Rosana Fátima Dantas Ferreira

*Análise da dinâmica da melatonina
liquórica*

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 Ciências.

São Paulo
2010

Rosana Fátima Dantas Ferreira

*Análise da dinâmica da melatonina
liquórica*

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 Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana.

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

São Paulo
2010

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 96 nas fls. 61 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de José Cipolla Neto, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Efeitos da injeção central de melatonina no comportamento alimentar"*** do qual participou(aram) o(s) Pesquisadores Rosana Fátima Dantas Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 20.10.08, com validade de 3 anos.

São Paulo, 11 de novembro de 2008.

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

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

Dedico esse trabalho à minha família,
principalmente aos meus pais por serem
maravilhosos!
E ao Thiago por estar sempre presente.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos verdadeiros responsáveis por essa conquista que são meus pais! Sem eles eu não saberia que fazer as coisas com alegria e amor torna nossos caminhos, por mais difíceis que sejam, mais simples e plenos. Por isso, pai e mãe, por vocês me ensinarem que dedicação e responsabilidade são imprescindíveis, e por terem me guiado sempre pelo caminho do bem eu os agradeço do fundo do meu coração! Apesar da distância sempre sinto vocês perto! E é daí que vem a força para conseguir levar meus objetivos à diante! E obrigada também, meu irmão Tiago, por ser um grande companheiro sempre!

Agradeço ao meu namorado Thiago, por sempre estar ao meu lado independente de qualquer coisa! Sempre me apoiando e incentivando quando eu perdia as forças e queria sair correndo! Por fazer parte do meu cotidiano e me fazer rir... Sempre! Obrigada Thiago por ser acima de tudo meu grande amigo!

E por falar em cotidiano gostaria de agradecer muito ao pessoal do laboratório que considero minha família paulistana!

Agradeço especialmente ao meu orientador José Cipolla Neto, pela paciência com meu jeito agitado, pelas conversas e pela atenção que nunca me foi negada! Obrigada Professor!

À Julieta, que considero como se fosse uma mãe para mim aqui em São Paulo, pelas ajudas incondicionais nos experimentos, mas principalmente, Ju, te agradeço por ser essa pessoa cheia de luz, pelos conselhos, pelo ombro que sempre está pronto quando eu preciso chorar (o que não é muito raro) e pela força que você sempre me dá!

À Fernanda, por me ensinar a técnica de microdiálise e por sempre estar disposta a me ajudar em tudo! Obrigada por tudo Fê!

Ao Rafa Peres pela paciência infinita me ajudando a lidar com o HPLC e por sempre estar pronto a me ajudar em qualquer coisa! Até nos meus exercícios de Francês! Obrigada, Rafa!

A todos do laboratório, o Rodrigo, pela ajuda quando entrei no laboratório e estava totalmente perdida e por responder as minhas perguntas mais bobas com a maior paciência!

Ao Marco, por me ajudar nas pinealectomias.

A Dani também pela paciência em me ajudar nas coisas que eu tive dificuldade: nas soluções mãe, nas fases do HPLC, nos cálculos e pelas risadas!

A Ana e ao Ronaldo por me permitirem participar nos experimentos que me trouxeram tanto conhecimento.

A Jéssica (Morango) pelas terapias via msn!

Ao Rafa Prévide que sempre me ajuda nas minhas ignorâncias tecnológicas.

Enfim, a todo vocês do laboratório eu agradeço desde as pequenas coisas até as grandes coisas por serem pessoas maravilhosas e principalmente amigas e fazerem do laboratório um ambiente de trabalho espetacular!

Gostaria de agradecer muito à minha banca de qualificação, à professora Sarah Lagnado, à professora Solange Afeche e mais uma vez, agradecer à Fernanda pelas contribuições importantíssimas para finalização desse trabalho.

Agradeço também a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro que foi essencial para a realização desse trabalho!

“Não passo pela vida...

Bom mesmo é ir à luta com determinação,

Abraçar a vida e viver com paixão,

Perder com classe e vencer com ousadia,

Porque o mundo pertence a quem se atreve

E a vida é MUITO para ser insignificante".

