa-2C e não aos subtipos 2A ou 2B. A expressão aumentada de adrenoceptores alfa-2C aumenta o tempo de imobilidade de camundongos no teste de natação forçada, ou seja, estes receptores promovem o desenvolvimento do desamparo aprendido. Em adição, expressão aumentada de adrenoceptores alfa-2C foi relacionada à corticosterona aumentada após estresses repetidos, além de responsável pelo balanço dopaminérgico e serotoninérgico no cérebro, mas não o “turnover” de noradrenalina (SALLINEN et al., 1999).

Diferenças na resposta ao estresse sobre o sistema noradrenérgico entre linhagens de ratos são apresentadas na literatura. Uma importante comparação entre linhagens de ratos sobre a resposta apo estresse é entre a linhagem Wistar-Kyoto e

sua aparentada Wistar. Assim, foi encontrado que estresse por contenção agudo (30 minutos, sessão única) muda a expressão de mRNA para muitos componentes do sistema noradrenérgico no locus coeruleus (LC) e na medula da adrenal. Os achados foram os seguintes: a) no LC – a expressão de mRNA da enzima tirosina hidroxilase aumentou 40% em ratos Wistar aos 30 minutos retornando aos valores basais em 2 horas, enquanto ratos Wistar-Kyoto mostraram somente um aumento não siginicativo de 29% em 2 horas; b) na adrenal - a expressão de mRNA da enzima tirosina hidroxilase aumentou em ratos Wistar-Kyoto em 2 horas com nenhuma alteração nos ratos Wistar. Além disto, o mRNA de NET e dos adrenoceptores alfa-2 permaneceram inalterados pelo estresse de contenção em ambas as linhagens (SANDS et al., 2000).

Uma outra comparação importante é feita entre as linhagens Wistar-Kyoto e Sprague-Dawley. O estresse pelo frio crônico (4 °C; 4 horas/dia; 7 dias) promoveu sensibilização da liberação de NA na BST de ratos Wistar-Kyoto, e também, restaurou a facilitação noradrenérgica de sua resposta ao eixo HPA imediata-elevada diferentemente do observado em ratos Sprague-Dawley (PARDON et al., 2003). Contudo, estes dados são opostos em relação à CeA, MeA, BST, mPFC e septo lateral, onde através de microinjeções de antagonistas de adrenoceptores diretamente nestas regiões apresentaram efeito modulatório de deficiência de NA em ratos Wistar-Kyoto quando comparados aos Sprague-Dawley (MORILAK et al., 2005). Portanto, pode-se concluir que os efeitos modulatórios do estresse sobre o sistema noradrenérgico são mais exuberantes na linhagem Wistar seguido da Wistar-Kyoto e da Sprague-Dawley.

Estresse crônico apresenta muitas circunstâncias em resposta ao estresse sobre o sistema noradrenérgico. Desta forma, o isolamento social (em caixa moradia por 21

dias) produz depleção dos estoques de NA hipotalâmica (~18%) e dopamina hipocampal (~20%) sem modificar nos tecidos periféricos (DRONJAK e GAVRILOVIC, 2006). Um estudo comparou o estresse crônico e agudo nesta mesma visão, foi observado que o isolamento social de longa duração (21 dias) e natação forçada repetida têm efeitos menores nas concentrações periféricas de catecolaminas (níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina), mas os animais nesta situação quando submetidos a estressores agudos tem aumento acentuado nos níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina (PAJOVIĆ et al., 2006). O estresse pelo frio crônico (5 °C; 2 semanas) aumenta em 65% os níveis de NA extracelulares no mPFC quando desafiado com choque agudo na cauda (FINLAY et al., 1997). Ainda, choque intermitente nas patas cronicamente (0,6 mA; 30 minutos/dia; 14 dias) não exibe qualquer aumento nos níveis de NA extracelulares quando submetidos ao mesmo desafio anterior (JEDEMA et al., 1999). Portanto, estes dois últimos dados sugerem que a natureza do estressor promove diferenças no desenvolvimento da liberação sensibilizada de NA. Nesta direção, o isolamento de longa duração bem como a superlotação de longa duração aumentam os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona sem modificar os níveis plasmáticos de NA e adrenalina, mas quando desafiados com imobilização ou frio por duas horas, os níveis plasmáticos de NA e adrenalina aumentam. Adicionalmente, os níveis plasmáticos de ACTH foram significativamente mais elevados em animais superlotados por longa duração do que os isolados por longa duração (DRONJAK et al., 2004). Portanto, o isolamento é um estressor mais forte que a superlotação ao menos em condições de longa duração.

Como apresentado anteriormente os efeitos do estresse são diferentes em

relação à duração (agudo ou crônico), mas os estressores são também diferentes em relação ao tempo dos efeitos, sendo: imediatos, curta duração e longa duração. Exemplificando, o estresse de imobilização agudo (1 hora; sessão única), crônico (1 hora/dia; 14 dias) e crônico intermitente (1 hora; aleatoriamente por 60 dias) foram estudados em ratos machos Sprague-Dawley eutanaziados imediatamente após, 6 horas e 24 horas do último estressor. O efeito imediato do estresse agudo foi uma redução nos níveis de NA hipotalâmicos e marcante aumento nos níveis de sulfato-MHPG (do inglês, *3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene-glycol sulfate*) no hipotálamo, hipocampo, córtex e LC. Em contraste, imediatamente após o ultimo estressor do esquema crônico ou crônico intermitente, nenhuma alteração na concentração de NA foi observada enquanto o sulfato-MHPG mostrou um discreto aumento nas quatro regiões cerebrais avaliadas quando comparado ao estresse agudo. O estresse agudo induziu alterações que foram normalizadas dentro de 6 horas, enquanto os outros estresses mantiveram estas mudanças por até 6 a 24 horas. Cumpre salientar que os adrenoceptores beta no córtex mantiveram-se inalterados após todos os paradigmas de estresse (HELLRIEGEL e D'MELLO, 1997). Portanto, os efeitos do estresse sobre o sistema noradrenérgico são duração- e tempo-dependentes.

Anteriormente, discutimos sobre os efeitos do estresse sobre adrenoceptores sobre o sistema nervoso central. Neste momento, discorreremos os efeitos do estresse sobre os tecidos periféricos.

Foi mostrado que, o estresse por contenção agudo diminui a afinidade de adrenoceptores beta-1 atriais (por metoprolol) o que depende das glândulas adrenais, visto que dois dias após adrenalectomia bilateral estes efeitos são abolidos e a infusão venosa de NA junto de adrenalina não tem efeitos (CAPAZ e DE MORAES, 1988).

Portanto, conclui-se que os efeitos cardíacos do estresse acontecem pelos corticosteróides adrenais. Recentemente, isto foi fortemente confirmado (TILLINGER et al., 2008). Neste trabalho, ratos expostos agudamente e cronicamente (28 dias) ao frio mostraram um aumento significativo nos adrenoceptores beta-3 no ventrículo esquerdo, mas sem alterar os subtipos beta-1 e beta-2. Diferentemente, uma única imobilização diminui os níveis de mRNA dos adrenoceptores beta-2 em átrio esquerdo e ventrículos em relação ao estresse pelo frio agudo. Somado a isto, ambos os estresses (frio e imobilização) foram capazes de diminuir os níveis de mRNA dos adrenoceptores alfa-1B no coração. Portanto, a expressão gênica dos diferentes subtipos de adrenoceptores no coração é regulada diferencialmente na dependência do tipo de estresse num padrão semelhante a muitas estruturas cerebrais.

Pela longa discussão dos efeitos do estresse sobre os níveis de adrenalina e noradrenalina apresentamos adiante um resumo destes. Como apresentado anteriormente, os efeitos do estresse nos níveis de adrenalina são controversos. Alguns estudos mostram que diferentes estresses agudos aumentam esta catecolamina no sangue (JEDEMA et al., 1999; PAJOVIĆ et al., 2006; MRAVEC et al., 2008). Outros autores não observaram qualquer modificação plasmática (DRONJAK e GAVRILOVIC, 2006). De forma semelhante, os níveis de noradrenalina são afetados pelo estresse de diferentes maneiras, então aumento foi encontrado no plasma (JEDEMA et al., 1999; PAJOVIĆ et al., 2006) e no sistema nervoso central (FINLAY et al., 1997; MURPHY et al., 2003; MA e MORILAK, 2005a; SAITO et al., 2008; BUFFALARI e GRACE, 2009;), bem como decréscimo no plasma (DRONJAK e GAVRILOVIC, 2006) e no sistema nervoso central (HELLRIEGEL e D'MELLO, 1997; DRONJAK e GAVRILOVIC, 2006) são também observados, além de nenhuma alteração da noradrenalina no sistema

nervoso central (JEDEMA et al., 1999; SALLINEN et al., 1999).

A competência do estresse em modular os adrenoceptores tem grande variação na literatura conforme apresentado nesta discussão, assim no sentido de relembrar estes tantos efeitos relatados apresentamos a seguir um resumo. O estresse foi capaz de modular adrenoceptores alfa-1 (MA e MORILAK, 2005a; MA e MORILAK, 2005b; SAITO et al., 2008; CRESTANI et al., 2009), adrenoceptores alfa-1B (WILLIAMS e MORILAK, 1997; TILLINGER et al., 2008), adrenoceptores alfa-2 (NUKINA et al., 1987; ORTIZ et al., 2008), adrenoceptores alfa-2C (SALLINEN et al., 1999), adrenoceptores beta sem subtipo especificado (ZAFAR et al., 1997), adrenoceptores beta-1 (CAPAZ e DE MORAES, 1988), adrenoceptores beta-2 (TILLINGER et al., 2008), e também adrenoceptores beta-3 (TILLINGER et al., 2008).

Nós discutimos exaustivamente aqui que estresse age sobre adrenoceptores por diferentes meios e modos, mas nós não discutimos ainda a regulação do sistema noradrenérgico por receptores de corticosteróides, sejam receptores para mineralocorticóides (MRs) ou glicocorticóides (GRs). Isto ocorre por que a literatura especializada tem poucos artigos sobre isto. Um importante artigo mostrou que o tratamento por 35 dias com prazosin (antagonista de adrenoceptores alfa-1) não tem efeitos em ratos bons respondedores, mas marcadamente reduziu MRs e GRs hippocampais bem como aumentou a secreção de corticosterona induzida por estresse em ratos maus respondedores. Explicando, os ratos bons respondedores são aqueles que exibem um atraso na curva de decaimento de corticosterona seguida do estresse de contenção agudo, e o oposto são os maus respondedores. Além disto, os ratos maus respondedores quando adrenalectomizados permitiram que o tratamento com prazosin reduzisse os níveis de MRs hipocampais, mas sem alterar os GRs (KABBAJ et

al., 2007). Portanto, estes achados mostraram regulação diferencial pela noradrenalina tanto de MRs como de GRs hipocampais nos dois tipos de ratos respondedores. Efeitos semelhantes foram encontrados em humanos (ZUCKERMAN-LEVIN et al., 2001). Particularmente, foi observado que em pacientes com deficiência (isolada) de glicocorticóides devido à irresponsividade ao ACTH, os quais apresentam resposta mínima ao estresse, quando submetidos a três níveis de estresse agudo: (1) levantar e assumir rapidamente a postura ereta, (2) frio por pressão e, (3) exercício; eles tiveram aumentos em NA como um mecanismo compensatório aos baixos níveis de adrenalina. Então, é possível concluir que os glicocorticóides adrenais são essenciais para a secreção de adrenalina.

Portanto, de acordo com a literatura, o estresse pode atuar sobre todos os adrenoceptores, mas vale lembrar também (apesar de escassa literatura) que a regulação do sistema noradrenérgico na vigência do estresse pode ocorrer por CRF_1 via adrenoceptores alfa-1 (KISS e AGUILERA, 2000) ou adrenoceptores beta-2 (MAZZUCCHELLI e SASSONE-CORSI, 1999) bem como por nenhum dos adrenoceptores (JEZOVA et al., 1999). No mesmo sentido, os adrenoceptores alfa-1 em animais estressados podem ter efeitos em MRs e GRs do hipocampo (KABBAJ et al., 2007) com efeitos semelhantes em seres humanos (ZUCKERMAN-LEVIN et al., 2001).

Outro apontamento em favor de nossa hipótese é a fosforilação da Ser10 na histona H3, a qual é responsável pela condensação do cromossomo, progressão do ciclo celular e, transcrição gênica em resposta a eventos de sinalização (NOWAK e CORCES, 2004). A ativação da transcrição aumenta em 150 vezes o RNAm da enzima AA-NAT (ROSEBOOM et al, 1996), e então, pensar que a fosforilação da histona H3 possa ocorrer é um caminho lógico. Neste sentido, a fosforilação da histona H3 é

aumentada significativamente durante a primeira metade da fase clara do ciclo claro-escuro sob controle adrenérgico somente pela ativação de adrenoceptores beta na glândula pineal do rato (CHIK et al., 2007). Portanto, é reiterada nossa hipótese que os efeitos do estresse via corticosterona sobre a glândula pineal ocorre num estado fisiológico em que os adrenoceptores beta estão em maior atividade.

7 CONCLUSÕES

Numa primeira parte deste trabalho, observamos que a aplicação da contenção como a exposição ao frio promoveram aumento da corticosterona circulante, mas sem, qualquer manifestação fisiopatológica como a presença de úlceras gástricas e da citocina pró-inflamatória TNF em nível plasmático. Portanto, a aplicação da contenção como a exposição ao frio são modelos moderados de estresse.

