DARINE CHRISTINA MAIA VILLELA

**SÍNTESE DE MELATONINA NA GLÂNDULA
PINEAL DE RATOS: MODULAÇÃO PELO
GLUTAMATO**

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

São Paulo

2008

DARINE CHRISTINA MAIA VILLELA

**SÍNTESE DE MELATONINA NA GLÂNDULA
PINEAL DE RATOS: MODULAÇÃO PELO
GLUTAMATO**

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

São Paulo

2008

DARINE CHRISTINA MAIA VILLELA

**SÍNTESE DE MELATONINA NA GLÂNDULA
PINEAL DE RATOS: MODULAÇÃO PELO
GLUTAMATO**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Solange Castro Afeche

São Paulo

2008

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

reprodução não autorizada pelo autor

Villela, Darine Christina Maia.

Síntese de Melatonina na glândula pineal de ratos: modulação pelo glutamato / Darine Christina Maia Villela. – São Paulo, 2007.

Orientador: Solange Castro Afeche.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de Pesquisa: Fisiologia celular da glândula Pineal.

Versão do título para o inglês: Glutamate modulation of melatonin synthesis in the rat pineal gland.

Descritores: 1. Glândula Pineal 2. Melatonina 3. Glutamato 4. NF-kB 5. Pinealócitos 6. Astrócitos I. Afeche, Solange Castro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB207/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Darine Christina Maia Villela.

Título da Dissertação: Síntese de melatonina na glândula pineal de ratos:
modulação pelo glutamato.

Orientador(a): Solange Castro Afeche

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **091** nas fls. **19** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Cipolla Neto, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Síntese de melatonina na glândula pineal de ratos: modulação pelo glutamato**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Diego di Piazza Pimentel** e os pesquisadores **Solange Castro Afeche**, **Cristoforo Scavone** e **José Cipolla Neto**, 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 (CEEAA)** em **23.08.2005**.

São Paulo, 23 de agosto de 2005.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Departamento de Bioquímica

ATESTADO

Atesto, para os devidos fins, que **Darine Christina Maia Villela** participou do curso de Proteção Radiológica, oferecido no Instituto de Química, Universidade de São Paulo, no período de 21 de novembro a 04 de dezembro de 2007.

São Paulo, 04 de dezembro de 2007

Carla Columbano de Oliveira
Presidente da Comissão de Radioproteção
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio e incentivo constante em minha vida

Nelson de Campos Villela

Marcia Helena Maia Villela

Caio Vinicius Maia Villela

Carolina de Campos Villela

Nelson Alves Villela (“in memorian”)

Muito Obrigada!

À minha orientadora Profa Dra Solange Castro Afeche pela
atenção e paciência que sempre teve comigo, mas sobretudo por
ter feito parte da minha formação profissional.

Sula, Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cristóforo Scavone pela colaboração e auxílio prestados durante o desenvolvimento desse trabalho

Ao Prof. Dr. José Cipolla Neto por ter me recebido em seu laboratório e contribuído para realização desse trabalho

À Julieta Scialfa pela amizade e inestimável ajuda

À Larissa Lima pelo apoio técnico durante a execução desse trabalho

Aos funcionários e amigos do Instituto Butantan, em especial Mariana Abrahão, Anderson Mouto e Diego Di Piazza, com quem pude compartilhar experiências no laboratório

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia que sempre me ajudaram quando precisei, Rafael Peres, Sabrina H. José dos Santos, Fernanda Amaral, Simone Ferreira, Rodrigo A.P. Garcia, Ana Carolina Franco, Daniella Buonfiglio

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro

À Deus por conceder-me a benção de mais uma vitória

Enfim, a todos que contribuíram para a concretização desse trabalho

Obrigada!

- *“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

Villela, DC. Síntese de melatonina na glândula pineal de ratos: modulação pelo glutamato [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Esse trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do glutamato sobre a síntese da melatonina, avaliando a participação dos diferentes tipos de receptores e uma possível interação entre os dois tipos celulares predominantes na glândula pineal, os pinealócitos e os astrócitos. Também se pretendeu avaliar o papel do fator de transcrição NF-kB nos efeitos modulatórios do glutamato sobre a síntese de melatonina, uma vez que já foi demonstrado que o glutamato é um ativador do NF-kB em diversos tipos celulares. Para tanto, glândulas pineais de ratos machos Wistar foram mantidas em cultura e estimuladas com diferentes concentrações de glutamato e com diversos agonistas glutamatérgicos. Foram feitas também culturas de pinealócitos isolados, além de co-culturas de pinealócitos e astrócitos. A melatonina liberada foi quantificada em HPLC com detecção eletroquímica. Para a caracterização dos diversos tipos de receptores para glutamato foi feita uma análise de RT-PCR, e a indução do aumento do cálcio intracelular pelos diferentes agonistas glutamatérgicos foi avaliada por microscopia confocal em astrócitos e pinealócitos isolados. A ativação do NF-kB foi avaliada por ensaio de gel de retardo. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o glutamato inibe a síntese de melatonina na glândula pineal em cultura, e que os receptores envolvidos nessa inibição são os receptores metabotrópicos dos grupos I e II e o receptor ionotrópico do tipo AMPA. A provável participação dos astrócitos neste efeito inibitório do glutamato sobre a síntese de melatonina ficou evidente quando pinealócitos isolados foram incubados com glutamato e não foi observada nenhuma redução na síntese de melatonina. A análise de RT-PCR juntamente com a avaliação do cálcio intracelular por microscopia confocal, sugerem uma expressão dos receptores metabotrópicos do grupo I e dos receptores ionotrópicos do tipo AMPA e NMDA em astrócitos. Nossos resultados também sugerem que as ações do glutamato sobre a síntese da melatonina são mediadas pela ativação do NF-kB dos astrócitos, e que a ativação do NF-kB tem um papel importante na síntese da melatonina, uma vez que o inibidor do NF-kB, PDTC, inibiu significativamente a síntese de melatonina induzida por noradrenalina. Apesar de já ter sido demonstrado, em outros modelos celulares, que o glutamato em altas concentrações e uma inibição da via do NF-kB pode

induzir morte celular, através da citometria de fluxo foi evidenciado que, mesmo altas concentrações de glutamato ou uma incubação com PDTC em glândulas mantidas em cultura por 5 horas, as células contidas na pineal se mantêm íntegras, indicando que os efeitos inibitórios causados por essas drogas na síntese de melatonina não estão associados à morte celular.

Palavras-chave: Glândula pineal, Melatonina, Glutamato, NF-kB, Pinealócitos, Astrócitos.

ABSTRACT

Villela, DC. Glutamate modulation of melatonin synthesis in the rat pineal gland [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

The aim of this work was to study the effects of glutamate on melatonin synthesis. It was investigated the role played by the glutamate receptors and a possible interaction between the two predominant cell types of the pineal gland, pinealocytes and astrocytes. In addition, it was studied the involvement of the transcription factor NF- κ B on the glutamate effects. To accomplish these aims, rat pineal glands were kept in culture and stimulated with glutamate and glutamatergic agonists. Isolated pinealocytes or in association with astrocytes in culture were also stimulated with glutamate. Melatonin was quantified by HPLC with electrochemical detection. Glutamate receptors were characterized by RT-PCR and intracellular calcium was analyzed by confocal microscopy. NF- κ B activation was evaluated by gel shift assay. From the results it is possible to conclude that glutamate inhibits melatonin synthesis and the receptors involved in this inhibition are groups I and II metabotropic receptors and ionotropic receptor AMPA. The inhibitory effect of glutamate on melatonin synthesis seems to be mediated by the interaction between astrocytes and pinealocytes. RT-PCR analysis together with intracellular calcium analyzed by confocal microscopy, in isolated astrocytes, suggest an expression of group I metabotropic receptors and ionotropic receptors AMPA and NMDA in astrocytes. Our results also suggest that the effects of glutamate on melatonin synthesis are mediated by activation of NF- κ B in astrocytes, and the NF- κ B's inhibitor, PDTC, significantly reduced melatonin synthesis, indicating that NF- κ B activation plays an important role on noradrenaline-induced melatonin synthesis. Although it has been demonstrated in several cell types that high concentrations of glutamate or inhibition of NF- κ B pathway can induce cell death, we showed by flow cytometry that in our model, pineal glands maintained in culture for 5 hours, the pineal cells remain viable, indicating that the inhibitory effects caused by these drugs on melatonin synthesis are not associated with cell death.

Key words: Pineal gland, Melatonin, Glutamate, NF- κ B, Pinealocytes, Astrocytes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação rítmica diária e sazonal da síntese de melatonina.	23
Figura 2. Dissecção de um cérebro humano mostrando a glândula pineal in situ. (seta).....	24
Figura 3. Representação esquemática de um corte sagital do complexo pineal em roedores.....	24
Figura 4. Corte histológico mostrando os dois tipos celulares predominantes na glândula pineal.....	26
Figura 5. Sistema fotoneuroendócrino formado pela retina, núcleo supraquiasmático e a glândula pineal.	27
Figura 6. Representação esquemática das vias intracelulares, na glândula pineal de roedores, deflagradas após a ação da noradrenalina sobre os receptores α e β -adrenérgicos durante o período noturno.....	30
Figura 7. Vias metabólicas envolvidas com a síntese e a degradação da melatonina.	34
Figura 8. Gráficos mostrando as variações da concentração dos componentes da via de síntese da melatonina ao longo do dia.....	35
Figura 9. Sinapse tripartida.....	41
Figura 10. Membros das famílias do NF- κ B, I κ B e IKK.....	45
Figura 11. Vias de sinalização do NF- κ B.	46
Figura 12. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença do glutamato associado ou não ao antagonista MK-801.....	62
Figura 13. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença do agonista AMPA.	62
Figura 14. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença dos agonistas DHPG e LCCG.	63
Figura 15. Efeito do glutamato sobre a atividade da enzima AANAT, em cultura de glândula pineal estimulada com noradrenalina 1 μ M.....	63
Figura 16. Melatonina secretada para o meio de cultura por pinealócitos isolados estimulados com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença de glutamate.	64
Figura 17. Conteúdo de melatonina do meio de cultura de pinealócitos cultivados em co-cultura com astrócitos e estimulados com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de glutamato.	64
Figura 18. Análise de RT-PCR para presença de receptores metabotrópicos de glutamato em astrócitos e pinealócitos isolados.....	65
Figura 19. Análise de RT-PCR para a presença das subunidades do receptor ionotrópico do tipo AMPA e da subunidade do receptor inotrópico do tipo NMDA (NR1) em astrócitos e pinealócitos isolados.....	66
Figura 20. Aumento do cálcio intracelular em astrócitos isolados estimulados com agonistas glutamatérgicos.	67
Figura 21. Ensaio de gel de retardo para o NF κ B, em cultura de glândula pineal.	68
Figura 22. Ensaio de competição (super-shif) em glândulas pineais estimuladas com noradrenalina 1 μ M.	69

Figura 23. Ensaio de competição (super-shif) em glândulas pineais estimuladas com 2 concentrações diferentes de glutamato.....	69
Figura 24. Ensaio de gel de retardo para o NFκB em cultura de astrócitos isolados.....	70
Figura 25. Ensaio de gel de retardo para o NFκB, em cultura de pinealócitos isolados.....	71
Figura 26. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1μM, na ausência ou na presença do PDTC (300μM).....	72
Figura 27. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1μM, na ausência ou na presença do glutamato e do PDTC (300μM).....	72
Figura 28. Avaliação da viabilidade celular em glândulas pineais estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com glutamato 100uM (B) ou glutamato 600uM (C) após um período de incubação de 5 horas.....	73
Figura 29. Avaliação da fragmentação do DNA de células da glândula pineal estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com glutamato 100uM (B) e glutamato 600u (C) no período de incubação de 5 horas.....	74
Figura 30. Avaliação da viabilidade celular em glândulas pineais estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com PDTC 300uM (B) após um período de incubação de 5 horas.	75
Figura 31. Avaliação da fragmentação do DNA de células da glândula pineal estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com PDTC 300uM (B) após um período de incubação de 5 horas.	76

LISTA DE QUADROS

<i>Quadro 1. Seqüência dos primers, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos amplificados para os diversos receptores de glutamato.</i>	<i>54</i>
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AANAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoazolepropionico
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
AVP	vasopressina arginina
AVT	vasotocina arginina
CaMK	quinase dependente de cálcio e calmodulina
CBP	“CREB-binding protein”
CC	“coiled coil”
CRE	“cyclic AMP-inducible promoter element”
CREB	“cAMP-inducible promoter element”
DHPG	3,5 Dihidroxifenilglicina
DREAM	“downstream regulatory element antagonist modulator”
Fra-2	“Fos-related antigen -2”
GMPc	guanosina monofosfato cíclica
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
HLH	hélice-alça-hélice
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICER	“inducible cAMP early repressor”
iGluRs	receptores inotrópicos de glutamato
I κ Bs	proteínas inibidoras do NF- κ B
IP ₃	trifosfato de inositol
JunB	Jun B proto-oncogene
KA	cainato
LCCG	(2S,3S,4S)-CCG/(2S,1`S,2`S)-2-Carboxiciclopropil glicina
LZ	zíper de leucina
MAO	monoamina: O ₂ oxidoreductase
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
mGluRs	receptores metabotrópicos de glutamato
n	número de amostras
NBD	domínio de ligação a NEMO
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NLS	seqüência de localização nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico

NOS	óxido nítrico sintetase
NPVH	núcleo paraventricular hipotalâmico
NPY	neuropeptídeo Y
NSQ	núcleo supraquiasmático
PDTC	Ditiocarbamato de pirrolidina
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
RHD	domínio homólogo Rel
sGC	guanilato ciclase citosólica
SNC	sistema nervoso central
TAD	domínio de ativação transcricional
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TPH	triptofano hidroxilase
VIP	peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	21
1	Glândula Pineal	21
1.1	<i>Histórico da Glândula Pineal</i>	21
1.2	<i>Papel da Melatonina na Regulação da Ritmicidade Biológica</i>	22
1.3	<i>Estrutura da Glândula Pineal</i>	23
1.3.1	<i>Anatomia</i>	23
1.3.2	<i>Inervação</i>	25
1.3.3	<i>Histologia</i>	25
1.3.4	<i>Controle Neural da Produção de Melatonina</i>	26
1.4	<i>Bioquímica da Glândula Pineal</i>	27
1.4.1	<i>Controle da Síntese de Melatonina: Mecanismos Noradrenérgicos Simpáticos</i>	27
1.4.2	<i>Síntese de Melatonina</i>	30
2	Glutamato	36
2.1	<i>Receptores para o Glutamato</i>	36
2.2	<i>Papel da Acetilcolina na Modulação da Síntese de Melatonina pelo Glutamato</i>	37
3	Papel das Células da Glia no Sistema Nervoso Central	38
4	O Fator de Transcrição NF-kB e sua Ativação	42
II.	OBJETIVOS	47
III.	MATERIAIS E MÉTODOS	48
1	Animais	48
2	Cultura de Glândula Pineal	48
3	Cultura de Pinealócitos Isolados	49
4	Cultura de Astrócitos Isolados	50
5	Co-cultura de Pinealócitos e Astrócitos	50
6	Microscopia Confocal	50
6.1	<i>Astrócitos Isolados</i>	50
7	Quantificação da Melatonina	51
8	Medição Radiométrica da Atividade da AANAT	52
9	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR)	52
9.1	<i>Extração do RNA total</i>	52
9.2	<i>Obtenção do cDNA e Amplificação dos Genes de Interesse por PCR</i>	53
10	Ensaio de Gel de Retardo (Electrophoretic Mobility Gel Shift Assay – EMSA) para o NF-kB	54
10.1	<i>Extração de Proteínas Nucleares de Tecido</i>	54
10.2	<i>Extração de Proteínas Nucleares de Células</i>	55

10.3	<i>Marcação da Sonda</i>	55
10.4	<i>Reação de Ligação e Corrida do gel</i>	55
10.5	<i>Revelação</i>	56
11	Avaliação da Taxa de Necrose e Apoptose dos Pinealócitos por Citometria de Fluxo.	56
12	Análise Estatística	57
13	Grupos Experimentais	57
IV.	RESULTADOS	59
V.	DISCUSSÃO	77
VI.	CONCLUSÕES	85
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

I. INTRODUÇÃO

1 Glândula Pineal

1.1 *Histórico da Glândula Pineal*

A glândula pineal, também chamada de corpo pineal ou epífise, teve muitas denominações ao longo do tempo. Há mais de vinte séculos esta discreta estrutura cerebral vem despertando a curiosidade do Homem. Sua localização particular poderia explicar esse fato, pois ela possui uma formação ímpar e se localiza na parte superior do encéfalo, ocupando aproximadamente o centro do crânio.

O relato mais antigo sobre a pineal foi feito pelo médico grego Herófilo (325-280 a.C.) há cerca de 300 anos a.C. Ele considerava que a pineal era uma espécie de válvula que regularia o fluxo do spiritus (ou pneuma), através do terceiro e quarto ventrículos. Acreditava-se que o spiritus era derivado do ar e transformado em spiritus animalis no sistema ventricular cerebral, e que este seria a causa de todo o desenvolvimento do conhecimento humano. Contudo, anos mais tarde, o médico e filósofo grego Galeno (130-200 d.C.), após verificar que a pineal está localizada fora do sistema ventricular, sugeriu que esta se tratava de uma glândula linfática, a qual também possuía uma ligação com o sangue. Uma descrição mais precisa sobre a glândula pineal foi feita pelo médico belga Vesalius (1514-1564), no século XVI, o qual considerou a glândula como um fino sistema vascular (Arendt, 1995; Simonneaux & Ribelayga, 2003).

No século XVII, o influente filósofo francês René Descartes (1596-1650) ainda fortemente influenciado pelos antigos gregos, denominou a glândula pineal como a “sede da alma”. Na sua concepção, a pineal controlaria o fluxo do spiritus animalis até os nervos motores e dessa forma influenciaria os movimentos do corpo. Ele acreditava que o estímulo para a função da pineal vinha de uma entrada visual – essa foi a primeira referência relacionando a glândula pineal com os olhos. Esses conceitos antigos permaneceram durante muitos séculos, e de alguma forma influenciaram as percepções sobre a glândula pineal até meados do século XX, o que explicaria o lento progresso das pesquisas sobre a pineal por justamente acreditarem que esta não era cientificamente respeitável (Arendt, 1995; Simonneaux & Ribelayga, 2003).