Charles Chaplin

RESUMO

FERREIRA, R. F. D. **Análise da dinâmica da melatonina líquórica**. 2010. 42 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O hormônio melatonina é produzido pela glândula pineal de mamíferos de forma circadiana e sua secreção é mais elevada durante a noite. Melatonina é liberada no sistema ventricular cerebral através do recesso pineal do 3º ventrículo. Sabe-se que a concentração de melatonina é maior nos ventrículos cerebrais que no plasma e no líquido cerebroespinal lombar. Para avaliar a dinâmica da melatonina líquórica no rato Wistar, coletamos, através de microdiálise, amostras do líquido do terceiro ventrículo cerebral de animais jovens. Para avaliar a variação ontogenética em sua produção e liberação compararam-se as concentrações de melatonina líquórica em animais jovens e idosos. Observou-se também o perfil da melatonina líquórica em animais pinealectomizados. Esses procedimentos darão base para uma análise sistemática da dinâmica da melatonina no líquido cerebroespinal ventricular.

Palavras chave: Melatonina. Pineal. Microdiálise. Líquor. Envelhecimento. Pinealectomia.

ABSTRACT

FERREIRA, R. F. D. **Analysis of the dynamic of liquoric melatonin.** 2010. 42 p. Dissertation (Masters in Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The hormone melatonin is produced by the mammalian pineal gland in a circadian way and its secretion is higher at night. Melatonin is released to the cerebral ventricular system through the pineal recess of the III ventricle. We know that the concentration of melatonin is higher in the cerebral ventricles than in plasma and lumbar cerebrospinal fluid. To evaluate the dynamic of melatonin in the cerebrospinal fluid (CSF) in Wistar rats, we collected, using microdialysis, samples of cerebrospinal fluid in the III ventricle of young animals. To estimate the ontogenetic decrease in melatonin production and release we compared the concentrations of CSF melatonin in young and aged animals. The concentration of CSF melatonin was also evaluated in pinealectomized rats. These procedures will elucidate the dynamic of ventricular CSF melatonin.

Key words: Melatonin. Pineal. Microdialysis. Cerebrospinal fluid. Aging. Pinealectomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição do LCE. A. Locais de formação, circulação e absorção do LCE. Todos os espaços que possuem LCE comunicam-se com os espaços intersticiais cerebrais fazendo trocas e mudando a composição do LCE. B. O espaço subaracnóide é delimitado externamente pela membrana aracnóide e internamente pela pia mater, que se estende ao longo dos vasos sanguíneos que penetram a superfície do cérebro.....	15
Figura 2. O Complexo pineal.....	16
Figura 3. Estrutura química da melatonina.....	17
Figura 4. Vias de produção e metabolização da melatonina.....	18
Figura 5. Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina pela glândula pineal e os principais neurotransmissores envolvidos.....	19
Figura 6. (A) Cânula para microdiálise CMA 12 Elite (Microdialysis Probe®). (B) Procedimento cirúrgico para implantação da sonda guia para a cânula.....	26
Figura 7. (A) Bomba de infusão com seringas conectadas aos cateteres de polietileno. As seringas contêm Ringer que infundirão o animal. O dialisado será coletado em tubo conectado à base do braço móvel. (B) Sistema de juntas giratórias com braço móvel, mostrando ligação dos cateteres de polietileno protegidos por túnel de malha metálica articulado que permitem livre movimentação do animal na caixa.....	27
Figura 8. Lâmina histológica demonstrando cânula implantada no terceiro ventrículo do animal.....	29
Figura 9. Perfil diário de melatonina líquórica – média dos 5 dias de coleta (animal jovem).....	30
Figura 10. Perfil de melatonina líquórica dia-a-dia (animal jovem).....	30
Figura 11. Perfil diário de melatonina líquórica – média dos 5 dias de coleta (animal idoso).....	31
Figura 12. Perfil de melatonina líquórica dia-a-dia (animal idoso).....	31
Figura 13. Perfil diário de melatonina líquórica – média de 4 dias de coleta (animal PINX).....	32
Figura 14. Perfil de melatonina líquórica dia-a-dia (animal PINX).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3°V: Terceiro Ventrículo

4°V: Quarto Ventrículo

5-HT: 5-hidroxitriptamina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

AA-NAT: Arilalquilamina N-acetiltransferase

AFMK: N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

CEEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

GA: Granulações Aracnóides

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GCS: Gânglio Cervical Superior