Numa segunda parte, verificamos que ambas as modalidades de estresse (contenção e frio) a partir de um tempo maior (duas horas) promovem modulação da atividade da glândula pineal com aumento significativo da produção de melatonina e sem qualquer alteração do conteúdo do precursor N-acetilserotonina. Adicionalmente, esta modulação distinta foi independente da natureza do estresse (psicológica ou física), o que implica que a neurocircuitária de aferência ao núcleo paraventricular (diferente para cada tipo de estresse) não está envolvida nesta modulação. Portanto, esta modulação do estresse somente sobre o conteúdo de melatonina da pineal é implicada por ação da corticosterona.

Numa terceira parte, observamos que o tratamento com metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) como com mifepristone (antagonista farmacológico de GR) foram capazes de abolir os efeitos de ambos os estresses sob a glândula pineal, ainda, esta abolição foi independente do agente farmacológico empregado. Além disto, o tratamento com talidomida aboliu quaisquer eventuais efeitos da citocina TNF (em níveis cerebrais), o que poderia estar mascarando os efeitos da corticosterona. Portanto, esta modulação do estresse sobre a pineal é feita indubitavelmente por ação da corticosterona.

Numa quarta e última parte, observamos que o tratamento com fenilefrina (agonista α-adrenérgico) não modificou a modulação da pineal promovido por ambos os

estresses. Portanto, a estimulação α-adrenérgica (por fenilefrina) juntamente da β-adrenérgica (do estado fisiológico da glândula) não interfere com os efeitos da corticosterona (do estresse) sobre o funcionamento da glândula pineal.

Em conjunto, os presentes resultados permitem concluir que o estresse moderado agudo em ratos, independente de sua natureza, modula a atividade da glândula pineal via corticosterona quando a relação adrenoceptores β_1:α_1 é alta, ou seja, os adrenoceptores beta-1 estão em grande número em relação aos adrenoceptores alfa-1. Além disto, nós compreendemos que o significado biológico da melatonina aumentada sob esta condição de estresse é ser um amplificador de sinal do estresse ao organismo inteiro, já que os receptores de melatonina (revisto por JOCKERS et al., 2008) estão tão amplamente distribuídos como os de glicocorticóides (revisto por DE KLOET et al., 1998), sendo que a melatonina endócrina apresenta efeitos sistêmicos na mesma direção da corticosterona, isto é, efeitos anti-inflamatórios (revisto por MARKUS et al., 2007; SMOAK e CIDLOWSKI, 2004). Por tudo exposto, a glândula pineal está integrada na resposta ao estresse (aqui demonstrado) como também ao processo inflamatório (revisto por MARKUS et al., 2007), o que amplia a caracterização do Eixo Imune-Pineal (COUTO-MORAES et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ADI, N.; MASH, D. C.; ALI, Y.; SINGER, C.; SHEHADEH, L.; PAPAPETROPOULOS, S. Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. **Med. Sci. Monit.**, v. 16, n. 2, p. 61-67, 2010.

AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 15, n. 4, p. 321-350, 1994.

AL-GHOUL, W. M.; HERMAN, M. D.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. **Neuroreport**, v. 9, n. 18, p. 4063-4068, 1998.

ANISMAN, H.; TURRIN, N. P.; MERALI, Z.; HAYLEY, S. Neurochemical sensitization associated with systemic administration of tumor necrosis factor-alpha: adjuvant action in combination with bovine serum albumin. **J. Neuroimmunol.**, v. 145, n. 1-2, p. 91-102, 2003.

ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends Neurosci.**, v. 28, n. 3, p. 145-151, 2005.

ANTONI, F. A. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. **Front. Neuroendocrinol.**, n. 14, p. 76-122, 1993.

ARENDT, J. **Melatonin and the Mammalian Pineal Gland.** London: Chapman & Hall, 1995.

ARENDT, J.; ALDHOUS, M.; MARKS, V. Alleviation of jet lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. **Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)**, v. 292, n. 6529, p. 1170, 1986.

ARENDT, J.; SKENE, D. J.; MIDDLETON, B.; LOCKLEY, S. W.; DEACON, S. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness. **J. Biol. Rhythms**, v. 12, p. 604-617, 1997.

ARENDT, J.; WIRZ-JUSTICE, A.; BRADTKE, J.; KORNEMARK, M. Long-term studies on immunoreactive human melatonin. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 16, p. 307–312, 1979.

ARMSTRONG, S.M. Melatonin: the internal zeitgeber of mammals. **J. Pineal Res.**, v. 7, p. 157-202, 1989.

ARMSTRONG, W.E.; WARACH, S.; HATTON, G.I.; MCNEILL, T.H. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. **Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1931-1958, 1980.

AXELROD, J. The pineal gland: a neurochemical transducer. **Science**, v. 1184, p. 1341-1348, 1974.

AXELROD, J.; QUAY, W. B.; BAKER, P. C. Enzymatic synthesis of the skin-lightening agent, melatonin, in amphibians. **Nature**, v. 208, n. 5008, p. 386, 1965.

BACHELARD, G. **A poética do espaço**. São Paulo: Nova Cultural, 1988.

BACONNIER, S.; LANG, S.; POLOMSKA, M.; HILCZER, B.; BERKOVIC, G.; MESHULAM, G. Calcite microcrystals in the pineal gland of the human brain: first physical and chemical studies. **Bioelectromagnetics**, v. 23, n. 7, p. 488–495, 2002.

BAFFI, J. S.; PALKOVITS, M. Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. **Neuroendocrinology**, v. 72, p. 102-113, 2000.

BAGNARA, J. T. Pineal regulation of the body lightening reaction in amphibian larvae. **Science**, v. 132, p. 1481, 1960.

BAGNARA, J. T.; HADLEY, M. E. Endocrinology of the Amphibian Pineal. **Am. Zool.**, v. 10, n. 2, p. 201-216, 1970.

BAILEY, A. **A Treatise on White Magic**. London: Lucis Publishing Company, 1934.

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

BARJAVEL, M. J.; MAMDOUH, Z.; RAGHBATE, N.; BAKOUCHE, O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 160, n. 3, p. 1191-1197, 1998.

BARRY, J. Immunohistochemitry of luteinizing hormone-releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. **Int. Rev. Cytol.**, v. 60, p. 179-219, 1979.

BASAK, S.; KIM, H.; KEARNS, J. D.; TERGAONKAR, V.; O'DEA, E.; WERNER, S. L.; BENEDICT, C. A.; WARE, C. F.; GHOSH, G.; VERMA, I. M.; HOFFMANN, A. A fourth IkB protein within the NF-kB signaling module. **Cell**, v. 128, p. 369–381, 2007.

BASSO, A. S.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO J. Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment. **Neuroimmunomodulation**, v. 9, n. 2, p. 88-94, 2001.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **J. Neuroimmunol.**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BENITEZ-KING, G. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experientia**, v. 49, p. 635-641, 1993.

BERGA, S. L.; YEN, S. S. C. Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 66, p. 242-244, 1988.

BERGIANNAKI, J. D.; PAPARRIGOPOULOS, T. J.; SYRENGELA, M.; STEFANIS, C. N. Low and high melatonin excretors among healthy individuals. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 159-164, 1995.

BERKELEY, W. N.; DANA, C. L.; GODDARD, H. H.; CORNELL, W. S. The functions of the pineal gland, with report of feeding experiments. **Med. Rec.**, v. LXXXIII, p. 835-847, 1913.

BERSON, D. M. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 314-320, 2003.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Z. Rheumatol.**, v. 59, p. 26-29, 2000.

BHATNAGAR, K. P. The ultrastructure of mammalian pinealocytes: a systematic investigation. **Microsc. Res. Tech.**, v. 21, p. 85-115, 1992.

BHATTACHARYA, S. K.; GLOVER, V.; MCINTYRE, I.; OXENKRUG, G.; SANDLER, M. Stress causes an increase in endogenous monoamine oxidase inhibitor (tribulin) in rat brain. **Neurosci. Lett.**, v. 92, p. 218-21, 1988.

BINKLEY, S. **The Pineal: Endocrine and Nonendocrine Function.** Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988.

BLACKSHAW, S.; SNYDER, S. H. Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 21, p. 8074-8082, 1997.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiol. Rev.**, v. 69, p. 1-32, 1989.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **J. Immunol.**, v. 132, p. 1067-1070, 1984.

BLALOCK, J. E. The immune system as the sixth sense. **J. Int. Med.**, v. 257, p. 126-138, 2005.

BLALOCK, J. E. The immune system: our sixth sense. **Immunologist**, v. 2, p. 8-15, 1994.

BLOTTA, M. H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. **J. Immunol.**,v. 158, n. 12, p. 5589-5595, 1997.

BOCCHI, G.; VALDRE, G. Physical, chemical, and mineralogical characterization of carbonate-hydroxyapatite concretions of the human pineal gland. **J. Inorg. Biochem.**, v. 49, n. 3, p. 209-220, 1993.

BOWERS, S. L.; BILBO, S. D.; DHABHAR, F. S.; NELSON, R. J. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, p. 105-113, 2008.

BRAINARD, G. C.; HANIFIN, J. P.; GREESON, J. M.; BYRNE, B.; GLICKMAN, G.; GERNER, E.; ROLLAG, M. D. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 6405-6412, 2001.

BRAINARD, G. C.; WATSON-WHITMEYER, M.; KNOBLER, R. L.; LUBLIN, F. D. Neuroendocrine regulation of immune parameters. photoperiod control of the spleen in syrian hamsters. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 540, p. 704-706, 1988.

BRET-DIBAT, J. L.; BLUTHÉ, R. M.; KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. **Brain Behav. Immun.**, v. 9, n. 3, p. 242-246, 1995.

BROWN, G. M. Melatonin in psychiatric and sleep disorders: therapeutic implications. **CNS Drugs**, v. 3, p. 209-226, 1995.

BROWN, G. M. Pineal function in psychiatric disorders. **Front. Horm. Res.**, v. 21, p. 174–179, 1996.

BRYDEN, M. M.; BUCKENDAHL, P.; SANDERS, J.; ORTIZ, C. L.; KENNAWAY, D. J. Plasma melatonin concentration in neonatal northern elephant seals, *Mirounga angustirostris*. **Comp. Biochem. Phys. A**, v. 109, n. 4, p. 895-904, 1994.

BRYDEN, M. M.; GRIFFITHS, D. J.; KENNAWAY, D. J.; LEDINGHAM, J. The pineal gland is very large and active in newborn Antarctic seals. **Experientia**, v. 42, p. 564-566, 1986.

BUBENICK, G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, n. 10, p. 2336–2348, 2002.

BUCKINGHAM, J. C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 258-268, 2006.

BUFFALARI, D. M.; GRACE, A. A. Chronic cold stress increases excitatory effects of norepinephrine on spontaneous and evoked activity of basolateral amygdala neurons. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 12, n. 1, p. 95-107, 2009.

BUGNON, C.; FELLMAN, D.; GOUGET, A. Changes in corticoliberin and vasopressin-like immunoreactivities in the zona externa of the median eminence in adrenalectomized rats. **Neurosci. Lett.**, v. 30, p. 25-30, 1983.

BUIJS, R. M.; WORTEL, J.; VAN HEERIKHNUIZE, J. J.; FEENSTRA, M. G.; TER HORST, G. J.; ROMIJN, H. J.; KALSBEEK, A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, p. 1535–1544, 1999.

BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater – Histologia Funcional.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

BUXTON, O. M.; L'HERMITE-BALERIAUX, M.; HIRSCHFELD, U.; CAUTER, E. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. **J. Biol. Rhythms**, v. 12, p. 568-574, 1997.

CAGNACCI, A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 200-213, 1996.

CALVO, J.; BOYA, J.; BORREGON, A.; GARCIA-MAURIÑO, J. E. Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. **Anat. Rec.**, v. 220, p. 424-428, 1988.

CAO, L.; LAWRENCE, D. A. Suppression of host resistance to *Listeria monocytogenes* by acute cold/restraint stress: Lack of direct IL-6 involvement. **J. Neuroimmunol.**, v. 133, p. 132-143, 2002.

CAPAZ, F. R.; DE MORAES, S. Reduction by acute restraint stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 147, n. 2, p. 295-298, 1988.

CARDINALI, D. P.; LYNCH, H. J.; WURTMAN, R. J. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. **Endocrinology**, v. 91, p. 1213-1218, 1972.

CAROLEO, M. C.; FRASCA, D.; NISTICO, G.; DORIA, G. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. **Immunopharmacology**, v. 23, p. 81-89, 1992.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA-MAURINO, 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. 18, p. 537-539, 2004.

CHIK, C. L.; ARNASON, T. G.; DUKEWICH, W. G.; PRICE, D. M.; RANGER, A.; HO, A. K. Histone H3 phosphorylation in the rat pineal gland: adrenergic regulation and diurnal variation. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1465-1472, 2007.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 851, p. 311-335, 1998.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, p. 1244-1252, 1992.

COHEN, M.; LIPPMAN, M.; CHABNER, B. Role of pineal gland in ætiology and treatment of breast cancer. **The Lancet**, v. 312, n. 8094, p. 814-816, 1978.

CONNAN, F.; LIGHTMAN, S. L.; LANDAU, S.; WHEELER, M.; TREASURE, J.; CAMPBELL, I. C. An investigation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity in anorexia nervosa: the role of CRH and AVP. **J. Psychiatr. Res.**, v. 41, n. 1-2, p. 131-143, 2007.

CONNOR, T. J.; SONG, C.; LEONARD, B. E.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. **Neuroscience**, v. 84, n. 3, p. 923-933, 1998.

CONTI, A.; CONCONI, S.; HERTENS, E.; SKWARLO-SONTA, K.; MARKOWSKA, M.; MAESTRONI, G. J. M. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **J. Pineal Res.**, v. 28, p. 193-202, 2000.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behav. Immun.**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

COUTO-MORAES, R.; PALERMO-NETO, J.; MARKUS, R. P. The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1153, p. 193-202, 2009.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 3, p. 268-278, 2009.