No entanto, em toda a história sobre a glândula pineal, nada é mais importante do que o isolamento e a caracterização de seu hormônio, a melatonina, por Aaron Lerner e colaboradores em 1959 (Lerner *et al*, 1959). A partir deste momento, surgiram muitos outros trabalhos com estudos detalhados sobre os mecanismos de funcionamento da pineal e as ações da melatonina, mostrando sua importância na modulação dos ritmos circadianos e sazonais e também de muitos processos bioquímicos, metabólicos e comportamentais.

1.2 Papel da Melatonina na Regulação da Ritmicidade Biológica

Presente em todos os animais vertebrados, e tendo a mesma origem embriológica que os olhos laterais, a glândula pineal de peixes, anfíbios, alguns répteis e algumas aves é diretamente fotossensível, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina de mamíferos. Nessas mesmas classes, além de sua característica endócrina, a glândula pineal mantém conexões, tanto aferentes quanto eferentes, com o sistema nervoso central (SNC) através do pedúnculo pineal. Em mamíferos, no entanto, apesar de manter seu caráter endócrino, os pinealócitos perdem sua capacidade fotorreceptiva e a pineal passa a estar sob o controle do SNC principalmente através do simpático cervical e as influências do ciclo de iluminação ambiental passam a se dar de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas, que projetando-se indiretamente para os neurônios pré-ganglionares, podem, através da inervação simpática periférica, atingir a glândula pineal (Markus *et al*, 2003).

Comum a todos os vertebrados, a glândula pineal é, portanto, um órgão endócrino cuja produção hormonal é controlada, de forma direta ou indireta, pelo ciclo de iluminação ambiental característico do dia e da noite. Esse controle é tal que, na enorme maioria das espécies estudadas (seja de atividade diurna, noturna ou crepuscular), a produção de melatonina é exclusivamente noturna e a magnitude e duração de sua concentração na circulação sistêmica está na estrita dependência da duração do período de escuro. Dessa forma, a melatonina circulante tem, também, seu perfil plasmático variável de acordo com as noites mais longas ou mais curtas típicas das diversas estações do ano (Figura 1) (Markus *et al*, 2003; Cipolla-Neto & Afeche, 1999).

Essa característica de produção noturna da melatonina determina, portanto, o papel fisiológico da glândula pineal: sinalizar para o meio interno, através da presença e ausência diária de melatonina na circulação, se é noite ou dia no meio exterior e, ainda, através das características do seu perfil plasmático noturno, qual é a estação do ano. É importante ressaltar, ainda, que o perfil plasmático diário da melatonina apresenta uma variação

característica ao longo do desenvolvimento ontogenético dos mamíferos: a sua produção e secreção são máximas na infância, apresentam uma pequena redução na puberdade, estabilizam-se na fase de adulto jovem, reduzindo, consideravelmente em animais idosos. Essas características de produção e secreção da melatonina durante o desenvolvimento fazem dela, também, um importante marcador temporal ontogenético, promovendo processos adaptativos desde a infância até a velhice (Cipolla-Neto & Afeche, 1999).

Em função desse papel de temporizador do meio interno (diário, sazonal e ontogenético), a glândula pineal, principalmente através da secreção da melatonina, está envolvida na regulação das mais diversas funções fundamentais para a sobrevivência do indivíduo e da espécie, como por exemplo: regulação endócrina, metabólica e reprodutiva; regulação do ciclo atividade-reposo, em particular do sono-vigília; regulação dos sistemas imunológico e cardiovascular, entre outras.

Figura 1.Variação rítmica diária e sazonal da síntese de melatonina.

1.3 Estrutura da Glândula Pineal

1.3.1 Anatomia

A glândula pineal é uma estrutura epitalâmica pequena e única, que surge de uma evaginação do diencéfalo (Figura 2). Na maioria dos mamíferos ela forma uma massa sólida entre as comissuras posterior e habenular, e freqüentemente está associada ao III ventrículo; ela também retém um pedúnculo o qual se conecta com a comissura habenular, e a área do III ventrículo que recebe esse pedúnculo é conhecida como recesso pineal. Em roedores, a pineal apresenta três porções distintas formando o complexo pineal: (1) pineal profunda e (2) pedúnculo pineal, os quais se mantêm próximos ao III ventrículo, e a maior porção da

glândula migra na direção dorso-caudal para formar a (3) pineal superficial (Figura 3). Em roedores, a parte superficial da glândula pineal é maciçamente innervada e contém uma densa rede de vasos sanguíneos na qual a melatonina é liberada (Vollrath, 1981; Arendt, 1995; Simonneaux & Ribelayga, 2003).

O peso e o volume da pineal variam muito dentro de uma mesma espécie e entre as espécies e também no que se diz respeito à idade e ao *status* fisiológico. O volume da pineal é correlacionado ao peso corporal das diferentes espécies; a média de peso da pineal de um rato adulto é geralmente entre 0,9 e 1,59 mg, enquanto que a pineal humana de um adulto pesa entre 100 e 150mg (Arendt, 1995).

Figura 2. Dissecção de um cérebro humano mostrando a glândula pineal *in situ*. (seta)
FONTE: Vollrath L, 1981.

Figura 3. Representação esquemática de um corte sagital do complexo pineal em roedores. CH, comissura habenular; Cp, comissura posterior; PI, plexo coróide; SCO, órgão subcomissural; III, terceiro ventrículo; DP, pineal profunda; PS, pedúnculo pineal; SP, pineal superficial.
FONTE: Modificada de Vollrath L, 1981.

1.3.2 Inervação

Em vertebrados inferiores, a glândula pineal apresenta tanto conexões aferentes como eferentes; no entanto, durante a filogênese a inervação eferente desaparece e em mamíferos a inervação mais importante se origina das fibras simpáticas pós-ganglionares vindas do gânglio cervical superior. A inervação simpática é sem dúvida essencial para a produção de melatonina, suas células nervosas são adrenérgicas e possuem seus corpos celulares localizados no gânglio cervical superior. As fibras adrenérgicas simpáticas seguem o curso dos vasos sanguíneos e atingem a glândula pineal através dos nervos conários. Acredita-se que as fibras adrenérgicas terminam dentro da pineal, no espaço perivascular, e que o neurotransmissor liberado, o qual em mamíferos é principalmente a noradrenalina, se difunda através do espaço perivascular para alcançar as células-alvo (Vollrath, 1981, Arendt, 1995).

Além da inervação simpática, a glândula pineal também recebe inervação parassimpática e central. A presença de uma inervação parassimpática na glândula pineal tem sido muito discutida. No entanto, neurônios parassimpáticos, cujos corpos celulares originando-se no gânglio pterigopalatino e no gânglio ótico juntamente com a demonstração de fibras colinérgicas na pineal de rato, coelho, macaco e ovelha demonstram de fato a existência de uma via parassimpática na pineal. Além disso, a demonstração da presença de receptores e de efeitos bioquímicos de ligantes colinérgicos na pineal confirmam a existência de um controle parassimpático na sua atividade (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Estudos eletrofisiológicos, neuroanatômicos e imuno-histoquímicos demonstraram a existência de projeções centrais diretas sobre a glândula pineal terminando em sua maior parte na pineal profunda. Essas projeções originam-se em diversas regiões do SNC, dentre os quais o folheto intergeniculado talâmico, núcleo paraventricular hipotalâmico, hipotálamo lateral, núcleo dorsal da rafe e o núcleo habenular. Cipolla-Neto *et al* (1995) demonstraram que o folheto intergeniculado talâmico parece ser uma estrutura importante no processo de inibição da síntese de melatonina durante uma fotoestimulação noturna de curta duração. Os neurotransmissores presentes nessas fibras nervosas centrais são principalmente neuropeptídeos, em especial o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o neuropeptídeo Y (NPY), a vasopressina (AVP) e a vasotocina (AVT) (Arendt, 1995).

1.3.3 Histologia

A glândula pineal de mamíferos consiste de vários tipos celulares, sendo que cerca de 90% correspondem a pinealócitos, que são as células neuroendócrinas responsáveis por sintetizar e liberar o hormônio melatonina na circulação sistêmica. Além de pinealócitos, o

parênquima da pineal também compreende uma porcentagem de células da glia (Figura 4). Resultados obtidos através de estudos imunohistoquímicos, usando anticorpos contra proteínas marcadoras de células da glia como a vimentina, proteína GFAP e S-100, mostraram que essas células são de fato, na sua grande maioria, astrócitos; mas também foi demonstrada a presença de macrófagos/microglia. A existência de outros tipos de células da glia na pineal, como por exemplo: oligodendrócitos, localizados principalmente no pedúnculo pineal e de células ependimais, originadas do III ventrículo e localizadas no recesso pineal também já foi identificada (Vollrath, 1981, Calvo *et al*, 1988).

Figura 4. Corte histológico mostrando os dois tipos celulares predominantes na glândula pineal. Pi, pinealócito; As, astrócito.

1.3.4 Controle Neural da Produção de Melatonina

A síntese de melatonina depende de uma via neural que começa nas células ganglionares da retina, as quais através da via retino-hipotalâmica, projetam-se para o hipotálamo principalmente para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Os neurônios dos NSQ projetam-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPVH). O sistema neural responsável pela produção de melatonina origina-se nos NPVH, enquanto que os NSQ, capazes de gerar a ritmicidade endógena e funcionando como verdadeiros relógios biológicos, são responsáveis pela sincronização da síntese de melatonina ao ciclo de claro-escuro ambiental, de tal forma que a produção de melatonina se concentre mais durante à noite (Arendt, 1995, Cipolla-Neto & Afeche, 1999).

As características funcionais das conexões entre esses dois núcleos mostram que os neurônios dos NSQ são mais ativos, tanto metabolicamente quanto eletricamente, durante o

dia. Portanto, os NSQ ao liberarem o neurotransmissor inibitório GABA, durante o período de claro, inibem os neurônios do NPVH e, conseqüentemente, toda a via de síntese de melatonina. Já no período noturno, os neurônios dos NSQ possuem uma atividade elétrica menor, não liberam GABA, permitindo dessa maneira que todo o restante da via de síntese de melatonina seja ativada (Markus *et al*, 2003).

A via neural responsável pela produção de melatonina se continua com a projeção direta ou indireta dos NPVH para a região torácica da medula espinhal, na coluna intermédio-lateral, sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Estes enviam seus axônios aos gânglios cervicais superiores, os quais pelos ramos carotídeos internos e nervos coronários, projetam-se maciçamente sobre a glândula pineal (Figura 5) (Cipolla-Neto & Afeche, 1999).

Figura 5. Sistema fotoneuroendócrino formado pela retina, núcleo supraquiasmático e a glândula pineal.

O gráfico mostra a oscilação dos níveis de melatonina na glândula pineal de humanos com relação às horas do dia. RET, retina; RHT, trato retinohipotalâmico; SCN, núcleo supraquiasmático; PVN, núcleo paraventricular; IMC, coluna intermédio-lateral da medula espinhal; SCG, gânglio cervical superior; NA, noradrenalina; PIN, pineal; MEL; melatonina.

FONTE: Modificada de Maronde E & Stehle JH, 2007

1.4 Bioquímica da Glândula Pineal

1.4.1 Controle da Síntese de Melatonina: Mecanismos Noradrenérgicos Simpáticos.

Durante o período noturno, a noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos que inervam a glândula pineal atua em receptores α e β -adrenérgicos presentes na membrana dos

pinealócitos e desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares resultando na síntese de melatonina. A estimulação dos receptores β (subtipo β_1) promove um aumento do AMPc intracelular através da ativação de uma proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilato ciclase. A estimulação dos receptores α (subtipo α_{1B}) ativa uma proteína Gq ligada à estimulação da fosfolipase C, gerando trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol. O IP₃, atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação do cálcio desses estoques, tendo como consequência um aumento do cálcio intracelular. O aumento do cálcio induzido por noradrenalina caracteriza-se por um pico seguido de um platô. A rápida elevação do cálcio deve-se à liberação do retículo (Schaad *et al*, 1995) e o platô que se segue parece dever-se à entrada de cálcio pelos canais da membrana plasmática responsáveis pela reposição dos estoques intracelulares (os “SOCs”) (Figura 6) (Gomperts *et al*, 2002).

O cálcio e o diacilglicerol ativam a proteína quinase C (PKC), a qual potencializa o aumento do AMPc já induzido pela estimulação β -adrenérgica. Este efeito pode ocorrer pela fosforilação da adenilato ciclase ou da proteína Gs (Klein *et al*, 1983; Sugden *et al*, 1985, 1986, 1987; Sugden, 1989). O cálcio tem um papel potenciador da síntese do AMPc intracelular também por atuar através do complexo cálcio/calmodulina na ativação da adenilato ciclase, que na glândula pineal foi caracterizada como do tipo 1 (Figura 6) (Anholt, 1994; Tzavara *et al*, 1996).

A estimulação noradrenérgica na glândula pineal também promove a indução de outros segundos mensageiros, como por exemplo, GMPc e MAPK. A noradrenalina agindo somente nos receptores β_1 -adrenérgicos, nos pinealócitos, produz um aumento de 2 a 4 vezes no GMPc, enquanto que uma estimulação seletiva dos receptores α_1 -adrenérgicos, não possui nenhum efeito sobre o GMPc. No entanto, uma estimulação conjunta de ambos os receptores, α_1 e β_1 -adrenérgicos, produz um aumento de mais de 100 vezes na concentração intracelular do GMPc. Acredita-se que o aumento do GMPc induzido pelo receptor β_1 -adrenérgico é mediado por proteína Gs, enquanto que a potenciação do receptor α_1 -adrenérgico envolve a ativação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e a produção de óxido nítrico (NO), o qual estimula a guanilato ciclase citosólica (sGC), e conseqüentemente a produção de GMPc (Figura 6) (Spessert *et al*, 1993; Lin *et al*, 1994).

Em pinealócitos de ratos, foi demonstrada a presença das isoformas p42, p44 e p38 da família das MAPK, as quais por regularem a atividade da enzima passo-limitante da síntese de melatonina, a arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT; EC 2.3.1.87), possuem um papel modulatório na síntese da melatonina. A noradrenalina aumenta a fosforilação de todas as MAPK, porém por mecanismos diferentes. O aumento da fosforilação da p42/44MAPK,

induzido por noradrenalina é mediado por um mecanismo dependente de GMPc; enquanto que a fosforilação da p38MAPK é mediada por proteína quinase A (PKA) e pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. Além de serem ativadas por mecanismos diferentes, as MAPK também possuem papéis diferentes na regulação da atividade da AANAT, com o envolvimento da p42/44MAPK na indução e a p38MAPK na regulação da amplitude e duração da resposta de ativação da AANAT (Figura 6) (Ho *et al*, 2006).

No rato, o AMPc ativa a PKA do tipo II (PKA) (Maronde *et al*, 1999), a qual fosforila um fator de transcrição, a proteína CREB (“cAMP response element binding”), que, assim fosforilada, promove a ativação da transcrição e tradução gênicas da enzima AANAT. A ativação da PKA pelo AMPc, leva à fosforilação da AANAT em dois sítios específicos localizados no N-terminal e no C-terminal. Quando a AANAT está fosforilada ocorre a sua ligação com a proteína 14-3-3, formando um complexo AANAT-14-3-3 (Ganguly *et al*, 2001). Essa associação impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteassomal (Figura 6) (Gastel *et al*, 1998). Já em algumas espécies de mamíferos, como ovinos e primatas, o principal mecanismo de ativação da AANAT se dá pela inibição da proteólise proteassomal à noite, sendo muito pequena a variação diária do RNAm da enzima (Gastes *et al*, 1998, Garidou *et al*, 2001). Por ser uma enzima instável, quando cessa a estimulação simpática, ou se administram antagonistas adrenérgicos, ou ainda ao submeter o animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AANAT cai com uma meia vida de aproximadamente três minutos (Deguchi & Axelrod, 1972; Klein & Weller, 1972; Parfitt *et al*, 1976; Klein *et al*, 1978; Cipolla-Neto & Afeche, 1999).

A estimulação noradrenérgica induz também a síntese de fatores de transcrição negativos na glândula pineal, sendo um dos mais importantes o ICER (“inducible cAMP early repressor”), que tem um papel inibitório da transcrição do gene da AANAT. O RNAm do ICER exibe um ritmo circadiano na pineal do rato, com um pico na segunda metade da noite, precedendo o declínio da síntese de melatonina. Além do ICER, o AMPc estimula a síntese de outros fatores de transcrição negativos como do Fra-2 (“Fos-related antigen-2”) e JunB que também poderiam estar promovendo a queda circadiana da atividade da AANAT (Figura 6) (Baler & Klein, 1995; Spessert *et al*, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que o “downstream regulatory element antagonist modulator”, DREAM, reprime (em uma maneira dependente de cálcio e AMPc) a transcrição de genes que possuem a região promotora DRE, como os genes *Aa-nat*, *Icer* e *Fra-2*. Na glândula pineal, a ligação de DREAM com DRE possui uma oscilação circadiana, cujo pico coincide com a diminuição da expressão dos genes *Aa-nat*, *Icer* e *Fra-2*. Isso poderia estar

ocorrendo pela habilidade que DREAM possui em deslocar a proteína CREB fosforilada da região promotora CRE, dessa forma impedindo o recrutamento da proteína de ligação da CREB, a CBP (Figura 6) (Maronde & Stehle, 2007).