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico

HIOMT: Hidroxindol-oxi-metiltransferase

HPLC: “high performance liquid chromatography”

LCE: líquido cerebroespinal

MEL: Melatonina

MT-1: Receptor 1 de membrana para melatonina

MT-2: Receptor 2 de membrana para melatonina

MT-3: Receptor 3 de membrana para melatonina

NAS: N-acetil-serotonina

NOR: Noradrenalina

NSQ: Núcleo Supraquiasmático

PC: Plexo Coróide

PINX: pinealectomizado

PKC: Proteína quinase C

PVH: Núcleo Paraventricular Hipotalâmico

RNAm: RNA mensageiro

RP: Recesso Pineal

RZR/ROR: Receptores nucleares órfãos relacionados ao ácido retinóico

SNC: Sistema Nervoso Central

TPH: Triptofano Hidroxilase

VL: Ventrículo Lateral

ZT: “Zeitgeber Time”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	O Líquido Cerebroespinal	14
1.2	Glândula Pineal e Melatonina.....	16
1.2.1	<i>Ações da Melatonina no Sistema Nervoso Central.....</i>	<i>21</i>
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Animais e desenho experimental	25
4.2	Procedimentos cirúrgicos	25
4.2.1	<i>Pinelectomia</i>	<i>25</i>
4.2.2	<i>Implantação das Sondas para Microdiálise</i>	<i>25</i>
4.3	Coleta das Amostras	26
4.4	Verificação da Localização de Implantação da Sonda	27
4.5	Dosagem de Melatonina por HPLC	27
5	RESULTADOS OBTIDOS	29
5.1	Avaliação individual do perfil diário de melatonina no 3º ventrículo cerebral pela técnica de microdiálise no animal jovem, idoso e pinealectomizado	29
5.1.1	<i>Animal jovem</i>	<i>29</i>
5.1.2	<i>Animal idoso</i>	<i>31</i>
5.1.3	<i>Animal pinealectomizado</i>	<i>32</i>
6	DISCUSSÃO	33
7	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Líquido Cerebroespinal

O líquido cerebroespinal (LCE) é um fluido incolor que circula nos ventrículos cerebrais e no espaço entre as duas membranas mais internas que envolvem o sistema nervoso central (SNC) – Aracnóide e Pia-mater – denominado espaço subaracnóide cerebral (TRUEX e CARPENTER, 1969).

O LCE é produzido por entrelaçamentos vasculares denominados Plexos Coróides (PC). Estes plexos estão presentes em todos os ventrículos cerebrais, a maior parte nos ventrículos laterais (BRODAL, 1998). A secreção de LCE se inicia nos ventrículos laterais (VL) e, passando pelo forâmen interventricular de Monro, flui para o terceiro ventrículo (3º V), onde uma quantidade adicional de LCE é produzida. Do 3ºV vai para o quarto ventrículo (4ºV), onde também há produção de LCE, através do aqueduto de Sylvius e entra no espaço subaracnóide através do forâmen de Magendie e Luschka (Figura 1) (KANDEL, 2000). O LCE flui através dos espaços subaracnóides por toda superfície do cérebro e medula espinal (BRODAL, 1998).

Nos humanos, são formados cerca de 600 ml de LCE por dia, porém os ventrículos e espaço subaracnóide comportam apenas aproximadamente 140 ml (SKIPOR, 2008). Isso requer um sistema eficiente de drenagem que é constituído pelas Granulações Aracnóides (GA) que são prolongamentos da membrana aracnóide para o interior da terceira e mais externa membrana do cérebro, a Dura-mater, onde essa membrana possui lacunas denominadas seios venosos. Essas GA são mais numerosas ao longo da fissura entre os hemisférios cerebrais e são os principais locais de transferência de LCE do espaço subaracnóide para o sistema venoso (Figura 1) (TRUEX e CARPENTER, 1969). A passagem de fluido do espaço subaracnóide para os seios venosos é provavelmente causada por diferença na pressão hidrostática que é maior no espaço subaracnóide que nos seios venosos (BRODAL, 1998).