CROXTALL, J. D.; VAN HAL, P. T.; CHOUDHURY, Q.; GILROY, D. W.; FLOWER, R. J. Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 135, n. 2, p. 511-519, 2002.

CSABA, G.; BARATH, P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. **Endocrinol. Exp**., v. 9, n. 1, p. 59-67, 1975.

CSABA, G.; BODOKY, M.; FISCHER, J.; ÁCS, T. The effect of pinealectomy and thymectomy on the immune capacity of the rat. **Experientia**, v. 22, n. 3, p. 168-169, 1966.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, p. 477-505, 1995.

CUNNINGHAM, E. T. JR.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion.**Trends Neurosci.**, v. 14, p. 406-411, 1991.

CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 426, n. 1-2, p. 1-10, 2001.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; COSTANTINO, G.; CAPUTI, A.P. Protective effect of melatonin in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. **J. Pineal Res.**, v. 25, n. 1, p. 24-33, 1998.

DANA, C. L.; BERKELEY, W. N. The functions of the pineal gland. **Month. Cycl. Pract. Med.**, v. XXVIII, p. 78, 1914.

DANDY, W. E. Extirpation of the pineal body. **J. Exp. Med.**, v. XXII, p. 237-247, 1915.

DAS, D.; BANDYOPADHYAY, D.; BHATTACHARJEE, M.; BANERJEE, R. K. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, p. 8-18, 1997.

DAVID, G. F. X.; KUMAR, T. C. A. Histochemical localization of cholinesterase in the neural tissue of the pineal in the rhesus monkey. **Experientia**, v. 34, p. 1067-1068, 1978.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 353-375, 1992.

DAWSON, D.; VAN DEN HEUVEL, C. J. Integrating the actions of melatonin on human physiology. **Ann. Med.**, v. 30, p. 95-102, 1998.

DAYAS, C. V.; BULLER, K. M.; CRANE, J. W.; XU, Y.; DAY, T. A. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distintictive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, p. 1143-1152, 2001.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr. Rev.**, v. 19, p. 269-301, 1998.

DEACON, S.; ARENDT, J. Posture influences melatonin concentrations in plasma and saliva in humans. **Neurosci. Lett.**, v. 167, p. 191-194, 1994.

DEKRUYFF, R. H.; FANG, Y.; UMETSU, D. T. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. **J. Immunol.**, v. 160, n. 5, p. 2231-2237, 1998.

DEMAS, G. E.; NELSON, R. J. Exogenous melatonin enhances cell-mediated, but not humoral, immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **J. Biol. Rhythms**, v. 13, n. 3, p. 245-252, 1998.

DESCATES, R. **As Paixões da Alma.** São Paulo: Abril Cultural, 1973. (Coleção Os Pensadores, v. 15).

DHABHAR, F. S. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 992, p. 205-217, 2003.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behav. Immun.**, v. 11, n. 4, p. 286-306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 3, p. 1059-1064, 1999.

DHABHAR, F. S.; SATOSKAR, A. R.; BLUETHMANN, H.; DAVID, J. R.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 6, p. 2846-2851, 2000.

DI STEFANO, A.; PAULESU, L. Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. **J. Pineal Res.**, v. 17, n. 4, p. 164-169, 1994.

DICKMEIS, T. Glucocorticoids and the circadian clock. **J. Endocrinol.**, v. 200, p. 3-22, 2009.

DINARELLO, C. A.; SAVAGE, N. Interleukin-1 and its receptor. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 1-20, 1989.

DRAZNER, F. H. **Small animal Endocrinology.** New York: Churchill Livingstone. 1987.

DRONJAK, S.; GAVRILOVIC, L. Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 6, p. 785-790, 2006.

DRONJAK, S.; GAVRILOVIĆ, L.; FILIPOVIĆ, D.; RADOJCIĆ, M. B. Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. **Physiol. Behav.**, v. 81, n. 3, p. 409-415, 2004.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, p. 101-110, 2005.

DUGUE, B.; LEPPANEN, E. Adaptation related to cytokines in man: effects of regular swimming in ice-cold water. **Clin. Physiol.**, v. 20, p. 114-121, 2000.

DUNN, A. J. Mechanisms by which cytokines signal the brain. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 52, p. 43-65, 2002

DUNN, A. J. Nervous system-immune system interactions: an overview. **J. Recept. Res.**, v. 8, n. 1-4, p. 589-607, 1988.

DUVERNOY, H. M.; PARRATTE, B.; TATOU, L.; VUILLIER, F. The human pineal gland. Relationships with surrounding structures and blood supply. **Neurol. Res.**, v. 22, p. 747-790, 2000.

DUVERNOY, H. M.; RISOLD, P. Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. **Brain Res. Rev.**, v. 56, p. 119-147, 2007.

EAKIN, R. M.; WESTFALL, J. A. Fine structure of the retina in the reptilian third eye. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 6, p. 133-134, 1959.

EAKIN, R. M.; WESTFALL, J. A. Further observations on the fine structure of the parietal eye of lizards. **Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 8, p. 483-501, 1960.

EIBL-EIBESFELDT, I. Ethologische unterschiede zwischen hausratte und wanderratte. **Verh. Deutsch. Zool. Ges. Freiburg**, p. 169-180, 1952.

ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1024, p. 138–146, 2004.

ELENKOV, I. J.; KOVÁCS, K.; KISS, J.; BERTÓK, L.; VIZI, E. S. Lipopolysaccharide is able to bypass corticotrophin-releasing factor in affecting plasma ACTH and corticosterone levels: evidence from rats with lesions of the paraventricular nucleus. **J. Endocrinol.**, v. 133, n. 2, p. 231-236, 1992.

ELENKOV, I. J.; PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R. L; CHROUSOS, G. P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v. 108, p. 374-381, 1996.

ELMQUIST, J. K.; ELIAS C. F.; SAPER, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron**, v. 22, n. 2, p. 221-32, 1999.

ENCICLOPÉDIA BRASILEIRA DE PESQUISA ESTUDANTIL. São Paulo: Edros, 1986.

ENGELMANN, M.; BULL, P. M.; BROWN, C. H.; LANDGRAF, R.; HORN, T.; SINGEWALD, N.; LUDWIG, M; WOTJAK, C. T. GABA selectively controls the secretory activity of oxytocin neurons in the rat supraoptic nucleus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 601–608, 2004.

ENGELMANN, M.; EBNER, K.; LANDGRAF, R.; HOLSBOER, F.; WOTJAK, C. T. Emotional stress triggers intrahypothalamic but not peripheral release of oxytocin in male rats. **J. Neuroendocrinol.**, v. 11, p. 867-872, 1999.

FAIRCHILD, K. D.; SINGH, I. S.; PATEL, S.; DRYSDALE, B. E.; VISCARDI, R. M.; HESTER, L.; LAZUSKY, H. M.; HASDAY, J. D. Hypothermia prolongs activation of NF-{kappa}B and augments generation of inflammatory cytokines. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, p. 422-431, 2004.

FELSZEGHY, K.; GÁSPÁR, E.; NYAKAS, C. Long-term selective down-regulation of brain glucocorticoid receptors after neonatal dexamethasone treatment in rats. **J. Neuroendocrinol.**, v. 8, n. 7, p. 493-499, 1996.

FELTEN, L. D. Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural-immune signaling. **Prog. Brain Res.**, v. 122, p. 381-389, 2000.

FERNANDES, P. A. C. M. **Regulação da produção da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório.** 2009. 106f. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FERNANDES, P. A. C. M.; BOTHOREL, B.; CALGARI, C.; RAISON, S.; SIMONNEAUX, V.; MARKUS, R. P. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. **J. Neuroendocrinol.**, v. 21, p. 90-97, 2009.

FERNANDES, P. A. C. M.; CECON, E.; MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S. Effect of TNF-α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. **J. Pineal Res.**, v. 41, p. 344-350, 2006.

FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A. C. M.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAR, M. C. W.; MARKUS, R. P. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **J. Pineal Res.**, v. 38, p. 182-188, 2005.

FERRIER, I. N.; ARENDT, J.; JOHNSTONE, E. C.; CROW, T. J. Reduced nocturnal melatonin secretion in chronic schizophrenia: relationship to body weight. **Clin. Endocrinol.**, v. 17, p. 181-187, 1982.

FINLAY, J. M.; JEDEMA, H. P.; RABINOVIC, A. D.; MANA, M. J.; ZIGMOND, M. J.; SVED, A. F. Impact of corticotropin-releasing hormone on extracellular norepinephrine in prefrontal cortex after chronic cold stress. **J. Neurochem.**, v. 69, n. 1, p. 144-150, 1997.

FIORINA, P.; LATTUADA, G.; PONARI, O.; SILVESTRINI, C.; DALLAGLIO, P. Impaired nocturnal melatonin excretion and changes of immunological status in ischaemic stroke patients. **The Lancet**, v. 347, p. 692-693, 1996.

FJAERLI, O.; LUND, T.; OSTERUD, B. The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood.**J. Pineal Res.**, v. 26, p. 50-55, 1999.

FLESHNER, M.; GOEHLER, L. E.; HERMANN, J.; RELTON, J. K.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. **Brain Res. Bull.**, v. 37, n. 6, p. 605-610, 1995.

FONSECA, E. S. M. **Participação do sistema opioidérgico e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal.** 2005. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FOURTILLAN, J. B.; BRISSON, M.; FOURTILLAN, M.; INGRAND, I.; DECOURT, J. P.; GIRAULT, J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 280, p. 11–22, 2001.

FRIEDMAN, E. M.; IRWIN, M. R. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. **Pharmacol. Ther.**, v. 74, p-. 27-38, 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, p. 76-84, 1998.

GARCIA-MAURINO, S.; POZO, D.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. **J. Pineal Res.**, v. 29, p. 129-137, 2000.

GARCÍA-PERGAÑEDA, A.; GUERRERO, J. M.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; PAZ ROMERO, M.; POZO, D.; CALVO, J. R. Characterization of membrane melatonin receptor in mouse peritoneal macrophages: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. **J. Neuroimmunol.**, v. 95, n. 1-2, p. 85-94, 1999.

GARCÍA-PERGAÑEDA, A.; POZO, D.; GUERRERO, J. M.; CALVO, J. R. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. **J. Immunol.,** v. 159, n. 8, p. 3774-3781, 1997.

GEOFFRIAU, M.; CLAUSTRAT, B.; VELDHUIS, J. Estimation of nocturnal melatonin production in humans by deconvolution analysis In: TOUITOU, Y. (Ed.) **Biological clocks - mechanisms and applications.** Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 325-328.

GIBBS, D. M. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. **Life Sci.**, v. 35, p. 487-491, 1984.

GILLIES, G. E.; LINTON, E. A.; LOWRY, P. J. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. **Nature**, v. 299, n. 5881, p. 355-357, 1982.

GORDON, S. **From Beyond.** 1986. Disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=5tj-dNb6Ar8>. Acesso em: 21 Jun. 2010.

GREENSPAN, F. S.; GARDNER, D. G. **Basic & clinical endocrinology.** New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2004.

GROVES, P. M.; THOMPSON, R. F. Habituation: a dual-process theory. **Psychol. Rev.**, v. 77, n. 5, p. 419-450, 1970.

GUILLEMIN, R.; ROSENBERG, B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. **Endocrinology**, v. 57, p. 599-607, 1955.

GUYRE, P. M.; GIRARD, M. T.; MORGANELLI, P. M.; MANGANIELLO, P. D. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. **J. Steroid Biochem.**, v. 30, p. 89-93, 1988.

HADDAD, J. J.; SAADE, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic–pituitary–adrenal revolving axis. **J. Neuroimmunol.**, v. 133, p. 1-19, 2002.

HALDAR, C.; SINGH, R. Pineal modulation of thymus and immune function in a seasonally breeding tropical rodent, Funambulus pennanti. **J. Exp. Zool.**, v. 289, n. 2, p. 90-98, 2001.

HALDAR, C.; SINGH, R.; GUCHHAIT, P. Relationship between the annual rhythms in melatonin and immune system status in the tropical palm squirrel, Funambulus pennanti. **Chronobiol. Int.**, v. 18, n. 1, p. 61-69, 2001.

HANGALAPURA, B. N.; KAISER, M. G.; POEL, J. J.; PARMENTIER, H. K.; LAMONT, S. J. Cold stress equally enhances in vivo pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 30, p. 503-511, 2006.

HARDELAND, R.; BALZER, I.; POEGGELER, B.; FUHRBERG, B.; URÍA, H.; BEHRMANN, G.; WOLF, R.; MEYER, T. J.; REITER, R. J. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. **J. Pineal Res.**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1995.

HARDELAND, R.; BEHRMANN, G.; FUHRBERG, B.; POEGGELER, B.; BURKHARDT, S.; URIA, H.; OBST, B. Evolutionary aspects of indoleamines as radical scavengers. Presence and photocatalytic turnover of indoleamines in a unicell, *Gonyaulax polyedra*. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 398, p. 279-284, 1996.

HARDELAND, R.; FUHRBERG, B. Ubiquitous melatonin. Presence and effects in unicellls, plants and animals. **Trends Comp. Biochem. Physiol.**, v. 2, p. 25-45, 1996.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds.) **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

HELLRIEGEL, E. T.; D'MELLO, A. P. The effect of acute, chronic and chronic intermittent stress on the central noradrenergic system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, n 1-2, p. 207-214, 1997.