Figura 6. Representação esquemática das vias intracelulares, na glândula pineal de roedores, deflagradas após a ação da noradrenalina sobre os receptores α e β -adrenérgicos durante o período noturno. AC, adenilato ciclase; $\beta 1$ -ADR, $\beta 1$ -adrenoceptores; Adr, adrenoceptores; C/EBP, “CCAAT enhancer binding protein”; CBP, “CREB-binding protein”; c-Jun, proto-oncogene; CRE, “cyclic AMP-inducible promoter element”; CREB, “cAMP-inducible promoter element”, consiste de um fator de transcrição ativador (+, verde); C-SU, subunidade catalítica da PKA; Fra-2, “Fos-related antigen-2”; G, proteína G; HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferase; 5-HT, 5-hidroxitriptamina; *Icer/ICER*, “inducible cAMP early repressor”, um fator de transcrição inibitório (-, vermelho); Jun-B, proto-oncogene; NO, óxido nítrico; NOS, NO sintase; P, fosfato; PKC, proteína quinase C; PKG, proteína quinase G; PP1, proteína fosfatase tipo 1; sGC, guanilato ciclase solúvel; RII, subunidade regulatória tipo II da PKA; PKA, proteína quinase A; Tph, triptofano hidroxilase; AANAT, arilalquilamina N-acetiltransferase.

FONTE: Modificada de Maronde E & Stehle JH, 2007.

1.4.2 Síntese de Melatonina

A cadeia bioquímica da síntese da melatonina inicia-se com a transformação do aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH; EC 1.14.16.4) (Figura 7). A concentração de triptofano na pineal é bastante elevada, sendo

captado da circulação, provavelmente, por um sistema de transporte de aminoácidos neutros, de modo semelhante ao que ocorre no SNC.

Estudos demonstram a existência de duas isoformas da TPH, a TPH1 e a TPH2, as quais promovem a síntese da serotonina com ações diferentes no SNC. A serotonina proveniente da TPH1 é o substrato da via de síntese da melatonina, enquanto que a proveniente da TPH2 possui uma ação no SNC e está envolvida em patologias como depressão e epilepsia (Walther & Bader, 2003; Sugden, 2003). Na glândula pineal de ratos, a enzima TPH apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados no período noturno, promovendo um aumento da síntese de 5-hidroxitriptofano concentre-se durante a noite. Esse aumento da atividade de cerca de duas vezes durante a noite deve-se tanto à sua síntese aumentada, pela indução de transcrição gênica e síntese protéica, como uma ativação da enzima por fosforilação (Sitaram & Lees, 1978; Shibuya *et al*, 1978, Besançon *et al*, 1996). Tanto o ritmo do RNAm da TPH, assim como o ritmo de atividade da enzima são induzidos por estimulação noradrenérgica, através da via do AMPc e PKA, a qual fosforila a proteína CREB promovendo a transcrição da enzima TPH (Shein & Wurtman, 1971; Boadle-Biber, 1980; Sitaram & Lees, 1984; Ehret *et al*, 1991). A fosforilação da TPH pode ser feita pela PKA, pela quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaMK) e pela PKC (Kuhn *et al*, 1978; Ehret *et al*, 1989, 1991; Johansen *et al*, 1995, 1996; Simonneaux & Ribelayga, 2003). A TPH fosforilada liga-se à proteína 14-3-3, aumentando, assim, a sua atividade e impedindo a sua desfosforilação (Ichimura *et al*, 1987, 1995; Banik *et al*, 1997; Klein *et al*, 2003).

O produto formado pela TPH, o 5-hidroxitriptofano sob a ação da descarboxilase de l-aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28) é transformado em serotonina, ou 5-hidroxitriptamina. A serotonina é o substrato inicial para duas vias diferentes na glândula pineal. Durante o dia, a serotonina é desviada para a via desaminativa-oxidativa, onde sofre a ação da enzima MAO (monoamina: O₂ oxidoreductase; EC 1.4.3.4) sendo transformada em 5-hidroxi-indolaldeído, que, sob a ação da aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3) transforma-se em ácido 5-hidroxi-indolacético ou sob ação da álcool desidrogenase (EC 1.1.1.2) transforma-se em 5-hidroxitriptofol. Estes dois produtos podem ser o-metilados sob a ação da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT; EC 2.1.1.4), produzindo, respectivamente, o ácido 5-metoxi-indolacético e 5-metoxitriptofol (Klein *et al*, 1981). No entanto, durante o período noturno ocorre a ativação da via metabólica mais importante a partir da serotonina, a qual leva à síntese de melatonina. Devido à ativação dessa via, a serotonina apresenta uma variação circadiana, com altas concentrações durante o período claro e baixas concentrações no

período escuro (Figura 8) (Mefford *et al*, 1983; Klein *et al*, 1992). A redução da serotonina à noite deve-se à ativação da enzima AANAT a qual transforma serotonina em N-acetilserotonina, e em seguida esta é oxi-metilada pela enzima HIOMT dando origem à 5-metoxi-N-acetiltriptamina, a melatonina (Figura 7) (Sugden, 1989).

A AANAT é considerada a enzima passo-limitante da síntese de melatonina, pois essa somente é ativada durante o período noturno. A atividade da AANAT na glândula pineal de ratos é cerca de 100 vezes maior na fase do escuro, quando comparada à fase do claro; esta variação diária faz com que a redução dos níveis de serotonina na fase de escuro seja acompanhada por aumento das concentrações de N-acetilserotonina e melatonina (Figura 8) (Klein & Weller, 1972).

O ritmo de atividade da enzima HIOMT no período noturno é menos evidente; ela apresenta um aumento de 1.5 vezes, enquanto que seu RNAm possui um aumento de 2 vezes (Figura 8) (Ribelayga *et al*, 1999; Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Os mecanismos envolvidos na regulação desta enzima são muito complexos. Por um lado o ritmo circadiano do RNAm da HIOMT é dependente da estimulação noradrenérgica, da ativação do receptor β_1 -adrenérgico e do aumento na concentração de AMPc. Já a regulação do ritmo de atividade da enzima HIOMT parece ser dependente de eventos pós-transcricionais, induzidos por neurotransmissores que aumentam o cálcio, como o neuropeptídeo Y (Simonneaux *et al*, 1999).

O NPY tem um efeito estimulatório sobre a atividade da HIOMT, potencializando a síntese de melatonina (Ribelayga *et al*, 1997) e está envolvido na regulação de seu ritmo de atividade. Estudos *in vivo* demonstraram que a atividade da HIOMT é significativamente correlacionada com a concentração do NPY, que tem um ritmo diário e sazonal. Verificou-se também que o aumento noturno do RNAm da HIOMT não tem relação direta com o aumento da atividade da HIOMT, sendo que o aumento do RNAm poderia aumentar os níveis basais da atividade da HIOMT (Simonneaux *et al*, 1999).

A regulação noradrenérgica da atividade da HIOMT, diferentemente da AANAT e da TPH, parece ocorrer a longo prazo, pois em trabalhos com animais expostos à luz constante ou que tiveram removidos os seus gânglios cervicais superiores verificou-se que houve uma redução na atividade da HIOMT, mas os níveis basais dos RNAs da enzima não estavam alterados (Sugden, 1989). Esses resultados sugerem que a HIOMT seria responsável, portanto, pela regulação sazonal da produção de melatonina (Ribelayga *et al*, 1999).

A melatonina, por ser uma molécula hidrossolúvel e lipossolúvel, uma vez produzida na glândula pineal é imediatamente liberada e pode ser encontrada em todos os

compartimentos do organismo; além disso, suas ações podem ser mediadas por receptores de membrana ou podem modificar diretamente reações que ocorrem no interior das células. As duas principais vias de metabolização da melatonina ocorrem no fígado e no cérebro. No fígado ocorre a hidroxilação da melatonina formando 6-hidroximelatonina, seguida de uma conjugação com sulfato ou glucoronato, sendo posteriormente excretada na urina. No tecido cerebral, a melatonina é convertida em N-acetil-n-formil-5-metoxiquinurenina que sofre degradação imediata à N-acetil-5-metoxiquinurenina (Figura 7).

Figura 7. Vias metabólicas envolvidas com a síntese e a degradação da melatonina.

FONTE: Modificada de Vollrath L, 1981.

Figura 8. Gráficos mostrando as variações da concentração dos componentes da via de síntese da melatonina ao longo do dia.

FONTE: Klein DC et al, 1985.

2 Glutamato

2.1 Receptores para o Glutamato

O glutamato (Glu) é aceito como o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. Estudos recentes mostram uma expressão funcional de receptores para Glu em tecidos periféricos, sugerindo um papel como mediador de sinais extracelulares atuando de forma autócrina e/ou parácrina. Entre esses tecidos periféricos podemos citar: osso, testículo, pâncreas, glândula adrenal, glândula pituitária e glândula pineal (Hinoi *et al*, 2003).

Os receptores para o Glu são classificados em dois grandes grupos: receptores ionotrópicos (iGluRs), que são canais iônicos responsáveis por uma transmissão sináptica mais rápida, e receptores metabotrópicos (mGluRs), que estão acoplados a uma proteína G e modulam a transmissão sináptica de forma mais lenta através da estimulação de segundos mensageiros (Kew & Kemp, 2005). No SNC, acredita-se que os receptores para o glutamato são responsáveis pela mediação da neurotransmissão excitatória e desempenham um papel chave na sinaptogênese, na formação da circuitaria neuronal e também por estarem envolvidos em mecanismos da plasticidade sináptica como aprendizagem e memória (Riedel *et al*, 2003).

A topologia dos mGluRs inclui um domínio extracelular N-terminal, três alças extracelulares e três alças intracelulares, além de um domínio intracelular C-terminal, o qual é separado por sete regiões altamente hidrofóbicas. A porção N-terminal do receptor contém o sítio de ligação para o Glu enquanto que o domínio intracelular interage com a proteína G para iniciar os eventos de transdução intracelular. Até agora foram identificados oito membros da família dos mGluRs (mGluR1-8) e estes foram agrupados em três grupos diferentes de acordo com a homologia de suas seqüências de aminoácidos, os mecanismos de transdução intracelular e sensibilidade a diferentes agonistas e antagonistas. Os receptores do grupo I (mGluR1 e mGluR5) estão ligados à formação do IP₃ e diacilglicerol, enquanto os receptores dos grupos II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) estão acoplados a uma proteína G inibitória (Gi) inibindo a síntese do AMPc intracelular (Ferraguti & Shigemoto, 2006).

Com base nas seqüências homólogas e preferência por certos agonistas, os iGluRs são classificados em: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoazolepropionico (AMPA) e Cainato (KA), os quais estão associados a canais iônicos permeáveis a alguns cátions (Hinoi *et al*, 2003).

Receptor NMDA (NMDAR): esses canais iônicos são altamente permeáveis ao Ca^{2+} , e estão sujeitos ao bloqueio dependente de voltagem por concentrações fisiológicas de Mg^{2+} . Sete subunidades do NMDAR foram identificadas: uma NR1, quatro NR2 (A-D) e duas NR3 (A-B). O receptor NMDA funcional é composto por ligações heteroméricas entre a subunidade essencial NR1, a qual possui um sítio de ligação à glicina, um co-agonista para esse receptor, e uma das quatro subunidades diferentes NR2 (A-D), além de uma ou duas subunidades diferentes NR3 (A-B). A expressão da subunidade NR2 (a qual possui o sítio de ligação ao glutamato) sozinha não leva à composição do canal iônico funcional, enquanto que a co-expressão da subunidade NR2 com a subunidade NR1 resulta em canais funcionais permeáveis ao Ca^{2+} em células de mamíferos (Köhr, 2006).

Receptor AMPA: esse receptor é composto por quatro subunidades (GluR1-4). Cada subunidade possui um domínio extracelular N-terminal, um domínio de ligação do ligante, o qual compreende dois segmentos polipeptídicos extracelulares S1 e S2, e um domínio intracelular C-terminal. Após a ligação do glutamato o receptor é rapidamente ativado permitindo a abertura do canal iônico, resultando num influxo de sódio, o qual despolariza a membrana da célula pós-sináptica (Sprengel, 2006). O receptor AMPA que não tem em sua composição a subunidade GluR2 é também permeável ao cálcio (Cull-Candy *et al*, 2006).

Receptor Cainato: São proteínas transmembranas com um domínio extracelular N-terminal, dois domínios transmembrana S1 e S2 conectados por uma alça extracelular seguidos por uma sequência intracelular contendo o domínio C-terminal. Esses receptores são compostos por combinações tetraméricas das subunidades GluR5-7 e KA-1 e KA-2. As subunidades KA-1 e KA-2 sozinhas não formam receptores funcionais, no entanto, elas formam combinações heteroméricas com membros da família GluR5-7 para poder formar receptores funcionais (Pinheiro & Mulle, 2006).

2.2 *Papel da Acetilcolina na Modulação da Síntese de Melatonina pelo Glutamato*

Diversos neurotransmissores podem modular a síntese de melatonina, como por exemplo: a acetilcolina e o glutamato (Wessler *et al*, 1997; Moryama *et al*, 2000).

Estudos bioquímicos e imunocitoquímicos sugerem a presença de acetilcolina em pinealócitos e que o conteúdo de acetilcolina aumenta aproximadamente dez vezes durante a noite (Wessler *et al*, 1997). Dados mostraram que a acetilcolina tem uma ação em receptores muscarínicos no terminal pré-sináptico e em receptores nicotínicos nos pinealócitos (Letz *et al*, 1998). A ação da acetilcolina sobre a síntese de melatonina é inibitória, tanto por inibir a liberação de noradrenalina no terminal pré-sináptico, quanto por sua ação pós-sináptica. A

interação com receptores pós-sinápticos nicotínicos induz a despolarização dos pinealócitos, promovendo a ativação dos canais para cálcio do tipo L, e o aumento do cálcio intracelular. Este aumento deflagra a liberação do glutamato, o qual fica estocado em microvesículas presentes nos pinealócitos (Yamada *et al*, 1998).

O glutamato tem uma ação inibitória sobre a síntese da melatonina, agindo sobre as enzimas AANAT e HIOMT. Como já foi descrito acima, a acetilcolina é responsável pela liberação do glutamato estocado em microvesículas, e esse processo é feito por exocitose mediada pelo cálcio. O glutamato liberado interage com receptores metabotrópicos do grupo II, mGluR3, presentes nos pinealócitos. Esses receptores estão acoplados a uma proteína Gi, fazendo com que diminua o AMPc, e conseqüentemente inibindo a síntese de melatonina. A interação com receptores ionotrópicos do tipo AMPA (GluR1), expressos em pinealócitos, causa um aumento na concentração intracelular do cálcio através da ativação dos canais para cálcio do tipo L, portanto esse tipo de receptor potencializa o sinal colinérgico na glândula pineal, fazendo com que mais glutamato seja liberado das microvesículas por exocitose. O glutamato liberado pode interagir em pinealócitos vizinhos ou no próprio pinealócito responsável pela sua liberação, caracterizando portanto uma ação glutamatérgica parácrina e autócrina na pineal (Yamada *et al*, 1998; Ishio *et al*, 1999; Yatsushiro *et al*, 2000).

Estudos recentes demonstraram a presença do receptor metabotrópico do grupo I, mGluR5, na membrana dos pinealócitos, o qual estimula a formação do IP₃ e aumenta o cálcio intracelular; porém seu papel fisiológico ainda é desconhecido (Yatsushiro *et al*, 1999). Assim como há trabalhos que demonstram a presença dos receptores ionotrópicos do tipo NMDA e AMPA (GluR2/3) nos astrócitos, ao longo do desenvolvimento (Kaur *et al*, 2005). Redecker *et al* (1999) demonstraram que astrócitos da glândula pineal de ratos apresentam imunorreatividade para os receptores metabotrópicos mGluR2/3 e mGluR5, sugerindo que a sinalização glutamatérgica via mGluRs na pineal é mais complexa do que se havia pensado e envolve os astrócitos, além dos pinealócitos.

3 Papel das Células da Glia no Sistema Nervoso Central

As células da glia também chamadas de neuroglia são células não neuronais e estão divididas em dois grupos: (1) microglia: são as menores células gliais e correspondem a 15% de todas as células do tecido nervoso, elas são as células imunes do SNC e possuem a capacidade de migrar até os locais de traumas e liberar transmissores químicos, contribuindo

com o reparo de danos neuronais; (2) macroglia: os tipos celulares de macroglia do SNC são os astrócitos, oligodendrócitos e as células endoteliais e radial glial (Kandel *et al*, 2003).

Os astrócitos são as maiores células da neuroglia, possuem núcleos esféricos e diversos prolongamentos e estão acoplados uns aos outros por meio de junções “gap”. Seus numerosos prolongamentos podem fazer contato com vasos sanguíneos e sinapses neuronais e, dessa forma, sua estrutura provê a oportunidade para uma sinalização bidirecional entre os neurônios e a rede de vasos sanguíneos. Já os oligodendrócitos são menores e possuem poucos prolongamentos, sendo responsáveis por promover a mielinização dos axônios. Estudos demonstram que uma disfunção dos oligodendrócitos geralmente está associada a doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla. As células endoteliais são cilíndricas, com a base afilada e diversas vezes ramificada, por isso originam prolongamentos que se dispõem no interior do tecido nervoso. São células que possuem um arranjo epitelial e revestem as cavidades do encéfalo e da medula, e conseqüentemente estão em contato com o líquido cefalorraquidiano, o qual é encontrado no interior dessas cavidades. A célula radial glial é a principal célula da glia encontrada na retina e participa na comunicação bidirecional com os neurônios (Kandel *et al*, 2003).

No SNC de vertebrados, as células da glia são muito mais numerosas que os neurônios e durante muitos anos acreditava-se que elas eram responsáveis somente em promover suporte estrutural, metabólico e trófico às células nervosas. Contudo, estudos mais recentes têm demonstrado que elas, principalmente os astrócitos, também participam de várias sinapses. Estima-se que os processos dos astrócitos fazem contato com mais de 100.000 sinapses, e a estrutura que é formada a partir desses contatos é definida como sinapse tripartida, onde o processo dos astrócitos está associado com elementos pré e pós-sinápticos dos neurônios (Figura 9A) (Halassa *et al*, 2007).

Os astrócitos expressam uma grande variedade de receptores específicos como os mGluRs, receptores GABA_B e receptores muscarínicos de acetilcolina. Dados da literatura mostram que a liberação de neurotransmissores dos neurônios como, por exemplo glutamato, GABA, adrenalina, ATP, serotonina, ACh e diversos peptídeos podem estimular os astrócitos causando um aumento da concentração intracelular de cálcio, o qual resulta na liberação de gliotransmissores dentre eles o glutamato, D-serina e ATP. O glutamato liberado pelos astrócitos pode fazer um “feed back” em qualquer terminal pré-sináptico aumentando ou diminuindo a liberação dos neurotransmissores, mas também pode estimular diretamente neurônios pós-sinápticos, causando uma despolarização nessas células pela ativação de seus receptores ionotrópicos dos tipos AMPA e NMDA. Ao liberarem ATP, o qual é rapidamente

convertido em adenosina no espaço extracelular, as células da glia inibem os neurônios pós-sinápticos por aumentar a condutância ao K^+ nessas células (Figura 9B) (Newman, 2003).