Figura 1. Distribuição do LCE. (Fonte: Modificado de KANDEL, 2000). **A.** Locais de formação, circulação e absorção do LCE. Todos os espaços que possuem LCE comunicam-se com os espaços intersticiais cerebrais fazendo trocas e mudando a composição do LCE. **B.** O espaço subaracnóide é delimitado externamente pela membrana aracnóide e internamente pela pia mater, que se estende ao longo dos vasos sanguíneos que penetram a superfície do cérebro.

Portanto o fluxo de LCE se dá dos locais de formação para os locais de reabsorção, fazendo trocas com o tecido neural no caminho, modificando continuamente a composição de solutos do LCE (SKIPOR, 2008).

Este líquido age como uma camada protetora que amortece os tecidos neurais além de prover ao cérebro nutrientes essenciais e remover produtos de atividade neuronal (SKIPOR, 2008), servindo como um sistema linfático do SNC (KANDEL, 2000).

Porém, estudos mais recentes sugerem que os PCs e o sistema LCE têm um papel bem mais ativo no funcionamento do SNC, sendo alvo, fonte e via para sinalização neuroendócrina no cérebro. As moléculas sinalizadoras no fluido intersticial do tecido cerebral podem agir de maneira autócrina/parácrina, mas também se mover ao longo do sistema ventricular e espaço subaracnóide através do LCE e exercer efeitos a distancia em células alvo do sistema nervoso central. As moléculas sinalizadoras presentes no LCE são originadas do sangue periférico, do próprio SNC e dos PCs (SKIPOR, 2008).

Entre as moléculas originadas no SNC e que estão presentes no LCE está o hormônio melatonina (MEL) sintetizado pela glândula pineal (glândula de origem neural).

1.2 Glândula Pineal e Melatonina

A glândula pineal é uma estrutura epitalâmica pequena e única, situada dorsalmente à região caudal do diencéfalo. Deriva-se de células neuroectodérmicas e desenvolve-se a partir de uma evaginação do teto da parede do terceiro ventrículo (KAPPERS, 1960).

Nos roedores, a glândula pineal apresenta três porções distintas que formam o complexo pineal: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial. A pineal profunda está localizada entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular chamada de recesso pineal (RP) (Figura 2) (MOLLER, 1992).

Figura 2. O Complexo pineal.

A glândula pineal apresenta neurônios modificados, os pinealócitos, que são as células produtoras do hormônio melatonina (SCHNEIDER, 1981).

A melatonina é uma indolamina de baixo peso molecular (PM = 232,28) com característica anfifílica, ou seja, difunde-se tanto em meios hidrofílicos como lipofílicos graças à presença do grupamento metoxi no carbono 5 e do grupamento acil ligado ao grupamento amina (figura 3) (CIPOLLA- NETO e AFECHÉ, 2008).

Figura 3. Estrutura química da melatonina (Fonte: Adaptado de CIPOLLA-NETO E AFECHÉ, 2008).

Em todos os vertebrados, independentemente se o animal tem hábitos diurnos ou noturnos, a produção de MEL é exclusivamente noturna e a magnitude e duração da sua síntese/secreção dependem exclusivamente do período escuro, apresentando assim, uma variação circadiana e sazonal de acordo com a duração do fotoperíodo (CIPOLLA- NETO, 1996). Dada essa marcante característica rítmica de produção, a MEL é considerada, portanto, um hormônio que funcionaria como um sincronizador do meio interno (*zeitgeber*, doador de tempo). Esse padrão rítmico de secreção da MEL é importante porque dá ao organismo informação temporal que permite adaptação das funções fisiológicas às variações do ciclo claro-escuro (CIPOLLA-NETO E AFECHÉ, 2008).

No ser humano, o ritmo circadiano de MEL é desenvolvido por volta dos seis meses de vida e alcança seus maiores níveis entre 4 e 7 anos de idade. Na puberdade há uma queda nas concentrações de MEL e depois disso as concentrações plasmáticas diminuem gradualmente. Como consequência em indivíduos idosos quase não há diferença nas concentrações plasmáticas diurnas e noturnas de MEL (KARASEK, 2004). Essa diminuição na produção de MEL está associada à insônia em pacientes idosos (PANDI-PERUMAL, 2005) e a uma maior prevalência de câncer (PANDI-PERUMAL, 2008).