HELMKE, V. K.; WINKLER, P. Die häufigkeit von penealisverkalkungen in den ersten 18 lebensjahren. **Fortschr. Rontgenstr.**, v. 144, p. 221-226, 1986.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neurosci**, v. 20, p. 78-84, 1997.

HERMAN, J. P.; FIGUEIREDO, H.; MUELLER, N. K.; ULRICH-LAI, Y.; OSTRANDER, M. M.; CHOI, D. C.; CULLINANC, W. E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 24, p. 151-180, 2003.

HEUSER, I.; LAMMERS, C. H. Stress and the brain. **Neurobiol. Aging**, v. 24, supl.1, p. 69-76, 2003.

HIDEYUKI, N.; NOBUYUKI, S.; YUHJI, A.; NAOMI, O.; YASUHIRO, K.; CHIHARU, K. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice. **J. Neuroimmunol.**, v. 115, p. 46-52, 2001.

HILL, S. M.; SPRIGGS, L. L.; SIMON, M. A.; MURAOKA, H.; BLASK, D. E. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. **Cancer Lett.**, v. 64, p. 249-256, 1992.

HO, A. K.; CHIK, C. L.; KLEIN, D. C. Protein kinase C is involved in adrenergic stimulation of pineal cGMP accumulation. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 10059-10064, 1987.

HOLLIER, D. **Against architecture: the writings of Georges Bataille.** Boston: MIT Press, 1989.

HOMAYOUN, H.; KHAVANDGAR, S.; ZARRINDAST, M. R. Morphine state-dependent learning: interactions with alpha2-adrenoceptors and acute stress. **Behav. Pharmacol.**, v. 14, n. 1, p. 41-48, 2003.

HOPKINS, S. J.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. **Trends Neurosci.**, v. 18, n. 2, p. 83-88, 1995.

HOTTA, C. T.; GAZARINI, M. L.; BERALDO, F. H.; VAROTTI, F. P.; LOPES, C.; MARKUS, R. P.; POZZAN, T.; GARCIA,. C. R. S. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. 466-468, 2000.

HOWELL, C. M. H. Tumours of the pineal body. **Neurological Section**, p. 65-78, 1910.

HRUSHESKY, W. J.; BLASK, D. E. Re: Melatonin and breast cancer: a prospective study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 11, p. 888-889, 2004.

HUANG, S. K.; KLEIN, D. C.; KORF, H. W. Immunocytochemical demonstration of rod-opsin, S-antigen, and neuron-specific proteins in the human pineal gland. **Cell Tissue Res.**, v. 267, n. 3, p. 493-498, 1992.

HWANG, K. R.; CHAN, S. H.; CHAN, J. Y. Noradrenergic neurotransmission at PVN in locus ceruleus-induced baroreflex suppression in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 1284-1292, 1998.

ICHIMURA, T. The ultrastructure of neurona - pinealocyteic interconnections in the monkey pineal. **Microsc. Res. Tech.**, v. 21, p. 124-135, 1992.

ICHIMURA, T.; ARIKUNI, T.; HASHIMOTO, P. H. Fine structural study of the pineal body of the monkey (*Macaca fuscata*) with special reference to synaptic formations. **Cell Tissue Res.**, v. 244, p. 569-576, 1986.

ILES, G. **Mortal Fear.** New York: Putnam, 1997.

IMAKI, T.; XIAO-QUAN, W.; SHIBASAKI, T.; YAMADA, K.; HARADA, S.; CHIKADA, N.; NARUSE, M.; DEMURA, H. Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 231-238, 1995.

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunol. Lett.**, v. 62, n. 1, p. 39-43, 1998.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JANKOVIC, B. D.; KNEZEVIC, Z.; KOJIC, L.; NIKOLIC, V. Pineal gland and immune system. Immune functions in the chick embryo pinealectomized at 96 hours of incubation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 719, p. 398-409, 1994.

JAPIASSÚ, H. F. **Para ler Bachelard.** Rio de Janeiro: Francisco Alves, 1976.

JEDEMA, H. P.; SVED, A. F.; ZIGMOND, M. J.; FINLAY, J. M. Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. **Brain Res.**, v. 830, n. 2, p. 211-217, 1999.

JEZOVA, D.; MICHAJLOVSKIJ, N.; KVETNANSKY, R.; MAKARA, G. B. Paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus are not equally important for oxytocin release during stress. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 776-781, 1993.

JEZOVA, D.; OCHEDALSKI, T.; GLICKMAN, M.; KISS, A.; AGUILERA, G. Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. **Neuroscience**, v. 94, n. 3, p. 797-802, 1999.

JIA, Y. T.; WEI, W.; MA, B.; XU,Y.; LIU, W.J.; WANG, Y.; LIV, K.Y.; TANG, H. T.; WEI, D.; XIA, Z. F. Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. **J. Immunol.**, v. 179, p. 7808-7819, 2007.

JOCKERS, R.; MAURICE, P.; BOUTIN, J. A.; DELAGRANGE, P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? **Br. J. Pharmacol.**, v. 154, p. 1182-1195, 2008.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. (Eds.) **Patologia Veterinária.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JORDAN, H. E. Results of recent studies of the mammalian Epiphysis Cerebri. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 31, n. 4, p. 231-242, 1912.

KABBAJ, M.; MORLEY-FLETCHER, S.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Individual differences in the effects of chronic prazosin hydrochloride treatment on hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, n. 11, p. 3312-3318, 2007.

KACSOH, B. (Ed.) **Endocrine physiology.** New York: Mc-Graw-Hill, 2000.

KALSBEEK, A.; BUIJS, R. M. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. **Cell Tissue Res.**, v. 309, p. 109-118, 2002.

KALSBEEK, A.; BUIJS, R. M. Rhythms of inhiory and excitatory output from the circadian timing system as revealed by in vivo microdialysis. **Prog. Brain Res.**, v.111, p. 273-293, 1996.

KALSBEEK, A.; GARIDOU, M. L.; PALM, I. F.; VAN DER VLIET, J.; SIMONNEAUX, V.; PÉVET, P.; BUIJS, R. M. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 3146-3154, 2000.

KALSBEEK, A.; PERREAU-LENZ, S.; BUIJS, R. M. A network of (autonomic) clock outputs. **Chronobiol. Int.**, v. 23, p. 521-535, 2006.

KAPPERS, J. A. Short history of pineal discovery and research, the pineal gland of vertebrates including man. **Progr. Brain Res.**, v. 52, p. 3-22, 1979.

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

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 621-663, 2000.

KASTING, N. W. Simultaneous and independent release of vasopressin and oxytocin in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 66, n. 1, p. 22-26, 1988.

KELLER, S. E.; SHLEIFER, S. J.; LIOTTA, A. S.; BOND, R. N.; FARHOODY, N.; STEIN, M. Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 9297-9301, 1988.

KELLER, S. E.; WEISS, J. M.; SCHEIFER, S. J.; MILLER, N. E.; STEIN, M. Stress-induced supresssion of immunity in adrenalectomized rats. **Science**, v. 221, p. 1301-1304, 1983.

KELLY, D. E.; SMITH, S. W. Fine structure of the pineal organs of the adult frog, *Rama pipiens*. **J. Cell Biol.**, v. 22, p. 653-674, 1964.

KENNAWAY, D. J.; GABLE, F. C.; STAMP, G. E. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 1525-1532, 1998.

KENTNER, R.; ROLLWAGEN, F. M.; PRUECKNER, S.; BEHRINGER, W.; WU, X.; STEZOSKI, J.; SAFAR, P.; TISHERMAN, S. A. Effects of mild hypothermia on survival and serum cytokines in uncontrolled hemorrhagic shock in rats. **Shock**, v. 17, n. 6, p. 521-526, 2002.

KICKHÖFEL, E. H. P. A lição de anatomia de Andreas Vesalius e a ciência moderna. **Scientiae studia**, v. 1, n. 3, p. 389-404, 2003.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Altern. Med. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 223-246, 2003.

KISS, A.; AGUILERA, G. Role of alpha-1-adrenergic receptors in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during stress. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 20, n. 6, p. 683-694, 2003.

KISS, A.; AGUILERA, G. Role of alpha-1-adrenergic receptors in the regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during stress. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 20, n. 6, p. 683-694, 2000.

KITAY, J. I.; ALTSCHULE, M. D. Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. **Endocrinology**, v. 65, p. 782-784, 1954.

KITTEL, B.; RUEHL-FEHLERT, C.; MORAWIETZ, G.; KLAPWIJK, J.; ELWELL, M. R.; LENZ, B.; O'SULLIVAN, M.G.; ROTH, D.R.; WADSWORTH, P.F. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2. **Exp. Toxic. Pathol.**, v.55, p. 413-431, 2004.

KLAVDIEVA, M. M. The history of neuropeptides II. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 17, p. 126-153, 1996.

KLEIN, D. C. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: EVERET, D.; CLARK, D. (Eds.) **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** Ciba Foundation Symposium 117. London: Pittman Press, 1985, p. 38-56.

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

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

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

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A.; BLOKHUIS, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 925-935, 1999.

KORF, H. W. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. In: OLCESE, J. (Ed.) **Melatonin after four decades.** New York: Kluwer Academic/Plenum Press, 2000. p. 17-29.

KORF, H. W.; WHITE, B. H.; SCHAAD, D. C.; KLEIN, D. C. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. **Brain Res.**, v. 595, p. 57-66, 1992.

KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 117-142, 2001.

KORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M.; WINGFIELD, J. C.; MCEWEN, B. S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, p. 3-38, 2005.

KRÄUCHI, K.; CAJOCHEN, C.; WIRZ-JUSTICE, A. A relationship between heat loss and sleepiness: effects of postural change and melatonin administration. **J. Appl. Physiol.**, v. 83, p. 134-139, 1997.

KRINKE, G. J.; KAUFMANN, W.; MAHROUS, A. T.; SCHAETTI, P. Morphologic Characterization of Spontaneous Nervous System Tumors in Mice and Rats. **Toxicol. Pathol.**, v. 28, n. 1, p. 178-192, 2000.

KUHLWEIN, E.; IRWIN, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. **J. Neuroimmunol.**, v. 117, n. 1-2, p. 51-57. 2001.

KUNZ, D.; BES, F.; SCHLATTANN, P.; HERRMANN, W. M. On pineal calcification and its relation to subjective sleep perception: a hypothesis driven study. **Psychiatry Res.**, v. 82, p. 187-191, 1998.

KUNZ, D.; SCHMITZ, S.; MAHLBERG, R.; MOHR, A.; STÖTER, C.; WOLF, K. J.; HERRMANN, W. M. A new concept for melatonin deficit: on pineal calcification and melatonin excretion. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 765-772, 1999.

KUROCHKIN, E. N.; DYKE, G. J.; SAVELIEV, S. V.; PERVUSHOV, E. M.; POPOV, E. V. A fossil brain from the Cretaceous of European Russia and avian sensory evolution. **Biology Lett.**, v. 3, n. 3, p. 309–313, 2007.

LANDFIELD, P. W.; APPLEGATE, M. D.; SCHMITZER-OSBORNE, S. E.; NAYLOR, C. E. Phosphate/calcium alterations in the first stages of Alzheimer's disease: implications for etiology and pathogenesis. **J. Neurol. Sci.**, v. 106, p. 221-229, 1991.

LANE, E. A.; MOSS, H. B. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 61, p. 1214-1216, 1985.

LANG, R. E.; HEIL, J. W.; GANTEN, D.; HERMANN, K.; UNGER, T.; RASCHER, W. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 37, n. 4, p. 314-316, 1983.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 1: Errors in descriptive statistics and in interpreting probability values. **AMWA J.**, v. 18, n. 2, p. 67-71, 2003a.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 2: Errors in multivariate analyses and in interpreting differences between groups. **AMWA J.**, v. 18, n. 3, p. 103-107, 2003b.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 3: Errors in data displays. **AMWA J.**, v. 19, n. 2, p. 9-11, 2004.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 4: Errors in correlation and regression analyses. **AMWA J.**, v. 20, n. 1, p. 10-11, 2005a.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 5: Errors in reports of dignostic tests. **AMWA J.**, v. 20, n. 2, p. 50-51, 2005b.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 6: Errors in research designs. **AMWA J.**, v. 20, n. 3, p. 112-115, 2005c.

LANG, T. Common statistical errors even you can find! Part 7: Common errors in conclusions. **AMWA J.**, v. 21, n. 1, p. 17-18, 2006.

LAPIZ, M. D.; MATEO, Y.; PARKER, T.; MARSED, C. Effects of noradrenaline depletion in the brain on response on novelty in isolation reared rats. **Psychopharmacology**, v. 152, p. 312-320, 2000.

LARSEN, P. J.; MOLLER, M.; MIKKELSEN, J. D. Efferent projections from the periventricular and medial parvicellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. **J. Comp. Neurol.**, v. 306, p. 462-479, 1991.

LAVIE, P. Melatonin: role in gating nocturnal rise in sleep propensity. **J. Biol. Rhythms**, v. 12, p. 657-665, 1997.

LEDERER, J. A.; PEREZ, V. L.; DES ROCHES, L.; KIM, S. M.; ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 397-406, 1996.

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

LEWY, A. J.; AHMED, S.; LATHAM-JACKSON, J. M.; SACK, R. L. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase–response curve. **Chronobiol. Int.**, v. 9, p. 380-392, 1992.

LEWY, A. J.; WEHR, T. A.; GOODWIN, F. K.; NEWSOME, D. A.; MARKEY, D. P. Light suppresses melatonin secretion in humans. **Science**, v. 210, p. 1267-1269, 1980.

LI, H. Y.; ERICSSON, A.; SAWCHENKO, P. E. Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2359-2364,1996.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 1141-1148, 2000.