O aumento do cálcio intracelular nos astrócitos também pode promover uma propagação de ondas de cálcio através das células da glia vizinhas. Estas são propagadas por dois mecanismos: por IP_3 através das junções “gap” que acoplam as células e pela liberação do ATP, que funciona como um mensageiro extracelular. Essas ondas de propagação podem representar o mecanismo pela qual as células da glia modulam a transmissão sináptica a longas distâncias. Outra forma pela qual as células da glia podem regular a transmissão sináptica é pela captura do glutamato pelos astrócitos, sendo convertido em glutamina, e, em seguida, captado pelos neurônios, provendo uma fonte renovável desse neurotransmissor. (Figura 9B) (Newman, 2003; Halassa *et al*, 2007).

Uma atividade neuronal causa variações nas concentrações de K^+ e H^+ no espaço extracelular. Essas variações podem alterar a transmissão sináptica, já que um aumento dos níveis de K^+ despolariza os terminais sinápticos, enquanto que H^+ bloqueia os canais de cálcio pré-sináptico e os NMDARs. As células da glia desempenham um papel essencial na regulação das concentrações extracelulares de H^+ e K^+ , portanto influenciando o efeito desses íons na transmissão sináptica (Figura 9B). Os astrócitos regulam a plasticidade sináptica por controlarem a função dos NMDARs através da liberação de d-serina, um co-agonista desses receptores. Os NMDARs possuem um sítio chamado de sítio de ligação à glicina, o qual controla sua atividade. Estudos em diversas regiões do cérebro mostram que a d-serina é o ligante endógeno para esse sítio (Newman, 2003; Halassa *et al*, 2007).

Em relação aos receptores glutamatérgicos presentes na glia foram descritos os receptores metabotrópicos, mGluR5 e mGluR3, os quais estão acoplados a fosfolipase C e adenilado ciclase, respectivamente. Também foi descrito o receptor mGluR2 em células da glia na glândula pineal de gerbil (Pabst & Redecker, 1999). Enquanto que os receptores ionotrópicos expressos na glia são do tipo AMPA, NMDA e Cainato. Em oligodendrócitos, esses receptores são responsáveis pelo influxo do cálcio na célula, promovendo assim o aumento do cálcio intracelular e a liberação de neurotransmissores e fatores de crescimento. Na microglia a ativação dos receptores AMPA e Cainato resulta na liberação do fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) o qual pode potencializar a neurotoxicidade do glutamato matando oligodendrócitos, destruindo a mielina e axônios (Bezzi & Volterra, 2001)

Esses dados indicam que existe uma rede de sinalização integrada entre neurônios e células da glia e que a atividade cerebral envolve muitas formas de comunicação entre esses

dois tipos celulares. No entanto, o papel dos astrócitos, os quais constituem a maior parte das células da glia na glândula pineal, ainda não está definido.

Figura 9. Sinapse tripartida. (A) Representação da sinapse tripartida. Os processos dos astrócitos (verde) fazem contato com elementos pré e pós-sinápticos dos neurônios. **(B) Esquema da transmissão sináptica regulada pelas células da glia.** A liberação do glutamato (Glu) pelos terminais pré-sinápticos ativa receptores presentes na célula da glia (1), causando um aumento do cálcio intracelular (2) e a liberação de Glu da glia. A ativação dos receptores pré-sinápticos pelo Glu (3) regula a liberação de neurotransmissores, enquanto que a ativação dos receptores pós-sinápticos (4) causa uma despolarização nessas células. A estimulação da glia também resulta na liberação de ATP, o qual inibe os neurônios pós-sinápticos por ativarem receptores A1 (5). Uma ativação da glia também pode causar ondas de cálcio, que se propagam entre as glias pela difusão do IP₃ através das junções gap (6) e pela liberação de ATP (7), resultando na modulação da transmissão sináptica a longas distâncias (8). A glia também pode modular a transmissão sináptica através da captação de Glu (9) e por regular os níveis de K⁺ e H⁺ extracelulares (10).

FONTE: (A) Halassa MM *et al*, 2007. (B) Newman EA, 2003.

4 O Fator de Transcrição NF- κ B e sua Ativação

Descoberto em 1986, o fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B) foi descrito como um fator nuclear que quando ativado por agentes como lipopolissacarídeos (um componente da parede celular da bactéria Gram negativa) se ligava a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica as moléculas de anticorpo de linfócitos do tipo B (Sen & Baltimore, 1986). A partir de então se intensificaram os estudos mostrando que o NF- κ B é um importante mediador em diversos processos biológicos como inflamação e apoptose.

Em células de mamíferos o NF- κ B pode ser formado por hetero ou homodímeros das seguintes subunidades: c-Rel, RelA (p65), RelB, p50 e p52; sendo que as duas últimas são produtos proteolíticos de precursores maiores, p105 e p100, respectivamente. Todos os membros da família do NF- κ B contém um domínio N-terminal de aproximadamente 300 aminoácidos chamado de domínio homólogo-Rel (RHD), o qual regula diversas funções como: a dimerização das subunidades, a ligação do NF- κ B ao DNA assim como sua interação com as proteínas I κ B, e além disso esse domínio também contém a sequência de localização nuclear (NLS). Já a subfamília Rel (RelA, RelB e c-Rel) contém um domínio de ativação transcricional C-terminal, chamado de TAD; as subunidades p50 e p52 não possuem esse domínio, portanto somente podem promover a transcrição quando estão heterodimerizadas com uma subunidade Rel (Figura 10) (Beinke & Ley, 2004; Häcker & Karin, 2006; Perkins, 2007).

Em células não estimuladas, o NF- κ B existe numa forma latente formando um complexo com uma proteína inibitória, chamada I κ B, a qual não possui sítio de ligação ao DNA e cuja principal característica estrutural são 6 ou 7 repetições de anquirina, as quais regulam a ligação ao domínio RHD das subunidades do NF- κ B e mascaram a sequência de localização nuclear (NLS), impedindo que o NF- κ B entre no núcleo e se ligue ao DNA. Em células de mamíferos existem três principais I κ Bs: I κ B- α , I κ B- β , e I κ B- ϵ porém também existem outras proteínas I κ Bs que contêm as mesmas repetições de anquirina, como a BCL-3 e I κ B ζ , que diferentemente das outras I κ Bs, são nucleares e funcionam como co-ativadores transcacionais (Figura 10) (Beinke & Ley, 2004; Häcker & Karin, 2006; Perkins, 2007)

Diversos fatores podem ativar o NF- κ B, como por exemplo: citocinas (interleucina-1 [IL-1] e fator de necrose tumoral [TNF]), proteínas neurotóxicas (como a β -amilóide), um aumento da concentração intracelular de cálcio e H₂O₂, assim como o glutamato e

neurotrofinas que possuem especificidade para o sistema nervoso (Mattson & Camandola, 2001). No entanto, o evento regulatório crítico para a ativação do NF- κ B é a fosforilação sítio-específica da proteína I κ B pelo complexo IKK.

O complexo IKK é formado por 2 subunidades catalíticas: IKK α e IKK β , as quais são similares em estrutura, com 50% de identidade sequencial e 70% de similaridade protéica, e ambas contêm um domínio de proteína quinase na região N-terminal e mais os motivos: LZ (zíper de leucina) e HLH (hélice-alça-hélice). O terceiro componente desse complexo é o IKK γ (NEMO), e estudos sugerem que este é principalmente uma proteína em hélice com grandes trechos de estrutura “coiled-coil” (CC), incluindo LZ e sua região C-terminal (Figura 10). A ativação do complexo IKK pode ser regulada por vários mecanismos, como por exemplo: (1) uma fosforilação direta de uma das subunidades catalíticas do IKK na sua alça de ativação, que tanto em IKK α quanto em IKK β são idênticas em sequência, e ambas se tornam fosforiladas nos resíduos de serina correspondentes, S177/S181 e S176/S180, respectivamente; (2) foi demonstrado que a ativação de IKK é absolutamente dependente de NEMO, uma vez que a ligação de IKK β e IKK α é regulada por um motivo decapeptídeo presente nas regiões C-terminal, o qual reconhece resíduos localizados no motivo CC na região N-terminal de NEMO, chamado de domínio de ligação a NEMO (NBD). Esse domínio é necessário para a montagem de IKK, já que estudos mostraram que uma célula sem NBD não possui a ativação do complexo IKK; (3) uma multimerização do complexo IKK resultando em uma transautofosforilação; isso ocorre pelo fato de que IKK α e IKK β formam dímeros através de seus motivos LZ, propiciando que eles ativem um ao outro (Häcker & Karin, 2007)

Existem diversas vias distintas de ativação do NF- κ B, sendo predominante a via clássica, formada pelo dímero Rel A:p50, o qual também pode ser referido como NF- κ B_{can}, sendo esse o mais comum e estudado no sistema nervoso. A via clássica é induzida em resposta a vários estímulos inflamatórios, incluindo TNF e IL-1, além de produtos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS). Essa via é identificada pela rápida fosforilação da proteína I κ B α , causada pela subunidade IKK β , nos seus resíduos de serina 32 e 36 e subsequentemente resultando em poliubiquitinação e degradação da I κ B α pela proteassoma 26S; portanto, o NF- κ B livre pode se translocar para o núcleo e induzir a transcrição de genes-alvo. O complexo NF- κ B_{can} pode induzir a expressão de uma grande variedade de genes com funções diferentes e até mesmo opostas, como por exemplo, genes pró-apoptóticos, p53, c-myc, Fas e FasL,

assim como genes importantes para a sobrevivência celular como: IAP (inibidores de apoptose), Bcl-x e SOD2 (Figura 11) (Massa *et al*, 2006; Perkins, 2007).

O dímero formado por RelB:p52 também é referido como NF- κ B_{non}, e esse complexo participa do esquema de ativação não-clássica (“non-canonical”), ou via alternativa. Essa via difere da via clássica devido ao fato de que um único polipeptídeo, p100, é responsável por ser tanto uma subunidade inibitória (IkB- δ) assim como o precursor da p52. A via alternativa é ativada por membros da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), como por exemplo BAFF-R e CD-40, além do vírus Epstein Barr. Os detalhes que distinguem a via clássica da via alternativa são: (1) as quinases que desencadeiam a fosforilação e proteólise proteassomal da IkB. A via alternativa não depende de IKK β ou NEMO. Ainda existe pouca informação sobre os eventos moleculares envolvendo o processamento da p100 dependente de IKK α , no entanto, está claro que a via alternativa é completamente operacional na ausência de IKK β e NEMO, indicando que o complexo IKK trimolecular clássico não é essencial e de fato é incapaz de promover o processamento da p100. Ao contrário da via clássica, onde IkB α é fosforilada pela IKK β , p100 é fosforilada por IKK α resultando em poliubiquitinação e degradação proteassomal. A degradação proteolítica da p100 é limitada à sua porção “IkB-like” na região C-terminal, desse modo gerando p52 madura, a qual entra no núcleo como dímero com RelB; (2) o tempo para a ativação máxima do NF- κ B. Enquanto a degradação dependente de IKK β ocorre em minutos, o processamento da p100 dependente de IKK α requer várias horas; (3) as seqüências específicas de DNA as quais seus produtos (NF- κ B_{can} versus NF- κ B_{non}) se ligam com maior afinidade (Figura 11) (Massa *et al*, 2006; Perkins, 2007)

No SNC foi demonstrado que o NF- κ B tem uma atuação sobre o desenvolvimento, a plasticidade, a morte e a defesa celular. Entre os genes regulados, pode-se citar: os envolvidos na síntese de enzimas, como da NOS induzida (NOSi) e ciclooxigenase-2 (COX-2) induzida, e da enzima de defesa antioxidante superóxido dismutase, interleucinas e fator de necrose tumoral (Barnes & Adcock, 1997; Glezer *et al*, 2000). O NF- κ B aumenta a resistência ao estresse oxidativo em células neuronais, evidenciando uma ação neuroprotetora para este fator de transcrição por suprimir o sinal de morte celular. Existe um grande interesse na relação entre a ativação do NF- κ B e da CREB no SNC, uma vez que parece que a redução da CREB seria um marcador importante do desencadeamento dos processos neurotóxicos (Hardingham & Bading, 2003).

Figura 10. Membros das famílias do NF-κB, IκB e IKK. (A) Todos os membros da família do NF-κB contêm um domínio N-terminal, chamado de domínio homólogo Rel (RHD), o qual regula a dimerização das subunidades, a ligação ao DNA e contêm a sequência de localização nuclear. A subfamília Rel possui no seu domínio C-terminal, um domínio de ativação transcricional (TAD). TA1 e TA2 são subdomínios do domínio de transativação de RelA e c-Rel. (B) A família IκB consiste das proteínas IκBα, IκBβ, IκBε, BCL-3 e IκBζ (não representado na figura). Assim como p100 e p105, as proteínas IκB contêm motivos de anquirina (ANK) em seu domínio C-terminal. (C) O complexo IKK é formado pelas subunidades catalíticas IKKα e IKKβ e pela subunidade regulatória NEMO (também conhecido como IKKγ). CC, mola reguladora “coiled coil”; DD, domínio da morte; HLH, hélice-alça-hélice; LZ, zíper de leucina; NBD, domínio de ligação a NEMO; PEST, domínio rico em prolina, glutamato, serina e treonina; ZF, domínio de zinco “zin-finger”.

FONTE: Perkins ND, 2007.

Figura 11. Vias de sinalização do NF-κB. A via clássica (A) é formada pelo dímero p65:p50 sendo ativada por vários estímulos inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatória e antígenos provenientes de microorganismos. A degradação da proteína inibitória IκB, responsável por impedir a entrada nuclear do NF-κB, é dependente da subunidade IKKβ. Enquanto que a via alternativa (B) formada pelo dímero RelB:p52 é ativada por membros da família do receptor TNF (BAFF e CD-40), e a degradação da subunidade inibitória p100, a qual resulta na subunidade p52 ativa, é dependente de IKKα.

FONTE: Xiao W, 2004.

II. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a participação dos diversos tipos de receptores para o glutamato, metabotrópicos dos grupos I, II e III e ionotrópicos dos tipos AMPA e NMDA na síntese de melatonina estimulada por noradrenalina em glândulas pineais em cultura. Além disso, devido ao importante papel que as células da glia exercem nas ações mediadas pelo glutamato no SNC e da caracterização de alguns receptores glutamatérgicos nos astrócitos da glândula pineal de ratos, estudou-se também as ações do glutamato em pinealócitos isolados, e em pinealócitos cultivados juntamente com astrócitos, visando esclarecer a participação desses dois tipos celulares nas ações do glutamato sobre a síntese de melatonina.

Ainda, foi investigada a presença dos diversos tipos de receptores para o glutamato nos dois tipos celulares, pinealócitos e astrócitos, usando-se a metodologia de RT-PCR.

A indução do aumento do cálcio intracelular por diferentes agonistas glutamatérgicos foi avaliada por microscopia confocal em astrócitos isolados.

Em função da importância do fator de transcrição NF-kB na mediação das ações do glutamato no SNC, e de sua relação com a CREB na ação neuroprotetora, avaliou-se o papel deste fator de transcrição nos efeitos modulatórios do glutamato sobre a síntese de melatonina. Para isso, utilizou-se um inibidor do NF-kB, o PDTC, bem como a metodologia de ensaio de gel de retardo.

A viabilidade celular assim como a fragmentação do DNA das células da glândula pineal, incubadas com glutamato e com o PDTC foi feita por citometria de fluxo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 200 e 220g. Os animais foram alojados em biotério com iluminação (ciclo claro-escuro de 12:12h; início do claro às 07:00h) e temperatura controladas ($21 \pm 2^\circ \text{C}$).

2 Cultura de Glândula Pineal

Os animais foram sacrificados por decapitação, entre 09:00 e 10:00h, e as glândulas pineais foram retiradas e colocadas em meio de cultura BGJb modificado (Gibco) e mantido em gelo.

Sob fluxo laminar, as glândulas foram dissecadas e transferidas para placas de cultura com 24 poços (2 glândulas por poço), contendo cada poço 200 μl de meio de cultura e um disco de nylon de 4mm sobre o qual as glândulas foram colocadas. O meio que foi utilizado é o BGJb com BSA (1mg/ml) (Gibco) acrescido de glutamina (2mM), ácido ascórbico (0,1mg/ml) e penicilina (100U/ml)-estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$) (Parfitt *et al*, 1976).

As placas foram acondicionadas em uma câmara incubadora modular, a qual foi preenchida com carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2) por 5 minutos, saturada de umidade, e colocada em estufa de CO_2 a 37°C .

As glândulas foram mantidas em cultura por 48h, sendo transferidas para uma nova placa, com meio fresco, a cada 24h. A manutenção das glândulas em cultura por 48h teve como objetivo permitir a completa degeneração dos terminais nervosos e a obtenção, portanto, de uma preparação exclusivamente pós-sináptica (Parfitt *et al*, 1976). No segundo dia, após permanecerem 1h em meio fresco, as glândulas foram submetidas aos diversos tratamentos farmacológicos descritos a seguir. Para quantificar o conteúdo de melatonina as glândulas pineais, após o tratamento farmacológico, permaneceram na estufa a 37°C , durante um período de incubação de 5 horas; contudo para avaliar o fator de transcrição NF-kB, as glândulas foram incubadas por 30 minutos. Em seguida, as glândulas foram congeladas a -85°C .

3 Cultura de Pinealócitos Isolados

Pinealócitos isolados foram obtidos utilizando-se o método de digestão proteolítica com papaína (Papain Dissociation System, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey).