Além da melatonina pineal, em mamíferos, outras estruturas periféricas como glândula de Harder, fígado, testículos, ovário, sistema vascular, trato gastrointestinal, musculatura lisa, células do sistema imune e retina também produzem melatonina, porém somente com ação local (SIMONNEAUX, 2003). Apesar de a melatonina ser produzida em outros tecidos que não a glândula pineal, é dela, pineal, a procedência da melatonina circulante (REITER, 1991),

ou seja, quando a glândula pineal é retirada cirurgicamente, o aumento na concentração noturna observada no plasma é abolida (OZAKI, 1976; LEWY, 1980).

A melatonina é sintetizada na pineal a partir do triptofano captado da corrente sanguínea. O triptofano é transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) na mitocôndria dos pinealócitos pela triptofano-hidroxilase (TPH, E.C. 1.14.16.4) (LOVENBERG, 1967). O 5-HTP é então convertido em serotonina (5-HT) no citosol dos pinealócitos sob a ação de uma descarboxilase inespecífica (LOVENBERG, 1962; SNYDER, 1964). A 5-HT é acetilada pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT, E.C. 2.3.1.87) convertendo-se em N-acetilserotonina (NAS) (WEISSBACH, 1960; VOISIN, 1984). NAS é Oxi-metilada pela enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT, E.C. 2.1.1.4), dando origem à N-acetil-5-metoxitriptamina (MEL) (Figura 4) (AXELROD, 1960).

Figura 4. Vias de produção e metabolização da melatonina (Fonte: Adaptado de CIPOLLA-NETO E AFECHÉ, 2008).

A enzima passo limitante da produção de MEL é a AA-NAT, pois se observa um aumento noturno de mais de 150 vezes no RNAm que codifica essa enzima (ROSEBOOM, 1996).

O padrão circadiano de atividade da enzima AA-NAT e conseqüentemente de produção e secreção de MEL é determinada pelos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQ) (KLEIN, 1979). A atividade do NSQ é sincronizada ao ciclo claro-escuro ambiental, luz essa, detectada pela retina. O sinal gerado na retina é transmitido para o NSQ pelo trato retino-hipotalâmico (ARENDT, 2005). Células ganglionares retinianas glutamatérgicas projetam-se para o NSQ enviando a transmissão fótica dos sinais luminosos para o NSQ (BERSON, 2002). Fibras GABAérgicas provenientes do NSQ inervam o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVH). Para controlar a função da pineal, fibras eferentes do PVH contendo vasopressina passam pelo fascículo prosencefálico medial e tronco cerebral e, por fim, esse sistema descendente acaba fazendo conexões sinápticas com neurônios da coluna intermédio-lateral na medula espinhal torácica alta, de onde fibras simpáticas pré-ganglionares (colinérgicas, portanto) se projetam para o gânglio cervical superior (GCS) (MOORE, 1996). As fibras pós-ganglionares simpáticas (originadas no GCS), noradrenérgicas, projetam-se sobre a glândula pineal (figura 5).

Figura 5. Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina pela glândula pineal e os principais neurotransmissores envolvidos. GLU: glutamato; NSQ: núcleo supraquiasmático; GABA: ácido gama-aminobutírico; PVH: núcleo paraventricular hipotalâmico; IML: coluna intermédio lateral da medula espinhal; Ach: acetilcolina; GCS: gânglio cervical superior; P: glândula pineal; NOR: noradrenalina (Fonte: Adaptado de CIPOLLA-NETO E AFECHÉ, 2008).

A ativação de receptores α -adrenérgicos na glândula resulta em elevação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) levando, no rato, a um aumento da síntese e da atividade da AA-NAT (KLEIN, 1971). Receptores α -adrenérgicos também são encontrados na glândula pineal (SUGDEN, 1984) e sua ativação potencializa a atividade do receptor β -adrenérgico através do

aumento do Ca^{+} intracelular e ativação da Proteína quinase C (PKC) (HO, 1987). Todos esses eventos em conjunto levam à produção noturna de MEL pela glândula pineal.