LIU, R. Y.; ZHOU, J. N.; VAN HEERIKHUIZE, J.; HOFMAN, M. A.; SWAAB, D. F. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoproteinE-epsilon4/4 genotype. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 323-327, 1999.

LIU, Y. L.; BI, H.; CHI, S. M.; FAN, R.; WANG, Y. M; MA, X. L.; CHEN, Y. M.; LUO, W. J.; PEI, J. M.;CHEN, J. Y. The effect of compound nutrients on stress-induced changes in serum IL-2, IL-6 and TNF-α levels in rats. **Cytokine**, v. 37, p. 14-21, 2007.

LOPES, C., DELYRA, J. L., MARKUS, R. P.; MARIANO, M. Circadian rhythm in experimental chronic inflammation is modulated by melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 23, p. 72-78, 1997.

LOPES, C.; MARIANO, M.; MARKUS, R. P. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. **Inflamm. Res.**, v. 50, p. 6-11, 2001.

LOPEZ-GONZALEZ, M. A.; CALVO, J. R.; OSUMA, C.; GUERRERO, J. M. Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. **J. Pineal Res.**, v. 12, p. 97-04, 1992.

LOPEZ-GONZALEZ, M. A.; MARTIN-CACAO, A.; CALVO, J. R.; REITER, R. J.; OSUNA, C., GUERRERO, J. M. Specific binding 2-[125I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. **J.Neuroimmunol.**, v. 45, p. 121-126, 1993a.

LOPEZ-GONZALEZ, M. A.; CALVO, J. R.; SEGURA, J. J.; GUERRERO, J. M. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. **Biotechnol. Ther.**, v. 4, n. 3-4, p. 253-262, 1993b.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; MARÍN, F.; ÁLAMO, C. El devenir histórico de la glándula pineal: I. De válvula espiritual a sede del alma. **Rev. Neurol.**, v. 50:, n.1, p. 50-57, 2010a.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; MARÍN, F.; ÁLAMO, C. El devenir histórico de la glándula pineal: II. De sede del alma a órgano neuroendocrino. **Rev. Neurol.**, v. 50:, n.2, p. 117-125, 2010b.

LOTUFO, C. M.; YAMASHITA, C. E.; FARSKY, S. H.; MARKUS, R. P. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 534, p. 258-263, 2006.

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

LOURENÇO, G. A.; DORCE, V. A. C.; PALERMO-NETO, J. Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.15, p.271-277, 2005.

LOVECRAFT, H. P. **From Beyond.** Adelaide: eBooks@Adelaide, 2009. Disponível em: <http://ebooks.adelaide.edu.au/l/lovecraft/hp/beyond/index.html>. Acesso em: 21 jun. 2010.

LOWESTEIN, P. R.; GONZÁLEZ SOLVEYRA, C.; CARDINALI, D. P. *In vitro* uptake of benzodiazepoines by rat pineal gland. **J. Pineal Res.**, v. 1, p. 207-213, 1984.

LUKASZYK, A.; REITER, R. J. Histophysiological evidence for the secretion of polypeptides by the pineal gland. **Am. J. Anat.**, v. 143, p. 451-464, 1975.

LUKE, J. Fluoride Deposition in the Aged Human Pineal Gland. **Caries Res**., v. 2991, n. 35, p. 125-128, 1997.

LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S. The acute effects of corticosterpoids on cognition: integration of animal and human model studies. **Brain Res. Rev.**, v. 24, p. 1-27, 1997.

LUSHINGTON, K.; DAWSON, D.; ENCEL, N.; LACK, L. Urinary 6-sulfatoxymelatonin cycle-to-cycle variability. **Chronobiol. Int.**, v. 13, p. 411-421, 1996.

MA, S.; MORILAK, D. A. Chronic intermittent cold stress sensitises the hypothalamic-pituitary-adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. **J. Neuroendocrinol.**, v. 17, n. 11, p. 761-769, 2005b.

MA, S.; MORILAK, D. A. Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. **J. Neuroendocrinol.**, v. 17, n. 1, p. 22-28, 2005a.

MACLOSKIE, G. Pinela eye of lizard. **Science**, v. X, n. 230, p. 10, 1887.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiol. Rev.**, v. 75, p. 77-106, 1995.

MADRIGAL, J. L. M.; HURTADO, O.; MORO, M. A.; LIZASOAIN, I.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BOSCÁ, L.; LEZA, J. C. The increase in TNF-a levels is implicated in NF-KB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. **Neurophsychopharmacology**, v. 26, p. 155-163, 2002.

MAESTRONI, G. J. MLT and the immmune-hematopeietic system. In: OLCESE, J. (Ed.) **Melatonin after four decades**. New York: Kluwer Academic/Plenum Press, 2000. p. 395-405.

MAESTRONI, G. J. MLT and the immune-hematopoietic system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v, 460, p. 395-405, 1999.

MAESTRONI, G. J.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. **J. Neuroimmunol.**, v. 13, p. 19-30, 1986.

MAESTRONI, G. J. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 43, p. 186-192, 1998.

MAESTRONI, G. J.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity: III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiatergic mechanism. **Immunology**, v. 63, p. 465-469, 1988.

MAESTRONI, G.J.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiatergic mechanism. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 68, p. 384-391, 1987.

MAJEWSKI, P.; DZIWINSKI, T.; PAWLAK, J.; WALOCH, M.; SKWARLO-SONTA, K. Anti-inflammatory and opioid-mediated effects of melatonin on experimental peritonitis in chickens. **Life Sci.**, v. 76, n. 17, p. 1907-1920, 2005.

MALLO, C.; ZAIDAN, R.; GALY, G.; VERMEULEN, E.; BRUN, J.; CHAZOT, G.; CLAUSTRAT, B. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 38, p. 297-301, 1990.

MARKUS, R. P.; AFECHE, S. C.; BARBOSA, E. D.; LOTUFO, C. M. C.; FERREIRA, Z. S.; CIPOLLA-NETO, J. Glândula Pineal e Melatonina. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. (Orgs.) **Cronobiologia**: princípios e aplicações. São Paulo: EDUSP, 2003, p.191-222.

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

MARTIN, X. D.; MALINA, H. Z.; BRENNAN, M. C.; HENDRIKSON, P. H.; LICHTER, P. R. The ciliary body-the third organ found to synthesize idoleamines in humans. **Eur. J. Ophthalmol.**, v. 2, p. 67-72, 1992.

MARTINI, L.; MONPURGO, C. 1955 Neurohumoral control of the release of adrenocorticotrophic hormone. **Nature**, v. 175, n. 4469, p. 1127-1128, 1955.

MARTINS, E.; FERREIRA, A. C.; SKORUPA, A. L.; AFECHE, S. C.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA-ROSA, L. F. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v 3, p. 1116-1121, 2004.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study.**Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19., 2003.

MAZZUCCHELLI, C.; SASSONE-CORSI, P. The inducible cyclic adenosine monophosphate early repressor (ICER) in the pituitary intermediate lobe: role in the stress response. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 155, n. 1-2, p. 101-113, 1999.

MCCANN, S. M.; BROBECK, J. R. Evidence for a role of the supraopticohypophyseal system in regulation of adrenocorticotrophin secretion. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 87, p. 318-324, 1954.

MCCORD, C. P. The pineal gland in relation to somatic, sexual and mental development. **Jour. Am. Med. Assn.**, v. LXIII, p. 232, 1914.

MCCORD, C. P.; ALLEN, F. P. Evidences associating pineal gland function with alteration in pigmentation. **J. Exp. Zool.**, v. 23, p. 207-224, 1917.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 840, p. 33-44, 1998.

MCEWEN, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biol. Psychiatry**, v. 48, p. 721-731, 2000.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Res. Rev.**, v. 23, p. 79-133, 1997.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 5, p. 205-216, 1995.

MCEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. **Arch. Int. Med.**, v. 153, p. 2093-2101, 1993.

MCINTYRE, I. M.; NORMAN, T. R.; BURROWS, G. D. Human melatonin suppression by light is intensity dependent. **J. Pineal Res.**, v. 6, p. 151-156, 1989.

MCINTYRE, I. M.; NORMAN, T. R.; BURROWS, G. D.; ARMSTRONG, S. M. Alterations to plasma melatonin and cortisol after evening alprazolam administration in humans. **Chronobiol. Int.**, v. 10, p. 205-213, 1993.

MCINTYRE, I. M.; OXENKRUG, G. F. Effect of ageing on melatonin synthesis induced by 5-hydroxytryptophan and constant light in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v. 15, p. 561-566, 1991.

MEFFERT, M. K.; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF-kB. **Trends Neurosci.**, v. 28, p. 37-43, 2005.

MEIJER, J. H.; RIETVELD, W. J. The neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. **Physiol. Rev.**, v. 69, p. 671-702, 1989.

MERALI, Z.; HAYLEY, S.; KENT, P.; MCINTOSH, J.; BÉDARD, T.; ANISMAN, H. Impact of repeated stressor exposure on the release of corticotropin-releasing hormone, arginine-vasopressin and bombesin-like peptides at the anterior pituitary. **Behav. Brain Res.**, v. 198, n. 1, p. 105-112, 2009.

MERCIE, P.; SEIGNEUR, M.; BILHOU-NABERA, C.; BOISSEAU, M.R.; BERNARD, P. Lê facteur de transcription nucléaire kB (NF-kB). **Rev. Méd. Interne**, v. 19, p. 945-947, 1998.

MIGUEZ, J.; MARTIN, F.; ALDEGUNDE, M. Differential effects of pinealectomy on amygdala and hippocampus serotonin metabolism. **J. Pineal Res.**, v. 10, n. 2, p. 100-103., 1991.

MIKKELSEN, J. D.; HAUSER, F.; OLCESE, J. Neuropeptide Y (NPY) and NPY receptors in the rat pineal gland. In: OLCESE, J. (Ed.) **Melatonin after four decades.** New York: Kluwer Academic/Plenum Press, 2000. p. 95-107.

MIKKELSEN, J. D.; MOLLER, M. Vasoactive intestinal peptide in the hypothalamohypophysial system of the mongolian gerbil. **J. Comp. Neurol.**, v. 273, p. 87-98, 1988.

MILLER, S. C.; PANDI, P. S. R.; ESQUIFINO, A. I.; CARDINALI, D. P.; MAESTRONI, G. J. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. **Int. J. Exp. Path.**, v. 87, p. 81-87, 2006.

MISTRALETTI, G.; SABBATINI, G.; TAVERNA, M.; FIGINI, M.A.; UMBRELLO, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; DOZIO, E.; ESPOSTI, R.; DEMARTINI, G.; FRASCHINI, F.; REZZANI, R.; REITER, R.J.; IAPICHINO, G. Pharmacokinetics of orally administered melatonin in critically ill patients. **J. Pineal Res.**, v. 48, n. 2, p. 142-147, 2010.

MOLINERO, P.; SOUTTO, M.; BENOT, S.; HMADCHA, A.; GUERRERO, J. M. Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. **J. Neuroimmunol.**, v. 103, n. 2, p. 180-188, 2000.

MOLLER, M. Presence of a pineal nerve (nervus pinealis) in the human fetus: light and electron microscopical study of the innervation of the pineal gland. **Brain Res.**, v. 154, p. 1–12, 1978.

MOLLER, M. The structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **Microsc. Res. Tech.**, v. 21, p. 188-204, 1992.

MOLLER, M.; BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. **Cell Tissue Res.**, v. 309, p. 139-150, 2002.

MOLLGARD, K.; MOLLER, M. On the innervation of the human fetal pineal gland. **Brain Res.**, v. 52, p. 428-432, 1973.

MONTELEONE, P.; MAJ, M.; FUSCO, M.; ORAZZO, C.; KEMALI, D. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. **Life Sci.**, v. 47, p. 1989–1995, 1990.

MONTELEONE, P.; NATALE, M.; LA ROCCA, A.; MAJ, M. Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics. **Neuropsychobiology**, v. 36, p. 159-163, 1997.

MOORE, C. B.; SIOPES, T. D. Effects of lighting conditions and melatonin supplementation on the cellular and humoral immune responses in Japanese quail Coturnix coturnix japonica. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 119, n. 1, p. 95-104, 2000.

MOORE, R. Y. Neural control of the pineal gland. **Behav. Brain Res.**, v. 73, p. 125-130, 1996.

MOORE, R. Y.; HELLER, A.; WURTMAN, R. J.; AXELROD, J. Visual pathway mediating pineal response to environmental light. **Science**, v. 155, n. 759, p. 220–223, 1967.

MOORE, R. Y.; SIBONY, P. Enkephalin-like immunoreactivity in neurons of the human pineal gland. **Brain Res.**, v. 457, p. 395-398, 1988.

MORAWIETZ, G.; RUEHL-FEHLERT, C.; KITTEL, B.; BUBE, A.; KEANE, K.; HALM, S.; HEUSER, A.; HELLMANN, J. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 3. **Exp. Toxic. Pathol.**, v. 55, p. 433-449, 2004.

MORGADO, I. The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. **Rev. Neurol.**, v. 40, p. 289-297, 2005.

MORILAK, D. A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; GARCIA, A. S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C. O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 29, p. 1214-1224, 2005.

MORIYAMA, Y.; YAMADA, H.; HAYASHI, M.; YATSUSHIRO, S. Intrinsic glutaminergic system negatively regulates melatonin synthesis in mammalian pineal gland. In: OLCESE, J. (Ed.) **Melatonin after four decades.** New York: Kluwer Academic/Plenum Press, 2000. p. 83-90.

MORRIS, M.; LACK, L.; BARRETT, J. The effect of sleep/wake state on nocturnal melatonin excretion. **J. Pineal Res.**, v. 9, p. 133-138, 1990.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of corticosterone metabolites in bird's droppings: an analytical approach. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1046, p. 17-34, 2005.