Glândulas pineais (50 por ensaio) foram isoladas e colocadas em meio de cultura DMEM, em gelo. Em seguida, sob o fluxo laminar as glândulas foram transferidas para uma placa de Petri, onde foram lavadas com solução de Hanks e picotadas de modo a obter pedaços menores de tecido. O material foi então transferido com uma pipeta Pasteur para um frasco erlenmeyer de 25ml contendo uma solução de papaína e DNase, a qual teve o seu pH acertado, com carbogênio, para 7,4. O frasco contendo os fragmentos das glândulas foi colocado em banho com agitação plana a 37° C, permanecendo por 45 minutos. Sob o fluxo laminar o tecido foi, então, disperso, pipetando-se com três pipetas Pasteur com diâmetro de ponta decrescente (cerca de 60 pipetadas). Em seguida, a suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga de 15ml, evitando-se os pedaços de tecidos não digeridos. A suspensão foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, em uma temperatura de 20° C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado em uma solução de EBSS, ovomucóide e DNase (pH ajustado para 7,4 com carbogênio), de modo a interromper a proteólise. Essa suspensão foi depositada sobre uma solução de ovomucóide, sem que as fases se misturassem. Estas soluções em gradiente foram centrifugadas a 1500 rpm, por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado com 5ml de meio DMEM (Sigma; glicose: 1000mg/l, HEPES: 5.958g, bicarbonato de sódio: 3,7g, antibióticos 1%). Uma alíquota de 10ul foi retirada e corada com o corante azul de Tripán (concentração de 1% em PBS) para que se pudesse avaliar a viabilidade celular e o número de células obtidas. As células foram contadas na câmara de Neubauer e, em função do número de células obtidas, foi realizada uma diluição das células com DMEM de modo a obter-se 2×10^5 células/ml. Cinco ml de células em meio de cultura foram colocados em garrafas de cultura, e estas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. No dia seguinte foi feita a separação dos pinealócitos e astrócitos. Como os astrócitos aderem ao fundo das garrafas de cultura, e as células em suspensão no meio de cultura são predominantemente pinealócitos, para fazer a separação das células é retirado todo o conteúdo celular contido no meio de cultura, em seguida esse material foi centrifugado, recontado e ressuspensionado em meio sem soro fetal bovino (SFB) e transferido para uma placa de cultura de 24 poços. Foi colocado 1 ml por poço para obter uma

concentração de 2×10^5 células/ml e a placa foi mantida na estufa a 37°C por 1 hora até a realização dos tratamentos farmacológicos.

4 Cultura de Astrócitos Isolados

Após a transferência dos pinealócitos que estavam em suspensão, os astrócitos que permaneceram aderidos ao fundo das garrafas tiveram o meio de cultura repostado (DMEM + SFB 10%). Após uma semana em cultura (50% do meio trocado a cada 2 dias), quando as células estavam em confluência, elas foram retiradas das garrafas utilizando-se a enzima tripsina a 0,25%. Para isso, as células foram lavadas duas vezes com solução de Hanks sem cálcio, e, em seguida, foram adicionados 6 ml de Tripsina a 0,25%, esta permanecendo por 5 minutos. Acrescentou-se, então, 6ml de meio DMEM com 10% de SFB para bloquear a ação da tripsina, e, com o auxílio de um raspador, as células foram soltas do fundo das garrafas. Em seguida, transferiu-se todo o conteúdo das garrafas para um tubo de centrifuga e centrifugou-se a 20°C por 5 minutos a 300g. O precipitado foi então ressuspensionado de acordo com o experimento realizado.

5 Co-cultura de Pinealócitos e Astrócitos

Após a dissociação das células da pineal, os dois tipos celulares, pinealócitos e astrócitos foram cultivados juntos por um período de 60h. As células, na concentração de 4×10^5 células/ml, 1ml/poço foram colocadas em placas cultura de 24 poços, que permaneceram em estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

Após o período de incubação de 60 horas, todo o meio foi trocado por meio sem soro fetal bovino, permanecendo por 1h em estufa de CO_2 a 37°C , quando então foram submetidas aos tratamentos farmacológicos.

6 Microscopia Confocal

6.1 Astrócitos Isolados

Para preparar as placas para a microscopia confocal, os astrócitos, após serem retirados das garrafas usando-se a tripsina (como descrito acima), foram ressuspensionados em meio DMEM na concentração de 8×10^5 células/ml, e 120 μl foram colocados no centro das placas, permanecendo as mesmas na estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas.

No dia seguinte, o meio de cultura das células foi trocado por meio contendo o fluoróforo Fluo 4, permanecendo as células em estufa a 37° C por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas com 200ul de meio DMEM por três vezes. Após esse procedimento, os astrócitos foram analisados sob microscópio confocal (Carl-Zeiss modelo LSM 510), quanto ao seu conteúdo intracelular de cálcio, previamente e após os tratamentos farmacológicos. Foi utilizado o comprimento de onda de 505nm para a excitação com laser de argônio e de 530nm para a emissão. Os gráficos para análise dos resultados da microscopia confocal foram montados com o programa Origin 5.0.

7 Quantificação da Melatonina

A melatonina presente nas glândulas pineais e no meio de cultura das células foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (Sistema Waters, Milford, Mass, USA). O sistema cromatográfico, composto por uma bomba HPLC 510 isocrática, uma coluna Resolve C18 (partícula esférica de 5µm; 3,9x150mm) e um detector eletroquímico 464 operado em modo DC, foi controlado pelo programa computacional Empower através da interface System Interface Module.

Cada glândula foi sonicada (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, N.Y., USA) por 10s em 120µl de uma solução de ácido perclórico (0,1M), EDTA (0,02%) e metabissulfito de sódio (0,02%). Após centrifugação por 2min a 13000g (Eppendorf 5415C Centrifuge, Brinkman Instruments Inc., Westbury, N.Y., USA), 50µl do sobrenadante foram injetados no sistema de cromatografia (Injetor Mod. 7125, com loop de 20µl, Rheodyne Inc., Ca., USA). Para a dosagem dos meios de cultura, foi feita uma diluição de 2 vezes do meio de cultura na mesma solução de ácido perclórico, e em seguida foram utilizados 50ul para injeção no sistema de cromatografia.

Foram realizadas cromatografias de fase reversa, isocráticas, tendo como fase móvel uma solução contendo tampão acetato de sódio 0,1M e ácido cítrico 0,1M, EDTA 0,15M e metanol a 30%, com fluxo de 1ml/min, potencial de oxidação de 900mV e duração média de 7 minutos.

Para a quantificação da melatonina presente nas amostras, foi realizada, no início das dosagens, uma curva de calibração com 4 concentrações conhecidas de um padrão de melatonina. A curva de calibração foi obtida, usando-se o programa computacional Empower pela relação das diferentes concentrações do padrão com as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas. A identificação da melatonina das amostras foi feita pela comparação de

seus tempos de retenção com o do padrão conhecido, e a quantificação realizada pelo programa Empower.

8 Medição Radiométrica da Atividade da AANAT

O método baseou-se na quantificação da N-[^3H]acetiltriptamina, que é o produto da reação da [^3H]acetil-coenzima A ([^3H]acetil CoA) e da triptamina, como uma indicação da atividade da enzima AANAT. O produto marcado foi extraído em clorofórmio, e em seguida foi medida a radioatividade (método desenvolvido por Parfitt *et al*, 1975, modificado a partir do método de Deguchi & Axerold, 1972).

Para isso, as glândulas foram colocadas em tubos de microcentrífuga, e foi adicionado a esses tubos a 4° C, 50ul da solução de trabalho I, contendo acetilCoA fria (2mM) e tampão fosfato de sódio (0,1M, pH=6,8). As glândulas foram sonicadas, aplicando-se um pulso de trinta segundos, de modo a extravasar seu conteúdo intracelular.

Foi adicionado a cada glândula já sonicada, 50ul da Solução de Trabalho II, contendo triptamina (40mM) e [^3H]acetilCoA (2mM). Em seguida, as amostras foram incubadas a 37° C, por 20 minutos. Após a incubação, foi acrescentado 1ml de clorofórmio a cada uma das amostras, e o produto foi extraído agitando-se os tubos durante 1 minuto. Para a separação completa das fases as amostras foram centrifugadas por 20 segundos, a 14000rpm. As fases aquosas foram removidas por sucção e acrescentados 200ul do tampão fosfato de sódio (0,1M, pH=6,8). Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas e as fases aquosas removidas. 500ul do clorofórmio contendo o produto foram transferidos para os tubos de contagem e evaporados até que as amostras estivessem completamente secas. O líquido de cintilação para amostras não-aquosas (Insta-Fluor-Packard) foi, então, acrescentado e medida a radioatividade em contador de radiação β (Beckman-LS 6500).

9 Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR)

9.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total dos pinealócitos e dos astrócitos separadamente foi feita utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram inicialmente solubilizadas no reagente Trizol® por sucessivas pipetagens. Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após esse tempo, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio para 1 ml de Trizol para desproteínização e as amostras

foram cuidadosamente homogeneizadas. Novamente, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Depois desse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000g, 2 a 8° C. A fase aquosa (superior) contendo o RNA total foi transferida para um tubo novo e autoclavado.

Para a precipitação do RNA, em cada tubo com amostra foi adicionado álcool isopropílico (0,5ml para cada 1 ml de Trizol®), e essa solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g, 4° C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado. Ao precipitado foi adicionado 1ml de etanol 75%. Após cuidadosa agitação, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 12.000g, 4° C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado e os tubos com os precipitados foram deixados por 10 minutos à temperatura ambiente para que o etanol secasse por completo. Após esse tempo, o precipitado contendo o RNA total foi ressuspenso em água DEPC e estocado a -70° C até o dia do ensaio.

Antes de sua utilização, uma amostra de cada extração foi quantificada e analisada quanto à pureza e integridade por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. E através de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2% foi verificada a integridade do RNA isolado. As bandas foram reveladas sob luz ultravioleta.

9.2 Obtenção do cDNA e Amplificação dos Genes de Interesse por PCR

Uma amostra de 5µg de cada RNA foi submetida à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto, foi adicionado em cada amostra tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5mM cada), primers randômicos (150ng) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas por 50 min à 42° C, seguido de aquecimento à 70° C por 15 min para desnaturação da enzima. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas reações de PCR, amplificações de 40 ciclos, utilizando-se primers específicos para os genes de interesse, 10 pmol de cada primer em 100 µL de master mix, e a enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega/USA), conforme instruções do fabricante. Os primers usados para RT-PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento e o tamanho dos seus produtos amplificados estão descritos na tabela abaixo.

Quadro 1. Seqüência dos primers, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos amplificados para os diversos receptores de glutamato.

Primer	Seqüências sense (5'-3')	Seqüências antisense (5'-3')	Temp.	Pares de Bases
AMPA1	TTCTAGGTGCGGTTGTGGGTG	GGAGAACTGGGAACAGAATCGG	55,5°C	203
AMPA2	ATTGTACACTACGATGATTC	CGGTGCACAGCATCGTCGGA	56,°C	155
AMPA3	TCTGCTCCCAGTTCTCCAGAGG	CCCAGAAGACTCAGAATGGCAC	55,8°C	193
NR1	TACACTGCCAACTTCCGAGCTTTC	GCACAGTAACCAGGTTACTAGGGA	58,2°C	201
mGluR1	CCAACGGAGGGATCACAATAA	TCCAGCCTCAGCTTCAGGAA	80°C	79
mGluR2	TGGCACAGGCAAGGAGACA	CGGTGGTTACAGCGCAATG	58°C	198
mGluR3	TGCCTCTGAGGGTGACTATGG	ATGTTACGCAGCCGTGCTT	56,6°C	196
mGluR5	TTonGTGGCAGCGACTGTCTGT	TCTTGGGAAAGGGTTTGATGA	58,1°C	165
mGluR7	CAGAAACGGAAGCGAAGCTT	GTTTGTGTGACAGCCTTGATGAC	81°C	70

10 Ensaio de Gel de Retardo (Eletrophoretic Mobility Gel Shift Assay – EMSA) para o NF-kB.

10.1 Extração de Proteínas Nucleares de Tecido

As glândulas foram sonicadas em 100ul Tampão de Lise (10mM HEPES pH 7.5, 10mM KCl, 0.1mM EDTA pH 8.8, 10% de glicerol, 1.0mM DTT, 0.1mM PMSF, 1.0 ug/ml de leupeptina, 1.0ug/ml de pepstatina, 0.08 ug/ml de aprotina) e mantidas no gelo por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 25ul de NP40 (10%) às amostras e as mesmas foram homogeneizadas por 10 segundos e centrifugadas a 4° C por 1 minuto a 12.000g. O precipitado resultante dessa centrifugação foi ressuspenso em 50ul de Tampão de Lise e centrifugado a 4° C por 5 minutos a 12.000g. O precipitado foi ressuspenso em 20ul de Tampão de Extrato Nuclear (10mM HEPES pH 7.5; 0.5M KCl; 1mM EDTA pH 8.0; 10% de glicerol, 1mM DTT; 0.1mM PMSF; 1.0 ug/ml de leupeptina, 1.0ug/ml de pepstatina, 0.08 ug/ml de aprotina) e mantido gelo por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se as amostras a 4° C por 5 minutos a 20.000g. Após a centrifugação, aliquotou-se todo o sobrenadante (extrato nuclear) e o estocou-se a -85° C até sua utilização. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford. Foi necessário um conjunto de 4 glândulas para n=1, para dosar o NF-kB.

10.2 Extração de Proteínas Nucleares de Células

Às amostras dos astrócitos e pinealócitos foram acrescentados 400ul de Tampão de Lise (10mM de HEPES pH 7.9, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF, 0,1mM EDTA) e estas foram mantidas no gelo por 15 minutos; em seguida adicionou-se 10ul de NP40% e homogeneizou-se no vórtex por 30 segundos e centrifugou-se a 4° C por 20 minutos a 11.000g. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 50ul de Tampão de Extração Nuclear (20mM de HEPES pH 7.9, 1,5mM MgCl₂, 300mM NaCl, 0,25mM EDTA, 25% glicerol, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF) e deixou-se por 20 minutos no gelo e, em seguida, centrifugou-se a 4° C por 20 minutos a 11.000g. Após a centrifugação, aliquotou-se todo o sobrenadante (extrato nuclear) e o estocou-se a -85° C até ser utilizado. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

10.3 Marcação da Sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCC AGG C-3' – para o NF-κB) e a (5'-CTTGGCTGACGTCAGAGA-3'-para CRE) foi marcado com a adição de γ -³²P ATP numa solução contendo Tampão T4 quinase, T4 quinase e água; nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1U/μl de T4 quinase, 1 μl de γ -³²P ATP (3Ci/mmol), 1 μl de tampão T4 Kinase Buffer (10 X) em 10 μl de volume de reação. Após incubação à 37° C por 10 minutos, o excesso de γ -³²P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25) em um tubo de microcentrífuga, centrifugando-se por 1 minuto a 3.000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação, o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, usando no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/μl.

10.4 Reação de Ligação e Corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4μl de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5mM; EDTA 2,5mM; DTT 2,5mM; NaCl 300mM; Tris-HCl 50mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25μg/μL; glicerol 20%); extrato nuclear na quantidade suficiente para 10 μg de proteína; oligo frio em excesso, ou anticorpo específico para subunidades (para caracterizar especificidade); e H₂O q.s.p. para 20μl de volume final (contando com a adição da sonda marcada).

O material foi incubado por 20 minutos em temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 µl), e novamente foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 µl de azul de bromofenol ao controle (-). O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90mM, Ácido Bórico 90mM, EDTA 1mM). A corrida teve uma duração aproximada de 2 horas a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi secado procedendo-se em seguida a exposição do filme ao gel em cassete a -20° C.

10.5 Revelação

Em sala escura o filme foi mergulhado em solução reveladora diluída 5X até as bandas aparecerem, lavando-se em água, e depois mergulhando-se o filme no fixador diluído 5X.

11 Avaliação da Taxa de Necrose e Apoptose dos Pinealócitos por Citometria de Fluxo.

Glândulas pineais em cultura foram estimuladas com noradrenalina 1µM, na ausência ou na presença de glutamato 100µM ou 600µM e incubadas por 5 horas, para avaliar os efeitos do glutamato na viabilidade celular e na fragmentação do DNA em uma situação semelhante àquela em que foi avaliada a melatonina. Após a incubação, as células foram obtidas pelo método de digestão proteolítica com papaína sendo analisadas no citômetro FACScan (Becton and Dickinson, Montain View, CA, USA).

Para análise da integridade da membrana celular (viabilidade), adicionou-se às amostras 300µl de tampão salina (PBS) e 50µl da solução de iodeto de propídeo (2µg/ml). As mesmas foram agitadas suavemente e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura no citômetro realizou-se imediatamente após a incubação.

Para análise da fragmentação do DNA foi utilizado o que sobrou das leituras anteriores. Pipetou-se 200 µl do tampão de lise contendo iodeto de propídeo (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 2µg/ml de iodeto de propídeo) nas amostras, que foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura foi realizada imediatamente após o término da incubação.

12 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism 5. A análise de variância foi realizada pelo teste ANOVA unifatorial e o pós-teste utilizado foi o teste de Bonferroni para comparação entre todos os grupos experimentais ou os testes de Dunnett e Newman-Keuls para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle. Os gráficos para análise dos resultados da microscopia confocal foram feitos utilizando o programa Origin 5.0. A análise densitométrica da ativação do NF-kB foi feita através do programa Scion Image.

13 Grupos Experimentais

Foram realizados os seguintes grupos experimentais para:

Quantificação da Melatonina:

- Glândulas pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de glutamato (100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M) e do antagonista do receptor ionotrópico do tipo NMDA, o MK-801 (0,1mM).
- Glândulas pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença de AMPA em diferentes concentrações (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M).
- Glândula pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença dos agonistas dos receptores metabotrópicos dos grupos I e II, 3,5 Dihidroxifenilglicina (DHPG) e (2S,3S,4S)-CCG/(2S,1`S,2`S)-2-Carboxiciclopropil glicina (LCCG), respectivamente. O agonista DHPG foi usado nas concentrações 5 μ M e 50 μ M, já o agonista LCCG foi utilizado nas concentrações de 10 μ e 100 μ M.
- Pinealócitos isolados estimulados com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença de glutamato em 2 concentrações (100 μ M e 600 μ M).
- Co-cultura de astrócitos e pinealócitos com as células estimuladas com noradrenalina 1 μ M na ausência ou na presença de diferentes concentrações de glutamato (100, 200, 400 e 600 μ M) e sem estimulação.
- Glândulas pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença do glutamato (100 μ M e 600 μ M) e do Ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) (300 μ M), o qual é um inibidor da translocação do NF-kB para o núcleo.