A MEL produzida é então, imediatamente liberada na corrente sanguínea, não sendo armazenada na glândula. A melatonina plasmática circula ligada à albumina. Sua meia vida no sangue é relativamente curta (10-40min) e numa única passagem pelo fígado, 90% da melatonina é metabolizada. Aproximadamente 75% da MEL captada pelas células hepáticas é convertida em 6- hidroximelatonina e então, em 6-sulfatoximelatonina e excretada na urina (REITER, 1991).

Para atingir seus alvos no SNC acreditava-se que a MEL seria liberada na circulação e os atingiria via circulação periférica, sendo secretada na veia de Galeno, que drena o seio sagital antes de entrar na veia jugular. A MEL venosa seria então transportada finalmente de volta para o cérebro pelas artérias carótidas. Considerando a localização anatômica da glândula pineal no cérebro, essa rota seria muito longa (SKINNER, 1999).

Por sua localização anatômica e por seus efeitos exercidos em estruturas centrais, surgiu a hipótese alternativa de que a MEL atingiria seus alvos centrais diretamente através do sistema ventricular (SKINNER, 1999, TRICOIRE, 2002). Esse hormônio seria um bom candidato a ser transportado pelo LCE, pois muitos de seus efeitos resultam de ação central. O efeito melhor caracterizado da MEL no SNC é o controle sazonal da reprodução. O sítio de ação da MEL está localizado na área pré-mamilar hipotalâmica que está muito perto do 3ºV (0 a 1,5 mm).

Skinner, et al. (1999) observaram as concentrações de MEL nos ventrículos e compararam com os níveis encontrados no plasma jugular de ovelhas e caracterizaram pela primeira vez o padrão agudo de liberação de MEL no LCE. Os níveis noturnos no 3ºV foram 20 vezes maiores que na veia jugular e sete vezes maiores que no ventrículo lateral (VL), sugerindo que a maioria da MEL detectável no LCE vem diretamente da glândula pineal.

Outro estudo confirmou, agora definitivamente, a entrada de MEL pelo terceiro ventrículo e comprovou que ela entraria pelo recesso pineal, pois observaram que os níveis de MEL eram mais altos no RP que na parte ventral do 3ºV e que o bloqueio do RP diminuiu drasticamente (cerca de 80%) as concentrações de MEL no 3ºV (TRICOIRE, 2002).

Mais recentemente, em 2010, amostras de LCE foram coletadas do 3ºV e do VL durante neurocirurgia em humanos e foram comparadas com amostras plasmáticas. Observou-se uma diferença significativa na concentração de MEL entre os ventrículos, com níveis maiores no 3ºV. Os níveis de MEL foram significativamente maiores no 3ºV que no plasma,

porém não houve diferenças significativas entre as concentrações plasmáticas e no VL. Esses resultados mostraram que a MEL entra diretamente no LCE pelo recesso pineal também em humanos (LESTON, 2010).

No sistema nervoso central a melatonina é degradada via clivagem oxidativa do anel pirrólico dando origem a N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). A AFMK é convertida finalmente a 5-acetil-5-metoxiquinuramina (ZAWILSKA, 2009). A família das quinuraminas tem sido relacionada a tratamentos farmacológicos para distúrbios neurodegenerativos como epilepsia e derrame cerebral (STONE, 2001). Além disso, as concentrações de AFMK são altas em pacientes com meningite, indicando um possível mecanismo imunomodulatório nesses pacientes (SILVA, 2005).

1.2.1 Ações da Melatonina no Sistema Nervoso Central

A mensagem hormonal da MEL liberada pela glândula pineal é distribuída rapidamente pelas estruturas cerebrais.

A melatonina pode exercer sua ação tanto diretamente atravessando as membranas e ligando-se a moléculas intracelulares quanto por intermédio de receptores de membrana e receptores nucleares.

Dois tipos de receptores de melatonina acoplados à proteína G foram clonados e caracterizados no SNC: MT-1 e MT-2, sendo o receptor MT-1 o mais abundante. A ativação do receptor MT-1 leva a uma diminuição no acúmulo de AMPc.

Outros efeitos da ativação do MT-1 já foram descritos nas concentrações intracelulares de GMPc, diacilglicerol, trifosfato de inositol e cálcio, na expressão de *c-fos*, e no potencial de membrana da célula (SIMONNEAUX, 2003). O receptor MT-2 é expresso principalmente na retina e em menor escala no SNC.