MRAVEC, B.; TILLINGER, A.; BODNAR, I.; NAGY, G.M.; PALKOVITS, M.; KVETNANSKÝ, R. The response of plasma catecholamines in rats simultaneously exposed to immobilization and painful stimuli. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1148, p. 196-200, 2008.

MUCHA, S.; ZYLINSKA, K.; ZEREK-MELEN, G.; SWIETOSLAWSKI, J.; STEPIEN, H. Effect of interleukin-1 on in vivo melatonin secretion by the pineal gland in rats. **Adv. Pineal Res.**, v. 7, p. 177-181, 1994.

MULLER, N.; ACKENHEIL, M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 1-33, 1998.

MUNHOZ, C. D.; GARCÍA-BUENO, B.; MADRIGAL, J. L.; LEPSCH, L. B.; SCAVONE, C.; LEZA, J. C. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 12, p. 1037-1046, 2008.

MUNHOZ, C. D.; MADRIGAL, J. L. M.; GARCIA-BUENO, B.; PRADILLO, J. S. M.; MORO, M. A. A.; LIZASOAIN, I.; LORENZO, P.; SCAVONE, C.; LEZA, J. C. TNF-a accounts for short-term persistence of oxidative status in rat brain after two weeks of repeated stress. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, p. 1125–1130, 2004.

MURPHY, E. K.; SVED, A. F.; FINLAY, J. M. Corticotropin-releasing hormone receptor blockade fails to alter stress-evoked catecholamine release in prefrontal cortex of control or chronically stressed rats. **Neuroscience**, v. 116, n. 4, p. 1081-1087, 2003.

NELSON, R. J.; DRAZEN, D. L. Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 39, p. 383-398, 1999.

NEWTON, R.; HOLDEN, N. S. Separating transrepression and transactivation: A distressing divorce for the glucocorticoid receptor? **Mol. Pharmacol.**, v.72, p. 799-809, 2007.

NEYLAN, T. C. Hans Selye and the field of stress research. **J. Neuropsychiatry**, v. 10, p. 230-231, 1998.

NIELS, L. P. High-affinity binding sites for melatonin in hamster spleen. **Med. Sci. Res.**, v. 17, p. 179–180, 1989.

NOWAK, S. J.; CORCES, V. G. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. **Trends Genet.**, v. 20, p. 214-220, 2004.

NUKINA, H.; SUDO, N.; KOMAKI, G.; YU, X.; MINE, K.; KUBO, C. The restraint stress-induced elevation in plasma interleukin-6 negatively regulates the plasma TNF-alpha level. **Neuroimmunomodulation**, v. 5, p. 323-327, 1998.

NUKINA, I.; GLAVIN, G. B.; LABELLA, F. S. Acute cold-restraint stress affects alpha 2-adrenoceptors in specific brain regions of the rat. **Brain Res.**, v. 401, n. 1, p. 30-33, 1987.

NUSSEY, S.; WHITEHEAD, S. (Eds.) **Endocrinology**: an integrated approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001.

ODERMATT, A.; GUMY, C. Glucocorticoid amd mineralocorticoid action: why should we considerer influences by environmental chemical? **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, p. 1184-1193, 2008.

OHASHI, Y.; OKAMOTO, N.; UCHIDA, K.; IYO, M.; MORI, N.; MORITA, Y. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. **Biol. Psychiatry**, v. 45, p. 1646-1652, 1999.

ORTEGA, E.; GARCIA, J. J.; DE LA FUENTE, M. Modulation of adherence and chemotaxis of macrophages by norepinephrine. Influence of ageing. **Mol. Cel. Biochem.**, v. 203, p. 113-117, 2000.

ORTIZ, J. P.; CLOSE, L. N.; HEINRICHER, M. M.; SELDEN, N. R. Alpha(2)-noradrenergic antagonist administration into the central nucleus of the amygdala blocks stress-induced hypoalgesia in awake behaving rats. **Neuroscience**, v. 157, n. 1, p. 223-228, 2008.

OSBORN, H. F. A pineal eye in the Mesozoic Mammalia. **Science**, v. IX, n. 208, p. 92, 1887a.

OSBORN, H.F. The pineal eye in Tritylodon. **Science**, v. IX, n. 209, p. 114, 1887b.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; CASELGRANDI, E.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C. Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. **FEBS Lett.**, v. 351, p. 19-21, 1994.

OWEN, R. On the skull and dentition of a Triassic Mammal (Trtylodon longævus, Owen) from South Africa. **Quart. J. Geol. Soc.**, v. 40, p. 146-152, 1884.

OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. **Pharmacol Rev.**, v. 43, n. 4, p. 425-473, 1991.

OXENKRUG, G. F.; MCCAULEY, R.; MCINTYRE, I. M.; FILIPOWICZ, C. Selective inhibition of MAO-A but not MAO-B activity increases rat pineal melatonin. **J. Neural Transm.**, v. 61, p. 265-270, 1985.

OXENKRUG, G. F.; MCINTYRE, I. M. Stress-induced synthesis of melatonin: possible involvement of the endogenous monoamine oxidase inhibitor (tribulin). **Life Sci.**, v. 37, p. 1743-1746, 1985.

PACAK, K.; ARMANDO, I.; FUKUHARA, K.; KVETNANSKY, R.; PALKOVITS, M.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an *in vivo* microdialysis study. **Brain Res.**, v. 589, p. 91-96, 1992.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Rev.**, v. 22, p. 502-548, 2001.

PACE, T. W.; GAYLORD, R. I.; JARVIS, E.; GIROTTI, M.; SPENCER, R. Differential glucocorticoid effects on stress-induced gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and ACTH secretion in the rat. **Stress**, v. 12, n. 5, p. 400-411, 2009.

PADGETT, D. A.; GLASER, R. How stress influences the immune response. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 444-448, 2003.

PAJOVIĆ, S. B.; PEJIĆ, S.; STOJILJKOVIĆ, V.; GAVRILOVIĆ, L.; DRONJAK, S.; KANAZIR, D. T. Alterations in hippocampal antioxidant enzyme activities and sympatho-adrenomedullary system of rats in response to different stress models. **Physiol. Res.**, v. 55, n. 4, p. 453-460, 2006.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA-MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behav. Immun.**, v. 17, p. 43-54, 2003.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 23, p. 497-507, 2001.

PALME, R.; FISCHER, P.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M.N. Excretion of infused 14C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 43, p. 43-63, 1996.

PANG, S. F.; LI, Y.; JIANG, D. H.; CHANG, B.; XIE, B. L. Acute cerebral hemorrhage changes the nocturnal surge of plasma melatonin in humans. **J. Pineal Res.**, v. 9, p. 193–208, 1990.

PANGER, B.; PANGER, A.; REITER, R. J. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. **J. Neural Transm.**, v. 81, p. 17-29, 1990.

PAPPOLLA, M. A.; CHYAN, Y. J.; POEGGELER, B.; FRANGIONE, B.; WILSON, G.; GHISO, J.; REITER, R. J. An assessment of the antioxidant and antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease. **J. Neural Trans.**, v. 107, p. 203-231, 2000.

PARDON, M. C.; MA, S.; MORILAK, D. A. Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats. **Brain Res.**, v. 971, n. 1, p. 55-65, 2003.

PARTONEN, T. Extrapineal melatonin and exogenous serotonin in seasonal affective disorder. **Med. Hypotheses**, v. 51, p. 441-442, 1998.

PAWLIKOWSKI, M.; WINCZYK, K.; KARASEK, M. Oncostatic action of melatonin: facts and question marks. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 1, p. :24-29, 2002.

PAYNE, J.F. Reports of Societies, Pathological Society of London – Melanotic sarcoma of the pineal body, Syphilitic enlargement of the pineal body, Cysts of the pineal body, Calcareous deposition in the pineal body. **Br. Med. J.**, v. 2, n. 1980, p. 1745-1746, 1898.

PEDERSEN, E. B.; FOX, L. M.; CASTRO, A. J.; MCNULTY, J. A. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 272, n. 2, p. 257-265, 1993.

PEDERSEN, E. B.; MCNULTY, J. A.; CASTRO, A. J.; FOX, L. M.; ZIMMER, J.; FINSEN, B. Enriched immune-environment of blood–brain barrier deficient areas of normal adult rats. **J. Neuroimmunology**, v. 76, p. 117–131, 1997.

PEISE, B. Seasonal affective disorder and exercise treatment: a review. **Biol. Rhythm Res.**, v. 40, n. 1, p. 85-97, 2009.

PENEV, P. D.; ZEE, P. C. Melatonin: a clinical perspective. **Ann. Neurol.**, v. 42, p. 545-553, 1997.

PERREAU-LENZ, S.; KALSBEEK, A.; VAN DER VLIET, J.; PÉVET, P.; BUIJS, R. M. I*n vivo* evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 130, p. 797-803, 2005.

PHANSUWAN-PUJITO, P.; MIKKELSEN, J. D.; GOVITRAPONG, P.; MOLLER, M. A cholinergic innervation of the bovine pineal gland visualized by immunohistochemical detection of choline acetyltransferase-immunoreactive nerve fibers. **Brain Res.**, v. 545, n. 1-2, p. 49-58, 1991.

PIECHOWIAK, H. The pineal organ. Anatomy, metabolism, physiology and clinical picture. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 98, n. 44, p. 2088-2094, 1973.

PIJLMAN; F. T. A.; VAN REE, J. M. Physical but not emotional stress induces a delay in behavioural coping responses in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 136, p. 365-373, 2002.

PITMAN, D. L.; OTTENWELLER, J. E.; NATELSON, B. H. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. **Behav. Neurosci.**, v. 104, n. 1, p. 28-36., 1990.

PLOTSKY, P. M.; CUNNINGHAM, E. T., JR.; WIDMAIER, E. P. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. **Endocrinol. Rev.**, v. 10, p. 437-458, 1989.

PONTES, G. N.; CARDOSO, E. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; MARKUS, R. P. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppress nocturnal melatonin production. **J. Pineal Res.**, v. 43, p. 365-371, 2007.

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

POON, A. M.; MAK, A. S.; LUK, H. T. Melatonin and 2[^{125}I]iodomelatonin binding sites in the human colon. **Endocr. Res.**, v. 22, n. 1, p. 77-94, 1996.

POON, A. M.; PANG, S. F. Pineal melatonin-immune system interaction. **Front. Horm. Res.**, v. 21, p. 71-83, 1996.

PORTER, R. **Das tripas coração.** Rio de Janeiro: Record, 2002.

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. 20, p. 600-605, 2000.

QUAY, W. B. Reduction of mammalian pineal weight and lipid during continuous light. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 1, p. 211-217, 1961.

QUAY, W. B. Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 115, p. 710-713, 1964.

RALPH, C. L. The pineal gland and geographical distribution of animals. **Int. J. Biometeorol.**, v. 19, p. 289–303, 1975.

RAUX-DEMAY, M. C.; GIRARD, F. The physiology of corticotropin-releasing factor (CRF). **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 25, n. 5, p. 931-943, 1985.

REDMAN, J.; ARMSTRONG, S.; NG, K. T. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. **Science**, v. 219, p. 1089-1091, 1983.

REICHARDT, H. M.; KAESTNER, K. H.; TUCKERMANN, J.; KRETZ, O.; WESSELY, O.; BOCK, R.; GASS, P.; SCHMID, W.; HERRLICH, P.; ANGEL, P.; SCHÜTZ, G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. **Cell**, v. 93, n. 4, p. 531-541, 1998.

REICHARDT, H. M.; KAESTNER, K. H.; WESSELY, O.; GASS, P.; SCHMID, W.; SCHÜTZ, G. Analysis of glucocorticoid signalling by gene targeting. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 65, p. 111-115, 1998.

REITER, R. J. Cytoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. **Nutrition**, v. 14, p. 691-696, 1998a.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, n. 3, p. 359-384, 1998b.

REITER, R. J. Pienal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. **Endocr. Rev.**, v. 12, p. 151-180, 1991.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions.**Endocr. Rev.**, v. 12, p. 151-180, 1991.

REITER, R. J. The mammalian pineal gland: structure and function. **Am. J. Anat.**, v. 162, p. 287-313, 1981.

REITER, R. J.; CALVO, J. R.; KARBOWNIK, M.; QI, W.; TAN, D. X. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 917, p. 376-386, 2000.

REITER, R. J.; GARCIA, J. J.; PIE, J. Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: responses to melatonin. **Restor Neurol. Neurosci.**, v. 12, n. 2-3, p. 135-142, 1998.

REITER, R.J.; MAESTRONI, G.J. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. **J. Mol. Med.**, v. 77, n. 1, p. 36-39, 1999.

REITER, R. J.; MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E.; POEGGELER, B.; BARLOW-WALDEN, L.; CHUANG, J.; ORTIZ, C.G.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 1-11, 1995.

REITER, R. J.; PABLOS, M. I.; AGAPITO, T. T.; GUERRERO, J. M. Melatonin in the context of the free radical theory of aging. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 786, p. 362-378, 1986.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochim Pol.**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2007.

REPPERT, S. M.; GODSON, C.; MAHLE, C. D.; WEAVER, D. R.; SLAUGENHAUPT, S.; GUSELLA, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, 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, p. 100-102, 1996.

REVOLLO, J. R.; CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1179, p. 167-178, 2009.

REYES,T. M.; WALKER, J. R.; DECINO, C.; HOGENESCH, J. B.; SAWCHENKO, P. E. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 13, p. 5607-5616, 2003.

RHIND, S. G.; CASTELLANI, J. W.; BRENNER, I. K.; SHEPHARD, R. J.; ZAMECNIK, J.; MONTAIN, S. J.; YOUNG, A. J.; SHEK, P. N. Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 281, p. 66-75, 2001.