Medir a atividade da enzima AANAT:

- Glândulas pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença de glutamato 100 μ M e 600 μ M.

Análise de RT-PCR:

- A fim de verificar a presença de receptores metabotrópicos e ionotrópicos de glutamato em astrócitos e pinealócitos.

Microscopia Confocal:

- Astrócitos com AMPA 50 μ M, NMDA 100 μ M e o agonista do receptor metabotrópico do grupo I, DHPG 50 μ M.

Ensaio de gel de retardo para o NF-kB:

- Glândulas pineais em cultura sem estimulação (controle), ou estimuladas com noradrenalina 1 μ M, glutamato 600 μ M e noradrenalina 1 μ M associada com glutamato 600 μ M. Também foram utilizados astrócitos isolados sem estimulação (controle) ou estimulados com noradrenalina 1 μ M e glutamato 600 μ M; e pinealócitos isolados sem estimulação (controle) e estimulados com glutamato 600 μ M.

Ensaio de Competição (super-shift):

- Glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μ M e glutamato em duas concentrações: 100 μ M e 600 μ M.

Citometria de fluxo:

- Foram utilizados 2 grupos: o primeiro foi estimulado com noradrenalina 1 μ M na ausência ou na presença de glutamato 100 μ M ou 600 μ M por 5 horas; e o segundo foi estimulado com noradrenalina 1 μ M na ausência ou na presença do inibidor do NF-kB, PDTC (300 μ M), também por 5 horas.

IV. RESULTADOS

Em glândulas pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina $1\mu\text{M}$, o glutamato inibiu a síntese de melatonina de modo dependente de concentração, com a maior concentração de glutamato ($600\mu\text{M}$) reduzindo em aproximadamente 40% a síntese de melatonina ($n=12$ para todos os grupos, One-Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Dunnet: $p<0,05$ para os grupos estimulados com glutamato 200 e $400\mu\text{M}$ e $p<0,01$ para o grupo estimulado com glutamato $600\mu\text{M}$) (Figura 12).

O MK801 ($100\mu\text{M}$), antagonista competitivo do receptor para glutamato do tipo NMDA, não antagonizou os efeitos inibitórios induzidos pelo glutamato na síntese de melatonina ($n=12$ para todos os grupos, One-Way ANOVA: $p>0,05$) (Figura 12). No entanto, o agonista AMPA, reduziu a síntese de melatonina em glândulas estimuladas pela noradrenalina $1\mu\text{M}$, em todas as concentrações utilizadas, 1, 10 e $50\mu\text{M}$ ($n=12$ para todos os grupos, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Newman-Keuls: $p<0,01$) (Figura 13). Os agonistas dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos dos grupos I e II, DHPG e LCCG, respectivamente, também inibiram a síntese de melatonina. Porém, enquanto o agonista DHPG inibiu significativamente a síntese de melatonina somente na concentração de $50\mu\text{M}$ ($n=12$ para todos os grupos, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Dunnet: $p<0,05$), o agonista LCCG inibiu a síntese da mesma nas duas concentrações utilizadas, 10 e $100\mu\text{M}$ ($n=12$ para todos os grupos, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Dunnet: $p<0,01$) (Figura 14)

O glutamato na concentração de $600\mu\text{M}$ também inibiu significativamente a atividade da enzima passo-limitante da síntese da melatonina, a AANAT ($n=12$ para todos os grupos, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Dunnet: $p<0,01$) (Figura 15).

Na cultura de pinealócitos isolados, os resultados mostraram que não houve redução da síntese de melatonina, induzida por noradrenalina, para as duas concentrações de glutamato utilizadas ($100\mu\text{M}$ e $600\mu\text{M}$) ($n=6$ para todos os grupos, One Way ANOVA: $p>0,05$) (Figura 16). No entanto, quando os pinealócitos foram cultivados juntamente com os astrócitos em co-cultura, o glutamato apresentou o seu efeito inibitório sobre a síntese de melatonina ($n=8$ para todos os grupos, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Bonferroni: $p<0,001$) (Figura 17).

Verificou-se, através da análise de RT-PCR, a existência de expressão gênica dos receptores para glutamato tanto em astrócitos como em pinealócitos. Demonstrou-se a expressão gênica dos receptores metabotrópicos do grupo I (mGluR1 e mGluR5) e do grupo II (mGluR2 e mGluR3) em astrócitos e pinealócitos. No entanto, não foi observada a expressão do receptor metabotrópico do grupo III, mGluR7, nos dois tipos celulares estudados (n=3 para cada grupo experimental) (Figura 18). Também foi demonstrada a expressão gênica das subunidades do receptor ionotrópico do tipo AMPA, iGluR1, iGluR2 e iGluR3, e da subunidade NR1 do receptor ionotrópico do tipo NMDA em astrócitos e pinealócitos (n=3 para cada grupo experimental) (Figura 19).

A avaliação da concentração de cálcio intracelular por microscopia confocal mostrou que os agonistas glutamatérgicos, AMPA (50 μ M), DHPG (50 μ M) e NMDA (100 μ M), induziram um aumento do cálcio em astrócitos isolados (Gráficos representativos a no mínimo 20 células estimuladas com cada agonista) (Figura 20).

Em cultura de glândula pineal o NF-kB foi ativado tanto pelo glutamato 600 μ M quanto pela noradrenalina 1 μ M, mas ambos em conjunto, não apresentaram um efeito somatório (n=6 para cada grupo, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste: Bonferroni $p<0,05$) (Figura 21). E em ambos os casos a subunidade do NF-kB ativada é a p50, mesmo para as duas concentrações de glutamato utilizadas, 100 e 600 μ M (Figuras 22 e 23). No entanto, em astrócitos isolados, o NF-kB foi ativado somente quando as células foram estimuladas com glutamato 600 μ M, não apresentando ativação pela noradrenalina (1 μ M) (n=5 para cada grupo, One Way ANOVA: $p<0,05$; pós-teste Dunnet: $p<0,05$) (Figura 24). Por outro lado, em pinealócitos, o glutamato (600 μ M) foi incapaz de ativar o NF-kB (n=3 para cada grupo, teste t: $p>0,05$) (Figura 25).

O PDTC (300 μ M), inibidor do NF-kB, inibiu a síntese de melatonina estimulada por noradrenalina em aproximadamente 40% (n=12 para cada grupo, teste t: $p<0,01$) (Figura 26). Os resultados apresentados na Figura 27 (n=12 para todos os grupos, One Way ANOVA: $p>0,05$) mostram que o PDTC quando foi adicionado à cultura de glândula pineal, estimulada com noradrenalina (1 μ M) associadamente ao glutamato 100 μ M, parece reverter a ação do glutamato sobre a síntese de melatonina (embora os resultados não sejam estatisticamente significantes)

A análise da necrose e apoptose das células da pineal por citometria de fluxo mostrou que as células da pineal se mantêm íntegras mesmo quando estimuladas com altas concentrações de glutamato, o mesmo ocorrendo quando as glândulas foram incubadas com PDTC (300 μ M). As glândulas estimuladas com glutamato 100 e 600 μ M associadas com

noradrenalina 1 μ M, por 5 horas, apresentaram taxas de viabilidade celular de aproximadamente 86 e 89%, respectivamente, enquanto que o grupo controle (estimulado somente com noradrenalina 1 μ M) apresentou taxa de viabilidade celular de 92,37% (Figura 28). Já a taxa de fragmentação do DNA das glândulas estimuladas com glutamato 100 e 600 μ M foi de aproximadamente 2 e 3%, respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou taxa de fragmentação do DNA de 3,64% (Figura 29). A incubação com PDTC, por 5 horas, em glândulas pineais mantidas em cultura apresentou taxa de viabilidade celular de aproximadamente 92%, enquanto o grupo controle (estimulado somente com noradrenalina 1 μ M), teve 92,07% de viabilidade celular (Figura 30). A taxa de fragmentação do DNA, das glândulas incubadas com PDTC foi de aproximadamente 13% e a do grupo controle foi de 11,72% (Figura 31) (Todos os gráficos das Figuras 28, 29, 30 e 31 são representativos a 2 repetições desses experimentos).

Figura 12. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μM , na ausência ou na presença do glutamato associado ou não ao antagonista MK-801. (n=12 para todos os grupos) *p<0,05, **p<0,01 (pós-teste Dunnett).

Figura 13. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μM , na ausência ou na presença do agonista AMPA. (n=12 para todos os grupos) *p<0,01 (pós-teste Newman-Keuls).

Figura 14. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μ M, na ausência ou na presença dos agonistas DHPG e LCCG. (n=12 para todos os grupos) *p<0,05 e **p<0,01 (pós-teste Dunnet).

Figura 15. Efeito do glutamato sobre a atividade da enzima AANAT, em cultura de glândula pineal estimulada com noradrenalina 1 μ M. (n=12 para todos os grupos) **p<0,01 (pós-teste Dunnet).

Figura 16. Melatonina secretada para o meio de cultura por pinealócitos isolados estimulados com noradrenalina 1μM, na ausência ou na presença de glutamate. (n=6 para todos os grupos).

Figura 17. Conteúdo de melatonina do meio de cultura de pinealócitos cultivados em co-cultura com astrócitos e estimulados com noradrenalina 1μM, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de glutamate. No grupo controle não houve estimulação das células. (n=8 para todos os grupos) ***p<0,01 (pós-teste Bonferroni).

Figura 18. Análise de RT-PCR para presença de receptores metabotrópicos de glutamato em astrócitos e pinealócitos isolados. (a) Marcador, (b) água, (c) astrócitos isolados, (d) pinealócitos isolados e (e) hipocampo (n=3 para todos os grupos).

Figura 19. Análise de RT-PCR para a presença das subunidades do receptor ionotrópico do tipo AMPA e da subunidade do receptor ionotrópico do tipo NMDA (NR1) em astrócitos e pinealócitos isolados. (a) Marcador, (b) Água, (c) astrócitos isolados, (d) pinealócitos isolados e (e) hipocampo (n=3 para cada grupo).

Figura 20. Aumento do cálcio intracelular em astrócitos isolados estimulados com agonistas glutamatérgicos. (A) DHPG 50 μ M, (B) AMPA 50 μ M e (C) NMDA 100 μ M. Gráfico representativo a no mínimo 20 células estimuladas farmacologicamente.

Figura 21. Ensaio de gel de retardo para o NFκB, em cultura de glândula pineal. Glândulas pineais sem estimulação, grupo controle (a), ou estimuladas com noradrenalina 1μM (b), glutamato (600μM) (c) ou noradrenalina 1μM + glutamato 600μM (d) (A). A análise densitométrica dos mesmos dados está representada em B. (n=6 para cada grupo) *p<0,05 (pós-teste Bonferroni).

Figura 22. Ensaio de competição (super-shif) em glândulas pineais estimuladas com noradrenalina 1 μ M. Com o oligonucleotídeo frio (b), oligonucleotídeo inespecífico (c), e os anticorpos p50 (d), p52 (e), p65 (f) e c-Rel (g), mostrando o retardo da banda ainda maior com o anticorpo para p50. Todas as glândulas foram estimuladas com noradrenalina 1 μ M. A coluna a é o grupo controle, estimulado somente com noradrenalina 1 μ M.

Figura 23. Ensaio de competição (super-shif) em glândulas pineais estimuladas com 2 concentrações diferentes de glutamato. A coluna a é o controle, b (glutamato 200 μ M), c (glutamato 600 μ M). As colunas de d-i correspondem ao glutamato 200 μ M com oligonucleotídeo frio (d), oligonucleotídeo inespecífico (e), e os anticorpos p50 (f), p52 (g), p65 (h) e c-Rel (i). As colunas de j-o correspondem ao glutamato 600 μ M com oligonucleotídeo frio (j), oligonucleotídeo inespecífico (k), e os anticorpos p50 (l), p52 (m), p65 (n) e c-Rel (o). O ensaio mostra o retardo da banda ainda maior com o anticorpo p50 para as 2 concentrações de glutamato.

Figura 24. Ensaio de gel de retardo para o NF κ B em cultura de astrócitos isolados. Grupo controle (sem estimulação) (a), ou estimulados com noradrenalina 1 μ M (b), ou glutamato 600 μ M (c). (n=5 para cada grupo) *p<0,05 (pós-teste Dunnet).

Figura 25. Ensaio de gel de retardo para o NFκB, em cultura de pinealócitos isolados. Grupo controle (sem estimulação) (a), ou estimulados com glutamato 600μM (b) (n=3 para cada grupo).

Figura 26. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1μM, na ausência ou na presença do PDTC (300μM). (n=12 para cada grupo) **p<0,01 (teste t).

Figura 27. Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1μM, na ausência ou na presença do glutamato e do PDTC (300μM) (n=12 para todos os grupo).

Figura 28. Avaliação da viabilidade celular em glândulas pineais estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com glutamato 100uM (B) ou glutamato 600uM (C) após um período de incubação de 5 horas. Gráficos representativos a 2 repetições desse experimento.

Figura 29. Avaliação da fragmentação do DNA de células da glândula pineal estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com glutamato 100uM (B) e glutamato 600u (C) no período de incubação de 5 horas. Gráfico representativo a 2 repetições desse experimento.

Figura 30. Avaliação da viabilidade celular em glândulas pineais estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com PDTC 300uM (B) após um período de incubação de 5 horas. Gráfico representativo a 2 repetições desse experimento.

Figura 31. Avaliação da fragmentação do DNA de células da glândula pineal estimuladas com noradrenalina 1uM (A), e associadas com PDTC 300uM (B) após um período de incubação de 5 horas. Gráfico representativo a 2 repetições desse experimento.

V. DISCUSSÃO

Os trabalhos publicados até hoje mostram que a ativação dos receptores nicotínicos, pela acetilcolina, resulta na despolarização da membrana dos pinealócitos ativando os canais para cálcio do tipo L, causando um aumento da concentração intracelular de cálcio, o que desencadeia a exocitose do glutamato (Glu) que está estocado em microvesículas (Yamada *et al*, 1996; Yamada *et al*, 1998). O Glu liberado pode interagir com receptores presentes tanto nos pinealócitos vizinhos como com os da própria célula responsável pela sua liberação, caracterizando, portanto, ações parácrinas e autócrinas do Glu na glândula pineal. O trabalho publicado por Yamada *et al* (1998) demonstra que a inibição da síntese de melatonina pelo Glu é causada pela ativação do receptor metabotrópico do grupo II, mGluR3, presente nos pinealócitos. Enquanto Yatsushiro *et al* (2000) demonstraram que o receptor ionotrópico do tipo AMPA (AMPA), em pinealócitos, formado pela subunidade iGluR1, aumenta a concentração intracelular de cálcio potencializando o sinal colinérgico na glândula pineal. Contudo, os efeitos do glutamato agindo nos seus diversos tipos de receptores presentes na pineal, assim como uma possível interação entre pinealócitos e astrócitos nas ações mediadas pelo glutamato na glândula pineal de ratos ainda não tinham sido investigados.

Nossos resultados mostram que o glutamato inibe a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura, estimuladas com noradrenalina, de modo dependente de concentração. No que se diz respeito aos receptores envolvidos no efeito inibitório do glutamato sobre a síntese de melatonina, nossos resultados mostram que o receptor ionotrópico do tipo NMDA não é relevante para esse efeito, pois quando usamos o antagonista do receptor NMDA, o Mk-801, este não antagonizou a redução da síntese de melatonina (Figura 12). Embora tenha sido observada uma expressão gênica da subunidade essencial do receptor ionotrópico do tipo NMDA, NR1, tanto em pinealócitos como em astrócitos (Figura 19), nossos resultados sugerem que esse receptor estaria desempenhando um outro papel na glândula pineal de ratos, sem estarem envolvidos nas ações mediadas pelo glutamato sobre a síntese de melatonina ou até mesmo que não exista a presença desse receptor em pinealócitos na glândula pineal de ratos. Kaur *et al* (2005) demonstraram através de estudos imunohistoquímicos a presença do receptor ionotrópico do tipo NMDA somente em astrócitos, dados que confirmamos através da microscopia confocal, onde astrócitos

isolados estimulados com o agonista NMDA apresentaram um aumento da concentração intracelular de cálcio (Figura 20).

Quando utilizamos o agonista dos receptores metabotrópicos do grupo II, LCCG, pudemos constatar uma inibição da síntese de melatonina para as duas concentrações utilizadas (Figura 14), confirmando os dados da literatura (Yamada et al 1998). Apesar do trabalho referido afirmar que a inibição da síntese de melatonina causada pelo glutamato é mediada pelo receptor mGluR3, pois em seu trabalho não foi detectado níveis de RNAm para o mGluR2, nossos resultados da análise de RT-PCR mostram a presença de uma expressão gênica do mGluR2, em astrócitos e pinealócitos (Figura 18), indicando portanto que a inibição da síntese de melatonina pelo glutamato também pode ser mediada pelo mGluR2, pois o agonista LCCG não é específico para um ou outro receptor. Apesar de existirem trabalhos mostrando a presença do receptor metabotrópico do grupo I, mGluR5, em astrócitos e pinealócitos na glândula pineal de ratos, a presença de uma expressão gênica do receptor metabotrópico do grupo I, mGluR1, tanto em astrócitos como em pinealócitos, somente foi demonstrada através das nossas análises de RT-PCR (Figura 18). Além disso, o papel fisiológico dos receptores metabotrópicos do grupo I sobre a síntese de melatonina ainda não estava definido. Utilizando o agonista dos receptores metabotrópicos do grupo I, DHPG, pudemos observar uma redução da síntese de melatonina quando o utilizamos na concentração de 50 μ M, mas não foi possível discriminar os efeitos em mGluR5 e mGluR1, devido à inespecificidade do agonista DHPG (Figura 14). Já o agonista AMPA reduziu a síntese de melatonina significativamente em todas as concentrações utilizadas (Figura 13). Portanto, os resultados mostram que o receptor do tipo AMPA e os receptores metabotrópicos dos grupos I e II possuem um papel importante no efeito inibitório do Glu sobre a síntese de melatonina.