RIBELAYGA, C.; GARIDOU, M. L.; MALAN, A.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PEVET, P.; SIMONNEAUX, V. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. **J. Biol. Rhythms.,** v. 14, n. 2, p. 105-115, 1999.

RIVIER, C.; RIVIER, J.; MORMEDE, P.; VALE, W. Studies of the nature of the interaction between vasopressin and corticotropin-releasing factor on adrenocorticotropin release in the rat. **Endocrinology**, v. 115, n. 3, p. 882-886, 1984.

ROMERO, J. A.; AXELROD, J. Pineal beta-adrenergic receptor: diurnal variation in sensitivity. **Science**, v. 184, p. 1091-1092, 1974.

RONNEKLEIV, O. K. Distribution in the macaque pineal of nerve fibers containing immunoreactive substance P, vasopressin, oxytocin and neurophysins. **J. Pineal Res.**, v. 5, p. 259-271, 1988.

ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 213-238, 2000.

ROSEBOOM, P. H.; COON, S. L.; BALER, R.; MCCUNE, S. K.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 137, p. 3033-3045, 1996.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia**: texto e atlas. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil, 1993.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends Neurosci.**, v. 18, n. 3, p. 130-136, 1995.

ROWAT, S. C. Integrated defense system overlaps as a disease model: with examples for multiple chemical sensitivity. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, sup. 1, p. 85-109, 1999.

RUBIO, A.; GUERRERO, J. M.; REITER, R. J.; OSUNA, C. Involvement of α- and β-adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase during development. **Endocrinology**, v. 132, p. 393-398, 1993.

RUEHL-FEHLERT, C.; KITTEL, B.; MORAWIETZ, G.; DESLEX, P.; KEENAN, C.; MAHRT, C. R.; NOLTE, T.; ROBINSON, M.; STUART, B.P.; DESCHL, U. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. **Exp. Toxic. Pathol.**, v. 55, p. 91-106, 2003.

SAFFRAN, M.; SCHALLY, A. V.; BENFEY, B. G. Stimulation of the release of corticotropin from the adenohypophysis by a neurohypophysial factor. **Endocrinology**, v. 57, p. 439-444, 1955.

SAGAN, S. **Awakening the third eye.** 3. ed. Melbourne: Clairvision, 2007.

SAITO, T.; ISHIWATA, T.; HASEGAWA, H.; NOMOTO, S.; KOTANI, Y.; OTOKAWA, M.; AIHARA, Y. Effect of chronic cold exposure on noradrenergic modulation in the preoptic area of thermoregulation in freely moving rats. **Life Sci.**, v. 83, n. 1-2, p. 79-84, 2008.

SALLINEN, J.; HAAPALINNA, A.; MACDONALD, E.; VIITAMAA, T.; LÄHDESMÄKI, J.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; KOBILKA, B.K.; SCHEININ, M. Genetic alteration of the alpha2-adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. **Mol. Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 443-452, 1999.

SAMPAIO, L. F. S. An unexpected effect of 5-MCA-NAT in chick retinal development. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 27, n. 6, p. 511-515. 2009.

SANDERS, V. M. Interdisciplinary research: Noradrenergic regulation of adaptive immunity. **Brain Behav. Immun.**, v. 20, p. 1-8, 2006.

SANDERS, V. M. The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptor stimulation in the modulation of Th1, Th2, and B lymphocyte function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 437, p. 269-278, 1998.

SANDLER, J. A.; GLYMAN, R. I.; MANGANIELL, V. C.; VAUGHAN, M. The effect of serotonin (5 hydroxytryptamine) and derivatives on guanine metabolism in human monocytes. **J. Clin.Invest.**, v. 55, p. 431-435, 1975.

SANDS, S. A.; STRONG, R.; CORBITT, J.; MORILAK, D. A. Effects of acute restraint stress on tyrosine hydroxylase mRNA expression in locus coeruleus of Wistar and Wistar-Kyoto rats. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 75, n. 1, p. 1-7, 2000.

SANDYK, R. Locus coeruleus-pineal melatonin interactions and the pathogenesis of the "on-off" phenomenon associated with mood changes and sensory symptoms in Parkinson's disease. **Int. J. Neurosci.**, v. 49, n. 1-2, p. 95-101, 1989.

SANETO, R. P.; ALTMAN, A.; KNOBLER, R. L.; JOHNSON, H. M.; DE VELLIS, J. Interleukin 2 mediates the inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 23, p. 9221-9225, 1986.

SANETO, R. P.; CHIAPPELLI, F.; DE VELLIS, J. Interleukin-2 inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation depends on expression of the TAC receptor. **J. Neurosci. Res.**, v. 18, n. 1, p. 147-154, 1987.

SAPER, C. B.; LU, J.; CHOU, T. C.; GOOLET, J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. **Trends Neurosci.**, v. 28, n. 3, p. 152-157, 2005.

SASEK, C. A.; ZIGMOND, R. E. Localization of vasoactive intestinal peptide- and peptide histidine isoleucine amide-like immunoreactivities in the rat superior cervical ganglion and its nerve trunks. **J. Comp. Neurol.**, v. 280, p. 522-532, 1989.

SATO, T.; KANEKO, M.; HAMA, A.; KUSAKARI, T.; FUJIEDA, H. Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. **Cell Tissue Res.**, v. 284, p. 65-76, 1996.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W.; VALE, W. W. Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, n. 6, p. 1883-1887, 1984.

SAWCHENKO, P. E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. **J. Comp. Neurol.**, v. 402, n. 4, p. 435-441, 1998.

SAWCHENKO, P. E.; BROWN, E. R.; CHAN, R. K.; ERICSSON, A.; LI, H. Y.; ROLAND, B. L.; KOVACS, K. J. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. **Progr. Brain Res.**, v. 107, p. 201-222, 1996.

SCHARRER, E. Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen (Untersuchungen iiber das Zwischenhirn der Fische I). **Z. Vergl. Physiol.**, v. 7, p. 1-38, 1928.

SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. **Vet. Res. Commun.**, v. 25, p. 271-287, 2001.

SCHER, J.; WANKIEWICZ, E.; BROWN, G.M.; FUJIEDA, H. Melatonin receptor in the human retina: expression and localization. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43, p. 889-897, 2002.

SCHMIDT, F.; PENKA, B.; TRAUNER, M.; REINSPERGER, L.; RANNER, G.; EBNER, F.; WALDHAUSER, F. Lack of pineal growth during childhood. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, n. 4, p. 1221-1225, 1995.

SCHMITZ, C.; RHODES, M.E.; BLUDAU, M.; KAPLAN, S.; ONG, P.; UEFFING, I.; VEHOFF, J.; KORR, H.; FRYE, C. A. Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. **Mol. Psychiatry**, v. 7, p. 810-813, 2002.

SCHWAB, I. R.; O'CONNOR, G. R. The lonely eye. **Brit. J. Ophthalmol.**, v. 89, n. 3, p. 256, 2005.

SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. **Life Sci.**, v. 62, n. 22, p. 1985-1998, 1998.

SEKIYAMA, H. U.; KASHIWAMURA, S.; NISHIDA, K. et al. A role of the adrenal gland in stress-induced up-regulation of cytokines in plasma. **J. Neuroimmunol.**, v. 171, p. 38-44, 2006.

SELMAOUI, B.; LAMBROZO, J.; TOUITOU, Y. Magnetic fields and pineal function in humans: evaluation of nocturnal acute exposure to extremely low frequency magnetic fields on serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms. **Life Sci.**, v. 58, p. 1539-1549, 1996.

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 6, p. 117–230, 1946.

SELYE, H.; JENSEN, H. The chemistry of the hormones. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 15, p. 347-360, 1946.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SENAY, E. C.; LEVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 124, p. 1221-1223, 1967.

SHERMAN, I. J.; KRETZER, R. M.; TAMARGO, R. J. Personal recollections of Walter E. Dandy and his brain team. **J. Neurosurg.**, v. 105, n. 3, p. 487-493, 2006.

SHIOTANI, Y.; YAMANO, M.; SHIOSAKA, S.; EMSON, P. C.; HILLYARD, C. J.; GIRGIS, S.; MCINTYRE, I. Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. **Neurosci. Lett.**, v. 70, p. 187-192, 1986.

SIGOLA, L. B.; ZINYAMA, R. B. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. **Immunology**, v. 100, p. 359-363, 2000.

SILENE, W. Experimental models of gastric ulceration and injury. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. 395–402, 1988.

SIMÕES, R. L. M. **Imaginação material segundo Gaston Bachelard.** 78f. Dissertação (Mestrado em Filosofia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SIMONNEAUX, V.; OUICHOU, A.; CRAFT, C.; PÉVET, P. Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. **J. Neurochem.**, v. 62, p. 2464-2471, 1994.

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

SISSON, W. R.; FINNEY, J. M. T. Effect of feeding the pineal body upon the development of the albino rat. **J. Exper. Med.**, v. XXXI, p. 335-347, 1920.

SKRIBANEK, Z.; BALASPIRI, L.; MAK, M. Interaction between synthetic amyloid-beta-peptide (1–40) and its aggregation inhibitors studied by electrospray ionization mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 36, p. 1226-1229, 2001.

SKWARLO-SONTA, K. Melatonin in immunity: comparative aspects. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 1, p. 61-66, 2002.

SKWARLO-SONTA, K.; MAJEWSKI, P.; MARKOWSKA, M.; OBLAP, R.; OLSZANSKA, B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, n. 4, p. 342-349, 2003.

SMOAK, K. A.; CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mech. Ageing Dev.**, v. 125, p. 697-706, 2004.

SO, E. Y.; KIM, S. H.; PARK, H. H.; CHO, B. S. LEE, C. E. Corticosteroid inhibits IL-4 signaling through down-regulation of IL-4 receptor and STAT6 activity. **FEBS Lett.**, v. 518, p. 53-9, 2002.

SOLLEVELD, H. A.; GORGACZ, E. J.; KOESTNER, A. Central nervous system neoplasms in the rat. **Guides for Toxicologic Pathology.** Washington: STP/ARP/AFIP, 1991.

SOLOMON, G. F.; AMKRAUT, A. A. Psychoneuroendocrinological effects on the immune response. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 35, p. 155-184, 1981.

SORRELLS, S. F.; CASO, J. R.; MUNHOZ, C. D.; SAPOLSKY, R. M. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 33-39, 2009.

SOUZA, M. H. L. P.; LEMOS, H. P.; OLIVEIRA, R. B.; CUNHA, F. Q. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. **Gut**, v. 53, p. 791-796, 2004.

SPARKS, D. L. Anatomy of a new paired tract of the pineal gland in humans. **Neurosci. Lett.**, v. 248, p. 179-182, 1998.

SPENCER, W. B. On the presence and structure of the pineal eye in lacertilia. **Q. J. Microsc. Sci.**, p. 165-239, 1886.

SRINIVASAN, V.; PANDI-PERUMAL, S. R.; MAESTRONI, G. J.; ESQUIFINO, A. I.; HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P. Role of Melatonin in neurodegenerative diseases. **Neutox. Res.**, v. 7, p. 293-318, 2005.

STEHLE, J. H.; FOULKES, N. S.; MOLINA, C. A.; SIMONNEAUX, V.; PÉVET, P.; SASSONE-CORSI, P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. **Nature**, v. 365, p. 314-320, 1993.

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, p. 7037-7040, 1995.

STERNENBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 11, p. 2641-2647 1997.

STEYN, W. Observations on the ultrastructure of the pineal eye. **J. Roy. Microsc. Soc.**, v. 79, p. 47-58, 1960.

STEYN, W. Ultrastructure of pineal eye sensory cells. **Nature**, v. 183, p. 764-765, 1959.

STRANGE, K. S.; KERR, L. R.; ANDREWS, H. N.; EMERMAN, J. T.; WEINBERG, J. Psychosocial stressors and mammary tumor growth: an animal model. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 22, p. 89-102, 2000.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, v. 45, p. 922-932, 1989.

SUGDEN, D.; KLEIN, D. C. Beta-adrenergic receptor control of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. **Endocrinology**, v. 113, p. 348-353, 1983.

SUGDEN, D.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C.; KIRK, K. L.; CREVELING, C. R. α-adrenergic potentiation of β-adrenergic stimulation of rat pineal N-acetyltransferase: studies using citazoline and fluorine analogs of norepinephrine. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, p. 3974-3950, 1984.

SUGDEN, L.; SUGDEN, D.; KLEIN, D. C. Alpha 1-adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 741-745, 1987.

SUGIMOTO, Y.; OGAWA, M.; TAI, N.; KAMEI, C. Inhibitory effects of glucocorticoids on rat eosinophil superoxide generation and chemotaxis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 845-852, 2003.

SUMIDA, M.; BARKOVICH, A. J.; NEWTON, T. H. Development of the pineal gland: measurement with MR. **Am. J. Neuroradiol.**, v. 17, n. 2, p. 233-236, 1996.

SUZUKI, H.; ONAKA, T.; KASAI, M.; KAWASAKI, M.; OHNISHI, H.; OTSUBO, H.; SAITO, T.; HASHIMOTO, H.; YOKOYAMA, T.; FUJIHARA, H.; DAYANITHI, G.; MURPHY, D.; NAKAMURA, T.; UETA, Y. Response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene in the hypothalamus of adjuvant-induced arthritic rats. **J. Neuroendocrinol.**, v. 21, n. 3, p. 183-190, 2009.

SWANSON, L. G.; SAWCHENKO, P. E.; RIVIER, J.; VALE, W. W. Organization of ovine corticotrophin-releasing factor immunoreactive celss and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v. 36, p. 165-186, 1983.

SWANSON, L. W. The hypothalamus. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; SWANSON, L. W. **Handbook of chemical neuroanatomy.** - Integrated systems of the CNS, Part I. Amsterdan: Elsevier, 1987. v.5.

SWANSON, L. W.; KUYPER, H. G. J. M. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and the organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J. Comp. Neurol.**, v. 194, p. 555-570, 1980.

SWANSON, L. W.; MOGENSON, G. J. Neural mechanisms for the functional coupling of autonomic, endocrine and somatomotor responses in adaptative behavior. **Brain Res. Rev.**, v. 3, p. 1-34, 1981.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E.; LIND, R. W. Regulation of multiple petides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. **Prog. Brain Res.**, v. 68, p. 169-190, 1986.

TAGAY, S.; HERPERTZ, S.; LANGKAFEL, K. M.; SENF, W. Posttraumatic stress disorder in a psychosomatic outpatient clinic. Gender effects, psychosocial functioning, sense of coherence, and service utilization. **J. Psychosom. Res.**, v. 58, p. 439-446, 2005.

TAKAHASHI, J. S. ICER is nicer at night (sir!). **Curr. Biol.**, v. 4, p. 165-168, 1994.

TAKAKI, Q. H.; HUANG, A.; SOMOGYVARI-VIGH; ARIMURA, A. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. **Neuroimmunomodulation**, v. 1, p. 335–342, 1994.

TAMAKI, N.; SHIRATAKI, K.; LIN, T.; MASUMURA, M.; KATAYAMA, S.; MATSUMOTO, S. Cysts of the pineal gland. **Child Nerv. Syst.**, v. 5, p. 172, 1989.

TAPP, E.; HUXLEY, M. The weight and degree of calcification of the pineal gland. **J. Pathol.**, v. 105, p. 31-39, 1971.

TAPP. E.; HUXLEY, M. The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. **J. Pathol.**, v. 108, p. 137–144, 1972.

TESKEY-GERSTL, A.; BAMBERG, E.; STEINECK, T.; PALME, R. Excretion of corticosteroids in urine and faeces of hares (Lepus europaeus). **J. Comp. Physiol. B**, v. 170, p. 163-168, 2000.

THOMAS, L.; DREW, J. E.; ABRAMOVICH, D. R.; WILLIAMS, L. M. The role of melatonin in the human fetus (review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 1, n. 3, p. 539-543, 1998.

TILLINGER, A.; MYSLIVECEK, J.; NOVÁKOVÁ, M.; KRIZANOVA, O.; KVETNANSKÝ, R. Gene expression of adrenoceptors in the hearts of cold-acclimated rats exposed to a novel stressor. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1148, p. 393-399, 2008.

TOBIN, V. A.; MCCANCE, I.; COLEMAN, H. A.; PARKINGTON, H. C. How important is stimulation of alpha-adrenoceptors for melatonin production in rat pineal glands? **J. Pineal Res.**, v. 32, p. 219-224, 2002.

TOSINI, G. Melatonin circadian rhythm in the retina of mammals. **Chronobiol. Int.**, v. 17, n. 5, p. 599-612, 2000.

TRAMU, G.; CROIX, C.; PILLEZ, A. Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin like-material. **Neuroendocrinology**, v. 37, p. 467-469, 1983.

TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. **Res. Immunol.**, v. 146, p. 423-431, 1995.

TSAI, S. Y.; MCNULTY, J. A. Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. **Glia**, v. 20, p . 243-253, 1997.

TSAI, S. Y.; MCNULTY, J. A. Interleukin-1β expression in the pineal gland of the rats. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 42-48, 1999.

TSAI, S. Y.; SCHLUNS, K. S.; LE, P. T.; MCNULTY, J. A. TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 1135-1141, 2001a.

TSAI, S. Y.; O'BRIEN, T. E.; MCNULTY, J. A. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. **Cell Tissue Res.**,v. 303, p. 433-431, 2001b.

TURNER, W. The pineal body (Epiphysis Cerebri) in the brains of the walrus and seals. **J. Anat. Physiol.**, v. IL, p. 300-303, 1887.

UZ, T.; AKHISAROGLU, M.; AHMED, R.; MANEV, H. The pineal gland is critical for circadian Period1 expression in the striatum and for circadian cocaine sensitization in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 12, p. 2117–2123, 2003.

UZ, T.; DIMITRIJEVIC, N.; AKHISAROGLU, M.; IMBESI, M.; KURTUNCU, M.; MANEV, H. The pineal gland and anxiogenic-like action of fluoxetine in mice. **Neuroreport**, v. 15, n. 4, p. 691–694, 2004.

VACAS, M. I.; DEL ZAR, M. M.; MARTINUZZO, M.; CARDINALI, D. P. Binding sites for [^{3}H]-melatonin in human platelets. **J. Pineal Res.**, v. 13, p. 60-65, 1992.

VALE, W.; RIVIER, C.; BROWN, M. R.; SPIESS, J.; KOOB, G.; SWANSON, L.; BILEZIKJIAN, L.; BLOOM, F.; RIVIER, J. Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. **Rec. Prog. Horm. Res.**, v. 39, p. 245-270, 1983.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, p. 1394-1397, 1981.

VAN DER LAAN, S.; MEIJER, O.C. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 585, p. 483-491, 2008.

VAN OVERVELD, F. J.; DEMKOW, U. A.; GORECKA, D.; ZIELINSKI, J.; DE BACKER, W. A. Inhibitory capacity of different steroids on neutrophil migration across a bilayer of endothelial and bronchial epithelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 477, p. 261-267, 2003.

VAN VUUREN, R. J.; PITOUT, M. J.; VAN ASWEGEN, C. H.; THERON, J. J. Putative melatonin receptor in human spermatozoa. **Clin. Biochem.**, v. 25, p. 125-127, 1992.

VEERMAN, D. P.; IMHOLZ, B. P.; WIELING, W.; WESSELING, K. H.; VAN MONTFRANS, G. A. Circadian profile of sytemic hemodynamics. **Hypertension**, v. 26, p. 55-59, 1995.

VIAU, V.; SAWCHENKO, P. E. Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. repeated restraint stress. **J. Comp. Neurol.**, v. 445, p. 293-307, 2002.

VILJOEN, M.; STEYN, M. E.; VAN RENSBURG, B. W.; REINACH, S. G. Melatonin in chronic renal failure. **Nephron**, v. 60, p. 138-143, 1992.

VILLEGAS, J. Time course of angiogenesis in solid pineal autografts. **Cell Tissue Res.**, v. 315, p. 349-359, 2004.

VISWANATHAN, K.; DAUGHERTY, C.; DHABHAR, F. S. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. **Int. Immunol.**, v.17, n. 8, p. 1059-1069, 2005.

VOLLRATH, L. Comparative morphology of the vertebrate pineal complex. **Prog. Brain Res.**, v. 52, p. 25-38, 1979.

VOLLRATH, L. Functional anatomy of the human pineal gland. In: REITER, R. J. (Ed.) **The pineal gland.** New York: Raven Press, 1984. p. 285-322.

VON TREUER, K.; NORMAN, T. R.; ARMSTRONG, S. M. Overnight plasma melatonin, cortisol, prolactin, TSH, under conditions of normal sleep, sleep deprivation, and sleep recovery. **J. Pineal Res.**, v. 20, p. 7-14, 1996.

VONDRASOVÁ, D.; HÁJEK, I.; ILLNEROVÁ, H. Exposure to long summer days affects the human melatonin and cortisol rhythms. **Brain Res.**, v. 759, p. 166-170, 1997.

VONDRASOVÁ-JELÍNKOVÁ, D.; HÁJEK, I.; ILLNEROVÁ, H. Adjustment of the human melatonin and cortisol rhythms to shortening of the natural summer photoperiod. **Brain Res.**, v. 816, p. 249-253, 1999.

WAGNER, G.; BRANDSTATTER, R.; HERMANN, A. Adrenergic and cholinergic regulation of *in vitro* melatonin release during ontogeny in the pineal gland of Long Evans rats. **Neuroendocrinology**, v. 72, p. 154-161, 2000.

WALDHAUSER, F.; EHRHART, B.; FORSTER, E. Clinical aspects of the melatonin action: impact on development, aging and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. **Experientia**, v. 49, p. 671-681, 1993.

WALTON, P. E.; CRONIN, M. J. Tumor necrosis factor-alfa inhibits growth hormone secretion from cultured human adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 125, p. 925-929, 1989.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; TARTAGLIA, N.; SILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neurosci. Lett.**, v. 183, n. 1-2, p. 27-31, 1995.

WEAVER, D. R.; REPPERT, S. M. The Mel_{1a} melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nucleus. **Neuroreport**, v. 8, p. 109-112, 1996.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 125–163, 2002.

WEHR, T. A.; GIESEN, H. A.; MOUL, D. E.; TURNER, E. H.; SCHWARTZ, P. J. Suppression of men's responses to seasonal changes in day length by modern artificial lighting. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 173-178, 1995.

WEHR, T. A. The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, p. 1276-1280, 1991.

WEIHE, E.; TAO-CHENG, J. H.; SCHÁFER, M. K. H.; ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to specific populations of small synaptic vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 3547-3552, 1996.

WILLIAMS, A. M.; MORILAK, D. A. Alpha1B adrenoceptors in rat paraventricular nucleus overlap with, but do not mediate, the induction of c-Fos expression by osmotic or restraint stress. **Neuroscience**, v. 76, n. 3, p. 901-913, 1997.

WITHYACHUMNARNKUL, B.; NONAKA, K. O.; ATTIA, A. M.; REITER, R. J. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. **J. Pineal Res.**, v. 8, p. 313-322, 1990.

WOLFSON, B.; MANNING, R. W.; DAVIS, L. G.; ARENTZEN, R.; BALDINO, F. Co-localization of corticotrophin releasing factor and vasopressin mRNA in neurons after adrenalectomy. **Nature**, v. 315, p.59-61, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD).** 10. rev., Genebra: WHO, 2007. Disponível em: <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>.Acesso em: 10 jul. de 2010.

WOTJAK, C. T.; GANSTER, J.; KOHL, G.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R.; ENGELMANN, M. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. **Neuroscience**, v. 85, p. 1209-1222, 1998.

WOTJAK, C. T.; KUBOTA, M.; KOHL, G.; LANDGRAF, R. Release of vasopressin from supraoptic neurons within the median eminence in vivo. A combined microdialysis and push-pull perfusion study in the rat. **Brain Res.**, v. 726, p. 237-241, 1996.

WRONA, D. Neural–immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. **J. Neuroimmunol.**, v. 172, p. 38-58, 2006.

WURTMAN, R. J. Melatonin as a hormone in humans: a history. **Yale J. Biol. Med.**, v. 58, p. 547-552, 1985.

WURTMAN, R. J.; LYNCH, H. J.; STURNER, W. Q. Melatonin in humans: possible involvement in SIDS, and use in contraceptives. **Adv. Pineal Res.**, v. 5, p. 319–327, 1991.

YAMADA, H.; OGURA, A.; KOIZUMI, S.; YAMAGUCHI, A.; MORIYAMA, Y. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 4946-4952, 1998.

YAMADA, N.; IWASA, H.; MORI, S.; KUROKAWA, N.; FUJIMOTO, K.; KAWASHIMA, K.; MASUZAWA, T. Melatonin secretion in normal pressure hydrocephalus after cerebral aneurysm rupture-investigation before and after ventriculoperitoneal shunt. **Neurol. Med. Chir.**, v. 31, p. 490-497, 1991.

YIE, S. M.; NILES, L. P.; YOUGLAI, E. V. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, p. 1747-1749, 1995.

YOCCA, F. D.; FRIEDMAN, E. Effect of immobilization stress on rat pineal beta-adrenergic receptor-mediated function. **J. Neurochem.**, v. 42, n. 5, p. 1427-1432, 1984.

YOUNG, J. Z. The photoreceptors of lampreys. II. The functions of the pineal complex. **J. Exp. Biol.**, v. 12, p. 254-270, 1935.

YU, Z. H.; YUAN, H.; LU, Y.; PANG, S. F. [^{125}I]-Iodomelatonin binding sites in spleens of birds and mammals. **Neurosci. Lett.**, v. 125, p. 175-178, 1991.

YUWILER, A. Effects of steroids on serotonin-N-acetyltransferase activity of pineals in organ culture. **J. Neurochem.**, v. 52, p. 46-53, 1989.

ZAFAR, H. M.; PARÉ, W. P.; TEJANI-BUTT, S. M. Effect of acute or repeated stress on behavior and brain norepinephrine system in Wistar-Kyoto (WKY) rats. **Brain Res. Bull.**, v. 44, n. 3, p. 289-295, 1997.

ZHOU, D.; KUSNECOV, A. W.; SHURIN, M. R.; DE PAOLI, M.; RABIN, B. S. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 2523-2530, 1993.

ZIEGLER, D. R.; CASS, W. A.; HERMAN, J. P. Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. **J. Neuroendocrinol.**, v. 11, n. 5, p. 361-369, 1999.

ZISAPEL, N.; MATZKIN, H.; GILAD, E. Melatonin receptors in human prostate epithelial cells. In: TOUITOU, Y. (Ed.) **Biological clocks** - mechanisms and applications. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 295-299.

ZOELLER, R. T.; KABEER, N.; ALBERS, H. E. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. **Endocrinology**, v. 127, p. 2955-2962, 1990.

ZUCKERMAN-LEVIN, N.; TIOSANO, D.; EISENHOFER, G.; BORNSTEIN, S.; HOCHBERG, Z. The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: a study in isolated glucocorticoid deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 12, p. 5920-5924, 2001.