O mecanismo pelo qual os receptores metabotrópicos do grupo II inibem a síntese de melatonina já estão definidos na literatura. Esses receptores estão acoplados a uma proteína G inibitória, o que resulta na inibição da síntese do AMPc intracelular e conseqüentemente na inibição da atividade da AANAT e da síntese de melatonina. No entanto, o modo como os receptores metabotrópicos do grupo I reduzem a melatonina na glândula pineal de ratos ainda não foi demonstrado. Ao que tudo indica a estimulação desses receptores, os quais mobilizam a liberação de cálcio dos estoques internos através da estimulação do IP₃, estaria inibindo a síntese de melatonina por aumentar a concentração intracelular de cálcio. Conseqüentemente resultando na liberação do glutamato, que fica estocado em microvesículas, um processo que é feito por exocitose mediada pelo cálcio; da mesma maneira que o receptor ionotrópico do

tipo AMPA, ao qual foi atribuído um papel potenciador do sinal colinérgico na glândula pineal, inibindo a síntese de melatonina (Yamada *et al*, 1998; Yatsushiro *et al*, 2000).

No SNC, os AMPARs, são responsáveis por mediar a maior parte da transmissão sináptica rápida. As subunidades que formam esse receptor (GluR1-4) podem se ligar em homo ou heterotetrâmeros. Foi demonstrado que receptores que possuem a subunidade GluR2 são impermeáveis ao cálcio e isso faz com que a subunidade GluR2 desempenhe um papel determinante da função dos AMPARs. Embora a maioria das células do SNC que possuem o receptor AMPA apresente a subunidade GluR2, a ausência dessa subunidade tem sido observada em células neuronais e intersticiais em várias regiões do SNC. O que faz com que a regulação da entrada de cálcio pelo AMPARs seja crucial na plasticidade sináptica, desenvolvimento neuronal e doenças neurológicas, uma vez que AMPARs permeáveis ao cálcio podem alterar propriedades sinápticas, cascatas de sinalização dependentes de cálcio ou até mesmo causar danos em neurônios e células da glia (Cull-Candy *et al*, 2006). Na pineal foi demonstrada a presença da subunidade GluR2 em astrócitos, porém não estava claro se essa subunidade estaria presente também nos pinealócitos (Kaur *et al*, 2005). Através da análise de RT-PCR, verificamos a expressão gênica das subunidades GluR1, GluR2 e GluR3 em astrócitos e pinealócitos, porém a existência da subunidade GluR4 ainda necessita ser caracterizada (Figura 19). Apesar de não termos demonstrado a presença do receptor, por meio de estudos imunohistoquímicos ou por “western blot”, esses dados sugerem que o receptor ionotrópico do tipo AMPA, na glândula pineal de ratos, não é formado por um complexo homomérico composto somente pela subunidade GluR1 como foi proposto por Yatsushiro *et al* (2000). Além de que a expressão gênica da subunidade GluR2, tanto em astrócitos como em pinealócitos, nos leva a crer que esse receptor é impermeável ao cálcio na glândula pineal de ratos. Embora a presença da subunidade GluR2 torne os AMPARs impermeáveis ao cálcio, Yamada *et al* (1996) demonstraram que o aumento da concentração intracelular de cálcio através da ativação do receptor ionotrópico do tipo AMPA, na glândula pineal de ratos, se dá através da ativação dos canais para cálcio do tipo L quando a membrana dos pinealócitos é despolarizada após uma estimulação do receptor AMPA pelo Glu.

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que o glutamato possui uma ação inibitória sobre a síntese da melatonina, diminuindo a atividade da enzima passo-limitante deste processo, a AANAT. No entanto, Ishio *et al* (1999) também demonstraram que o Glu inibe a atividade da enzima HIOMT, sugerindo que a inibição da síntese de melatonina causada pelo glutamato ocorra através de duas vias distintas de sinalização. Diferentemente do que para a AANAT não foi observada nenhuma alteração na expressão do gene da

HIOMT, além de que suas análises farmacológicas sugerem que a inibição da atividade da HIOMT não é via mGluR3 e diminuição do AMPc. Enquanto a estimulação do receptor β_1 adrenérgico, pela noradrenalina, está envolvida com o aumento do AMPc e estimulação da síntese de melatonina, estudos demonstram que nem a noradrenalina ou o AMPc possuem efeitos na atividade da HIOMT, em glândulas pineais de ratos em cultura. (Ribelayga *et al*, 1997; Ishio *et al*, 1999)..

Como neste trabalho utilizou-se uma concentração elevada de glutamato (600 μ M), e apesar de já ter sido demonstrado, em outros modelos celulares, que o glutamato em altas concentrações pode induzir morte celular, através da citometria de fluxo foi evidenciado que as células contidas na pineal se mantêm íntegras, mesmo estimuladas com glutamato 600 μ M, indicando que o efeito causado por essa droga na síntese de melatonina não está associado à morte celular (Figuras 28 e 29).

Em cultura de pinealócitos isolados incubados com glutamato e estimulados com noradrenalina, não foi observada nenhuma redução da síntese de melatonina, indicando uma provável participação dos astrócitos no efeito inibitório do glutamato sobre a síntese de melatonina (Figura 16). Isto foi confirmado pelos resultados da co-cultura (Figura 17) que mostraram que pinealócitos na presença de astrócitos apresentam uma redução significativa da síntese da melatonina quando estimulados com glutamato, logo evidenciando uma efetiva participação dos astrócitos nos efeitos inibitórios causados pelo glutamato sobre a síntese da melatonina. Durante muitos anos acreditava-se que o papel dos astrócitos no SNC era exclusivamente de promover suporte estrutural à rede de células neuronais, porém estudos mais recentes mostram que os astrócitos têm a capacidade de liberar transmissores químicos, os quais podem controlar a atividade sináptica (Halassa *et al*, 2007). Portanto, isso leva a crer que essas células estão intimamente envolvidas na regulação da rede neuronal e são determinantes nas funções cerebrais.

Porém, ainda não está claro qual seria a função dos astrócitos na pineal. Nossos resultados da análise de RT-PCR e a confirmação (através da microscopia confocal) da presença dos receptores ionotrópicos dos tipos AMPA e NMDA e dos receptores metabotrópicos do grupo I, os quais estão envolvidos com o aumento do cálcio intracelular, e dessa forma regulam diversas sinapses no SNC; assim como a evidência de uma possível participação dos astrócitos nos efeitos inibitórios causados pelo glutamato sobre a síntese de melatonina, nos levam a crer que assim como os astrócitos do SNC, os da pineal também devem desempenhar um papel na comunicação celular com os pinealócitos. Os dados da literatura não estão muito claros em relação à existência dos diversos tipos de receptores para

Glu nos dois tipos celulares presentes na glândula pineal. Nossos resultados da análise de RT-PCR demonstram a expressão gênica dos receptores metabotrópicos do grupo I (mGluR1 e mGluR5) e do grupo II (mGluR2 e mGluR3), além das subunidades dos receptores ionotrópicos do tipo AMPA (GluR1, GluR2 e GluR3) e do tipo NMDA (NR1) em astrócitos e pinealócitos. Esses resultados indicam que a sinalização glutamatérgica via receptores de glutamato na pineal é mais complexa do que havia sido proposto nos trabalhos de Yamada *et al* (1998) e Yatsushiro *et al* (2000), e envolve não somente os pinealócitos, mas também os astrócitos na pineal.

Quanto à análise do papel do fator de transcrição NF-kB na glândula pineal de ratos, nossos resultados mostram que o NF-KB foi ativado tanto pela noradrenalina como pelo glutamato, em glândulas pineais mantidas em cultura, mas ambos em conjunto não apresentaram um efeito somatório (Figura 21). Embora ambos possuam efeitos completamente opostos sobre a síntese de melatonina, a subunidade ativada nos dois casos foi a p50 (Figuras 22 e 23). Esses resultados nos levaram a crer que a ativação do NF-kB pelo glutamato e pela noradrenalina estaria ocorrendo em tipos celulares diferentes. E essa hipótese foi confirmada quando avaliamos a ativação do NF-kB em astrócitos e pinealócitos, em que pudemos observar que o glutamato foi capaz de ativar o NF-kB somente dos astrócitos, sugerindo portanto que o NF-kB dos pinealócitos é ativado pela noradrenalina (Figuras 24 e 25).

O inibidor da translocação do NF-kB para o núcleo, PDTC, inibiu a síntese de melatonina estimulada por noradrenalina em aproximadamente 40% (Figura 26), indicando que a ativação do NF-kB tem um papel fundamental na síntese de melatonina. Até agora somente o trabalho de Maronde *et al* (1999) tinha demonstrado que a estimulação da síntese de melatonina era modulada por um fator de transcrição, no caso a CREB, a qual quando está fosforilada é responsável pela transcrição do gene da AANAT (enzima passo-limitante da síntese da melatonina) e conseqüentemente sua ativação.

Em relação aos dados da literatura, nossos resultados não reproduzem aqueles expostos no único trabalho publicado sobre o NF-kB na glândula pineal (Ferreira *et al*, 2005) que mostra que a modulação positiva da síntese de melatonina é mediada pela inibição da via do NF-kB. Contudo é preciso ressaltar que o protocolo experimental usado em nosso trabalho não foi o mesmo utilizado no trabalho referido, onde as glândulas pineais foram incubadas por 48 horas com PDTC (12.5µM) e em seguida estimuladas com noradrenalina (10nM). O trabalho de Liu *et al* (2006) demonstra que em uma incubação por 48 horas com PDTC (10µM) é possível observar uma redução de aproximadamente 50% no número de células

SKOV-3 (células cancerígenas de ovário), o que sugere que as células entram em apoptose pelo fato de a via do NF-kB estar inibida. Em nosso trabalho, as glândulas foram incubadas com PDTC (300 μ M) por 30 minutos e em seguida estimuladas com noradrenalina (1 μ M), permanecendo nesta condição por 5 horas. Para termos certeza de que a inibição da síntese de melatonina pelo PDTC não estaria associada à morte celular, avaliou-se as taxas de necrose e apoptose das células contidas na pineal, por citometria de fluxo. E os resultados mostraram que em uma incubação de 5 horas com PDTC, as células da pineal se mantêm íntegras (taxas de viabilidade celular e fragmentação do DNA de 92% e 13%, respectivamente [Figura 30 e 31]). É preciso ressaltar ainda que em nosso trabalho a ativação do NF-kB foi avaliada a partir de 30 minutos de incubação, ao passo que no trabalho de Ferreira *et al* (2005) foi medida depois de 5 horas de incubação. Existem trabalhos que mostram que em células normais, a ativação do NF-kB é transitória devido à uma regulação de “feedback” negativo através da ação da proteína I κ B (a qual impede a entrada do NF-kB no núcleo e sua ligação ao DNA) (Inoue *et al*, 2007), o que também poderia explicar a diferença dos nossos resultados se comparados aos de Ferreira *et al* (2005).

Os resultados apresentados na Figura 27, embora não sejam estatisticamente significantes, mostram uma tendência de reversão da inibição da síntese de melatonina causada pelo glutamato, quando as glândulas foram incubadas com PDTC (300 μ M), o que poderia indicar que a inibição da síntese de melatonina pelo glutamato estaria sendo modulada pelo NF-kB. Visto que o glutamato só apresenta seu efeito inibitório sobre a síntese da melatonina na presença dos astrócitos e essa inibição estaria sendo modulada pela ativação do NF-kB dos astrócitos (já que o glutamato foi capaz de ativar o NF-kB apenas dos astrócitos), isso nos leva a crer que mediante essa ativação os astrócitos estejam liberando algum fator, o qual vai atuar paracrinamente juntamente com o glutamato nos pinealócitos, provocando uma diminuição da síntese de melatonina.

Yamada *et al* (1998) demonstraram que a inibição da síntese de melatonina induzida pelo glutamato depende da estimulação do receptor metabotrópico do tipo mGluR3, presente nos pinealócitos, os quais por estarem acoplados a uma proteína Gi inibem o AMPc e conseqüentemente a síntese da mesma. No entanto, em nosso trabalho ficou evidente a participação dos astrócitos nas ações mediadas pelo glutamato, e ao mesmo tempo nós evidenciamos a presença de uma expressão gênica dos receptores metabotrópicos do grupo II, mGluR2 e mGluR3 também em astrócitos, além de que uma estimulação com o agonista específico para esses receptores, o LCCG, reduziu a síntese de melatonina em aproximadamente 50% (Figuras 14 e 18). Embora uma via clássica de ativação para o NF-kB

seja através do aumento intracelular de cálcio, nossos dados poderiam indicar que o LCCG estaria atuando de maneira inespecífica, agindo também em outros tipos de receptores, como o mGluR1 e mGluR5 (também presentes nos astrócitos [Figura 18]), os quais estão envolvidos com um aumento do cálcio intracelular e quando estimulados com seu respectivo agonista, o DHPG, também reduzem a síntese de melatonina (Figura 14). Ou que exista uma outra via de sinalização intracelular dos receptores metabotrópicos do grupo II, diferente da inibição do AMPc, ainda não descrita na literatura.

Estudos no SNC mostram que os astrócitos são capazes de liberar diversos transmissores químicos, chamados de gliotransmissores, como por exemplo: glutamato, D-serina, ATP, taurina, ácido homocisteico e grandes moléculas como o fator natriurético atrial (Halassa *et al*, 2007). No entanto, os astrócitos também podem liberar várias citocinas pró-inflamatórias em resposta à uma ativação do NF- κ B. Dentre os genes que podem ser ativados pelo NF- κ B nos astrócitos podemos citar: TNF- α , interleucina-1 (IL-1), NOS induzida, resultando na produção de óxido nítrico (NO) (Mattson, 2005). Dados da literatura mostram que IL-1 aumenta a concentração de triptofano no SNC (Laviano, 1996), o que poderia levar a um aumento da produção de melatonina, visto que o triptofano é o substrato desta síntese. Estudos demonstram que o NO estimula a formação do GMPc, o qual fosforila a p42/p44MAPK resultando no aumento da atividade da enzima AANAT, consequentemente estimulando a síntese da melatonina (Lin *et al*, 1994; Ho *et al*, 2006). Com relação ao TNF- α , no entanto, foi mostrado que a estimulação de glândulas pineais com TNF- α reduz a transcrição do gene da AANAT e o precursor da síntese da melatonina, a N-acetilserotonina (Fernandes *et al*, 2006). Portanto, um forte candidato para a hipótese de que os astrócitos estariam liberando algum fator e resultando na inibição da síntese de melatonina causada pelo glutamato é de fato o TNF- α .

Estudos recentes demonstram que o TNF- α , liberado pelas células da glia, pode induzir ou até mesmo controlar diversas sinapses no hipocampo, através do aumento da inserção de receptores do tipo AMPA na superfície celular dos neurônios (Bains & Oliet, 2007). O mesmo poderia estar acontecendo na glândula pineal, o TNF- α liberado pelos astrócitos, em resposta à ativação do NF- κ B, poderia aumentar o número de receptores do tipo AMPA na membrana dos pinealócitos, o qual nós demonstramos estar envolvido na inibição da síntese de melatonina. Logo poderíamos presumir que a inibição da síntese de melatonina causada pelo glutamato, na glândula pineal de ratos, ocorre devido a uma ação conjunta do TNF- α liberado pelos astrócitos com o glutamato atuando em receptores do tipo AMPA dos

pinealócitos. Isso poderia explicar o efeito inibitório do agonista AMPA sobre a síntese de melatonina observado na Figura 13.

Em relação à subunidade p50, ativada tanto pelo glutamato como pela noradrenalina, na glândula pineal de ratos, estudos no SNC demonstram que ela é sintetizada a partir de um grande precursor, a p105, a qual com a remoção de seu domínio C-terminal, por proteólise proteossomal, gera a subunidade p50 ativa. O processamento da p105 parece ser um evento constitutivo, provendo um pool de subunidades p50 maduras. Homodímeros da p50 não são regulados pela proteína I κ B, a qual tem a função de impedir a entrada nuclear do NF- κ B e sua ligação ao DNA, e conseqüentemente são encontrados constitutivamente no núcleo (Beinke & Ley, 2004). Dados da literatura mostram que o NF- κ B em células não estimuladas consiste primariamente de homodímeros de p50 associado com uma histona desacetilada (HDAC-1) que se liga ao DNA e reprime a expressão gênica. Contudo, após estimulação, heterodímeros p50:p65 contendo p65 fosforilada entra no núcleo e desloca a ligação p50:HDAC-1 com o DNA, portanto o mecanismo de acetilação e desacetilação possui um papel chave na regulação do processo de transcrição gênica (Zhong *et al*, 2002). Embora a subunidade p50 não contenha o domínio de ativação transcricional e estudos no SNC mostram que homodímeros formados pela p50 são repressoras de transcrição gênica, ela também pode interagir com uma proteína nuclear, a Bcl-3, a qual pode induzir a expressão gênica.

Portanto, a partir dos resultados apresentados é possível supor que o glutamato liberado pelos pinealócitos, após a ativação dos receptores nicotínicos pela acetilcolina, atue paracrinamente nos receptores glutamatérgicos (receptor ionotrópico do tipo AMPA ou nos receptores metabotrópicos do grupo I, mGluR1 ou mGluR5) presentes nos astrócitos, causando um aumento da concentração intracelular de cálcio e ativação do NF- κ B. Mediante essa ativação, os astrócitos poderiam liberar algum fator, possivelmente o TNF- α ., o qual vai atuar juntamente com o glutamato em uma ação parácrina nos pinealócitos, resultando na inibição da síntese de melatonina. Ao passo que a noradrenalina estaria atuando nos receptores adrenérgicos dos pinealócitos ativando o NF- κ B e estimulando a síntese de melatonina. Isso pode explicar o fato da mesma subunidade (p50) estar presente na ativação mediada tanto pelo glutamato como pela noradrenalina.

VI. CONCLUSÕES

O glutamato inibe a síntese de melatonina, na glândula pineal de ratos, em uma maneira dependente de concentração, com a maior concentração utilizada (600 μ M) inibindo de forma mais acentuada a síntese de melatonina.

O efeito inibitório do glutamato sobre a síntese de melatonina ocorre devido a sua interação com os receptores metabotrópicos dos grupos I e II e o receptor ionotrópico do tipo AMPA.

As ações do glutamato sobre a síntese de melatonina parecem ser mediadas pela ativação do fator de transcrição NF-kB dos astrócitos.

O NF-kB é ativado tanto pelo glutamato como pela noradrenalina na glândula pineal de ratos, sendo que o glutamato somente ativa este fator de transcrição nos astrócitos e não nos pinealócitos. Tanto a noradrenalina como o glutamato ativam o dímero p50/p50 .

A ativação do NF-kB induzida pela noradrenalina participa da resposta de síntese de melatonina, uma vez que a inibição de sua translocação para o núcleo com o PDTC inibiu significativamente a síntese de melatonina.

Os efeitos causados pelo glutamato e pelo PDTC sobre a síntese da melatonina não estão associados à morte celular.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anholt RRH. Signal integration in the nervous system: adenylate cyclases as molecular coincidence detectors. **Trends in Neuroscience**, 1994, v. 17, p. 37-41.

Arendt J. **Melatonin and the Mammalian Pineal Gland**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 1-197.

Bains JS, Oliet SHR. Glia: they make your memories stick! **Trends in Neuroscience**, 2007, v. 30, p. 417-424.

Baler R, Klein DC. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. **Journal Biological Chemistry**, 1995, v. 279, p. 27319-27325.

Banik U, Wang GA, Wagner PD. Interactions of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins. **Journal Biological Chemistry**, 1997, v. 271, p. 26219-26225.

Barnes PJ, Adcock IM. NF- κ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. **Trends in Pharmacological Science**, 1997, v.18, p. 46-51.

Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. **Biochemistry Journal**, 2004, v. 382, p.393-409.

Besançon R, Simptoonneaux V, Jouvet A, Belin MF, Fèvre-Montage M. Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. **Molecular Brain Research**, 1996, v. 40, p. 136-138.

Bezzi P, Volterra A. A neuron-glia signalling network in the active brain. **Current Opinion in Neurobiology**, 2001, v.11, p.387-394.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [update 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniformrequirement.html>.

National Library of Medicine. List of Journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

Boadle-Biber MC. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubated with N⁶,O₂,-dibutyryladenosine-3`5`-cyclic monophosphate. **Biochemistry Pharmacology**, 1980, v. 29, p. 669-672.

Caccamo D, Campisia A, Marini H, Adamo EB, Volti G, Squadrito F, Ientile R. Glutamate promotes NF-kB pathway in primary astrocytes: Protective effects of IRFI 016, a synthethic vitamin E analogue. **Experimental Neurology**, 2005, v. 193, p. 377-383.

Calvo J, Boya J, Borregon A, Garcia-Mauriño JE. Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. **Anatomical Record**, 1988, v.220, p.424-428.

Chik CL, Liu QY, Li B, Karpinski E, Ho AK. cGMP inhibits L-type Ca²⁺ channel currents through protein phosphorylation in rat pinealocytes. **Journal Neuroscience**, 1995, v.15, p.3104-3109.

Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula pineal. In: AIRES MM (coord.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. p. 805-811.

Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. Regulation of Ca²⁺- permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. **Current Opinion in Neurobiology**, 2006, v. 16, p. 288-297.

Deguchi T, Axelrod J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal gland. **Annual Biochemistry**, 1972, v. 50, p. 176-179.

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Posite and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorilation. **Science**, 1999, v. 284, p. 309-313.

Dugas B, Debré P, Moncada S. Nitric oxide, a vital poison inside the immune and inflammatory network.**Research in Immunology**, 1995, v.146, p.662-670.

Ehret M, Pévet P, Maitre M. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3,5,-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal. **Journal of Neurochemistry**, 1991, v. 57, p. 1516-1521.

Ehret M, Cash CD, Hamon M, Maitre M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. **Journal of Neurochemistry**, 1989, v. 52, p. 1886-1891.

Fernandes PACM, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of $\text{TNF-}\alpha$ on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a “feedback” of the immune response on circadian timing. **Journal of Pineal Research**, 2006, v.41, p. 344-350.

Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. **Cell Tissue Research**, 2006, v. 326, p.483-504.

Ferreira ZS, Fernandes ACM, Duma D, Assreuy J, Avellar MCW, Markus RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis inhibition of nuclear factor kappa B. **Journal of Pineal Research**, 2005, v. 38, p. 182-188.

Fields RD, Evens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. **Science**, 2002, v. 298, p. 556-562.

Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Namboodiri MAA *et al.* Role of pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/ 14-3-3 binding switch in melatonin synthesis. **Proceeding National Academy of Science USA**, 2001, v. 98, p. 8083-8088.

Garidou ML, Bartol I, Galgari C, Pévet P, Simonneaux V. In vivo observations of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the pineal complex. **Neuroscience**, 2001, v. 105, p. 721-729.

Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review Physiology**, 1995, v. 57, p.683-769.

Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. **Science**, 1998, v. 279, p. 1358-1360.

Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorenstein C, Scavone C. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 2000, v. 22, p. 26-30.

Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER. Signal transduction. San Diego: Academic Press, 2002. p. 145-187.

Häcker H, Karin M. Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. **Science's stke**, 2006, v. 357, p. 1-19.

Halassa MM, Fellin T, Haydon, PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, 2007 v. 30, p. 1-10.

Hardingham GE, Bading A. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. **Trends in Neurociences**, 2003 v. 26, p 81-89.

Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda,Y. Glutamate signaling in the peripheral tissues. **European Journal Biochemistry**, 2003, v. 271, p. 1-13.

Ho AK, Price DM, Terriff D, Chik CL. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2006, v.252, p. 34-39.

Ichimura T, Uchiyama J, Isobe T. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. **Journal Biological Chemistry**, 1995, v. 270, p. 28510-28518.

Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Fujisawa H. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase in the presence of Ca^{2+} , calmodulin-dependent protein kinase II. **FEB. Letters**, 1997, v. 219, p. 79-82.

Inoue J-I, Gohda J, Akiyama T, Semba K. NF-kB Activation in development and progression of câncer. **Cancer Science**, 2007, v. 98, p. 268-274.

Ishio S. Hydroxyindol-O-methyltransferase is another target for L-glutamate-evoked inhibition of melatonin synthesis in rat pinealcytes. **Brain Research**, 1999, v. 850, p. 73-78.

Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. **Journal of Neurochemistry**, 1995, v. 65, p. 882-888.

Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Phosphorilation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. **Journal of Neurochemistry**, 1996, v. 66, p. 817-823.

Kaltschmidt B, Kaltchmidt C. Constitutive NF-kB activity is modulated via neuron-astroglia interaction. **Experimental Brain Research**, 2000, v. 130, p. 100-104.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kB in the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2005, v. 1745, p. 287-299.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. **Princípios da Neurociência**. Brasil: Manole Ltda, 2003. 3 ed. p. 5-298.

Kaur C, Sivakumar V, Ling EA. Expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) GluR2-R3 receptors in the developing pineal gland. **Journal of Pineal Research**, 2005, v. 39, p. 294-301.

Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, 2005, v. 179, p. 4-29.

Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New lighth is shining on the melatonin rhythm enzyme. The first poscloning view. **Trends Endocrinology and Metabolism**, 1996, v. 7, p. 106-112.

Klein DC, Schaad NL, Namboodiri MAA, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Biochemistry Soc. Trans.**, 1992, v. 20, p. 299-304.

Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proceeding National Academy of Science of USA**, 1983, v. 80, p. 599-603.

Klein DC, Auerbach DA, Namboodiri MAA, Weller GHT. Indole Metabolism in the Mammalian Pineal Gland. In: Reiter RJ (Ed.). **The pineal gland**. Boca Raton: CRC Press, 1981.

Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. **Brain Research**, 1979, v. 174, p. 245-262.

Klein DC, Buda MJ, Kapoor CL, Krishna G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3`5`-monophosphate may be signal for “turnoff”. **Science**, 1978, v. 199, p. 309-311.

Klein DC, Weller JL. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Science**, 1972, v. 177, p. 532-533.

Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. **Science**, 1970, v. 169, p. 1093-1095.

Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: Evered D, Clark S (Ed.). **Photoperiodism, Melatonin and the Pineal**. London, Pittman, Ciba Foundation Symposium 117. p. 38-56.

Köhr G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. **Cell Tissue Research**, 2006, v. 326, p. 439-446.

Kuhn DM, Vogel RL, Lovenberg W. Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, 1978, v. 82, p. 759-766.

Laviano A, Meguid MM, Yang Z, Gleason JR, Cangiano C, Fanelli FR. Cracking in the riddle of cancer anorexia. **Nutrition**, 1996, v. 12, p. 706-710.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal America Chemistry Society**, 1959, v. 80, p. 587-590.

Letz B, Schomerus C, Maronde E, Korf HW, Korbamarcher C. Stimulation of a nicotinic Ach receptor causes depolarization and activation of L-type Ca²⁺ channels in rat pinealocytes. **Journal of Physiology**, 1998, v. 499, p. 329-340.

Lin AM-Y, Schaad NC, Schulz PE, Coon SL, Klein DC. Pineal nitric oxide synthase: characteristics, adrenergic regulation and function. **Brain Research**, 1994, v. 651, p. 160-168.

Liu GH, Wang SR, Wang B, Kong BH. Inhibition of nuclear factor-kB by an antioxidant enhances paclitaxel sensitivity in ovarian carcinoma cell line. **International Journal of Gynecological Cancer**, 2006, v. 16, p. 1777-1782.

Mao X, Moerman AM, Lucas MM, Barger SW. Inhibition on the activity of a neuronal kB-binding factor by glutamate. **Journal of Neurochemistry**, 1999, v. 73, p. 1851-1858.

Markus RP, Afeche SC, Barbosa EM, Lotufo CMC, Ferreira ZS, Cipolla-Neto, J. Glândula Pineal e Melatonina. In: Marques N, Menna-Barreto L. (coord.). **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 3 ed. São Paulo: EDUSP, 2003. p. 191-222.

Maronde E, Stehle JH. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 2007, v. 30, p.1-8.

Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, Korf H-W, Stehle JH. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. **Journal of Neuroscience**, 1999, v. 19, p. 3326-3336.

Massa PT, Aleyasin H, Park DS, Mao X, Barger SW. NF-kB in neurons? The uncertainty principle in neurobiology. **Journal of Neurochemistry**, 2006, v. 97, p. 607-618.

Mattson MP. NF-kB in the Survival and Plasticity of Neurons. **Neurochemical Research**, 2005, v.30, p.883-893.

Mattson MP, Camandola S. NF-kB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, 2001, v. 107, p. 247-254.

Mefford IN, Chang P, Klein DC, Namboodiri MAA, Sugden D, Barchas J. Reciprocal day/night relationships between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. **Endocrinology**, 1983, v. 113, p. 1582-1586.

Mocada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB Journal**, 1995, v. 9, p. 1319-1330, 1995.

Moryama Y, Hayashi M, Yamada H, Yatsushiro S, Ishio S, Yamamoto A. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. **Journal Experimental Biology**, 2000, v. 203, p. 117-125.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends in Neurosciences**, 2003, v. 26, p. 523-530.

Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. **Trends in Neurosciences**, 2003, v. 26, p. 536-542.

Olcese J. Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. **Journal of Neurochemistry**, 1991, v. 57, p. 943-7.

Pabst H, Redecker P. Interstitial glial cells of the gerbil pineal gland display immunoreactivity for the metabotropic glutamate receptors mGluR2/3 and mGluR5. **Brain Research**, 1999, v. 838, p. 60-68.

Parfitt A, Weller JL, Klein DC. Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. **Neuropharmacology**, 1976, v. 15, p. 353-358.

Parfitt A, Weller JL, Klein DC. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Molecular Pharmacology**, 1975, v. 11, p. 241-255.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kB and IKK function. **Molecular Cell Biology**, 2007, v.8, p. 49-62.

Pinheiro P, Mulle C. Kainate receptors. **Cell Tissue Research**, 2006, v. 326, p. 457-482.

Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **American Journal of Physiology**, 2000, v. 278E, p. 1339-1345.

Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effects on melatonin synthesis. **Journal Biological Rhythms**, 1999, v. 14, p. 105-115.

Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an of its complex relationship with HIOMT activity. **Endocrinology**, 1999, v. 140, p. 1375-1384.

Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. **Brain Research**, 1997, v. 177, p. 247-250.

Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, 2003, v. 140, p. 1-47.

Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology**, 1996, v. 137, p. 3033-3044.

Schaad NC, Vanecek J, Rodriguez IR, Klein DC, Holtzclaw L, Russell JT. Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. **Molecular Pharmacology**, 1995, v. 47, p. 923-933.

Schachner M, Huang SK, Ziegelmeier P, Bizzini B, Taugner R. Glial cells in the pineal gland of mice and rats. **Cell Tissue Research**, 1984, v. 237, p. 245-252.

Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as Potent Inhibitors of Nuclear Factor κ B Activation in Intact Cells. **Journal of Experimental Medicine**, 1992, v. 175, p. 1181-1194.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **The Cell**, 1986, v. 46, p. 705-716.

Shein HM, Wurtman RJ. Stimulation of [14 C]tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyl adenosine 3',5'-monophosphate in rat pineal gland organ cultures. **Life Science**, 1971, v. 10, p. 935-940.

Shibuya H, Toru M, Watanabe S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. **Brain Research**, 1978, v. 138, p. 364-368.

Sigala JL, Bottero V, Young DB, Shevchenko A, Mercurio F, Verma IM. Activation of transcription factor NF- κ B requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. **Science**, 2004, v. 304, p. 1963-1967.

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 Regulation Pineal Transmitters. **Pharmacological Reviews**, 2003, v. 55, p. 325-395.

Simonneaux V, Rodeau JL, Calgari C, Pévet P. Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. **European Journal of Neuroscience**, 1999, v. 11, p. 725-728.

Simonneaux V, Ouichou A, Burbach JP, Pévet P. Vasopressin and oxytocin modulation secretion from rat pineal gland. **Peptides**, 1990, v. 11, p. 1075-1079.

Sitaram BR, Lees GJ. Effect of oxygen on the induction of tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of rat pineal glands. **Journal of Neurochemistry**, 1984, v. 42, p. 1183-1185.

Spessert R, Raap M, Jastrow H, Karabul N, Blum F, Vollrath L. A differential role of CREB phosphorylation in cAMP-inducible gene expression in the rat. **Brain Research**, 2000, v. 864, p. 270-280.

Spessert R, Layes E, Vollrath L. Adrenergic Stimulation of Cyclic GMP Formation Requires NO-Dependent Activation of Cytosolic Guanylate Cyclase in Rat Pinealocytes. **Journal of Neurochemistry**, 1993, v. 61, p. 138-143.

Sprengel R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Cell Tissue Research**, 2006, v. 326, p. 447-455.

Sugden D. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. **Journal of Neurochemistry**, 2003, v. 86, p. 1308-1311.

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, 1989, v. 45, p. 922-931.

Sugden D, Klein DC. Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonate and adult rats. **Journal Biological Chemistry**, 1987, v. 262 p. 6489-6493.

Sugden AL, Sugden D, Klein DC. α 1-Adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. **Journal Biological Chemistry**, 1987, v. 262, p. 741-745.

Sugden AL, Sugden D, Klein DC. Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. **Journal Biological Chemistry**, 1986, v. 261, p. 11608-11612.

Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. **Nature**, 1985, v. 314, p. 359-361.

Tamotsu S, Schomerus C, Stehle JH, Roseboom PH, Korf H-W. Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. **Cell Tissue Research**, 1995, v. 282, p. 219-226.

Tazavara ET, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type I in the rat pineal gland. **Proceeding National Academy of Sciences of USA**, 1996, v. 93, p. 11208-11212.

Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C. Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. **Molecular Cell Biology**, 2003, v. 23, p. 2029-2041.

Vollrath L. **The Pineal Organ**. New York: Springer-Verlag Heidelberg; 1981. p. 1-237.

Walther JD, Bader MA. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. **Science Direct**, 2003, v. 66, p. 1673-1680.

Weil R, Schwamborn K, Alcover A, Bessia C, Dibartolo V, Israel A. Induction of the NF-kappaB cascade by recruitment of the scaffold molecule NEMO to the T cell receptor. **Immunity**, 2003, v. 18, p. 13-26.

Weinstein H, Mehler EL. Ca^{2+} - binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. **Annual Review of Physiology**, 1994, v. 56, p. 213-236.

Wessler I, Reinheimer T, Bittinger F, Kirkpatrick C J, Schenda J, Vollrath L. Day-night rhythm of acetylcholine in the rat pineal gland. **Neuroscience**, 1997, v. 224, p. 173-176.

Whiteside ST, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. **Seminars in Cancer Biology**, 1997, v. 8, p. 75-82.

Xiao W. Advances in NF-kB Signaling Transduction and Transcription. **Cell & Molecular Immunology**, 2004, v. 6, p. 425-435.

Yamada H, Yatsushiro S, Ishio S, Hayashi M, Nishi T, Yamamoto MF, Yamaguchi A, Moriyama Y. Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. **Journal of Neuroscience**, 1998, v. 18, p. 2056-20562.

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. **Journal of Neuroscience**, 1998, v. 18 p. 4946-4952.

Yamada H, Yamamoto A, Takahashi M, Michibata H, Kumon H, Moriyama Y. The L-type Ca^{2+} channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. **Journal of Pineal Research**, 1996, v. 21, p. 165-174.

Yamada H, Yamamoto A, Yodozawa S, Kozaki S, Takahashi M, Morita M, Michibata H, Furuichi T, Mikoshiba K, Moriyama Y. Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. **Journal of Pineal Research**, 1996, v. 21, p.175-191.

Yatsushiro S, Yamada H, Hayashi M, Yamamoto A, Moriyama Y. Ionotropic glutamate receptors trigger microvesicle-mediated exocytosis of l-glutamate in rat pinealocytes. **Journal of Neurochemistry**, 2000, v. 75, p. 288-297.

Yatsushiro S, Yamada H, Hayashi M, Tsuboi S, Moriyama Y. Functional expression of metabotropic glutamate receptor type 5 in rat pinealocytes. **NeuroReport**, 1999, v. 10, p. 1599-1603.

Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kB determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. **Molecular Cell**, 2002, v. 9, p. 625-636.