Um terceiro tipo de receptor que inicialmente foi chamado de MT-3 foi mais tarde caracterizado como a enzima quinona redutase do tipo 2. Essa enzima pertence a um grupo de redutases que participam na proteção contra estresse oxidativo (SIMONNEAUX, 2003).

A MEL é também ligante para receptores nucleares órfãos relacionados ao ácido retinóico (RZR/ROR) (PANDI-PERUMAL, 2008). O significado funcional desses receptores nucleares ainda é questão de debate (ZAWILSKA, 2009).

Sabe-se atualmente que pelo menos 110 estruturas cerebrais expressam receptores de melatonina (SIMONNEAUX, 2003). Esses receptores são expressos em áreas como o núcleo supraquiasmático, vários núcleos hipotalâmicos e talâmicos, hipocampo, neurônios

dopaminérgicos, córtex cerebelar, córtex pré-frontal, gânglios da base, *substantia nigra*, área tegmentar ventral, núcleo accumbens e células horizontais, amácrinas e ganglionares da retina e etc. (PANDI-PERUMAL, 2008; ZAWILSKA, 2009). Os locais de maior expressão de receptores de melatonina em roedores adultos são *pars tuberalis* da hipófise anterior e a área postrema (ZAWILSKA, 2009).

Vários trabalhos têm demonstrado a melatonina como um importante modulador de funções do SNC. El-Sherif, et al. (2003) demonstraram que a melatonina regula a plasticidade dos neurônios piramidais no hipocampo. Neste experimento, neurônios expostos à melatonina mudaram sua excitabilidade em resposta a estimulações repetitivas (potenciação a longo prazo), sendo assim, MEL pode ser considerada uma molécula endógena cujos níveis de oscilação naturais podem modular fenômenos de plasticidade neural ligados a processos de aprendizado e memória. Além disso, MEL regula também os ritmos circadianos e sazonais, o ciclo vigília-sono, modula a neurotransmissão, regula o sistema imunológico e tem ação antioxidante e antienvhecimento (SIMMONEAUX, 2003).

Alterações na expressão do receptor de melatonina, mudanças na produção endógena de MEL, além de seus efeitos benéficos têm sido demonstrados em várias neuropatologias. Por exemplo, seu efeito protetor tem sido observado em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (CATALÁ, 1997; WU, 2003; MATSUBARA, 2003; PANDI-PERUMAL, 2008; OLCESSE, 2009). MEL tem implicações fisiológicas em vários tipos de cefaléias através de seus efeitos antiinflamatório e anti-radicais livres, de sua regulação neurovascular, entre outras (PERES, 2004). Além disso, possui efeitos anti-carcinogênicos (STEVENSON, 2007), modula a pressão sanguínea e protege o sistema cardiovascular (PAULIS e SMIKO, 2007). Alterações no padrão de secreção de MEL são encontradas em distúrbios psiquiátricos como psicose (MIYAZAKI, 2003), distúrbio afetivo sazonal, depressão, transtorno bipolar, bulimia, anorexia, esquizofrenia e transtorno obsessivo compulsivo (PACCHIEROTTI, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se da imensa importância da MEL para o SNC e sabe-se também que ela circula nesse meio através do líquido. Por isso torna-se de extrema importância o conhecimento dos perfis diários desse hormônio no sistema ventricular cerebral. Na literatura, há uma grande heterogeneidade na medição dos níveis de melatonina no LCE, dependendo da espécie, do lugar e hora da amostragem, do ensaio utilizado para dosagem e patologias ou controles envolvidos (LESTON, 2010). A maioria dos estudos sobre MEL no LCE foi feita em ovelhas por ser considerada uma espécie que permite coleta de LCE por um período prolongado sem perturbações fisiológicas significativas (TRICOIRE, 2002). Existe apenas um estudo que avaliou a concentração de MEL líquórica (na cisterna magna) em roedores (WITHYACHUMNARNKUL, 1980). Não há na literatura trabalhos que avaliaram o perfil circadiano de liberação de MEL em roedores. Portanto propõe-se com esse trabalho uma análise sistemática das concentrações e da dinâmica da melatonina líquórica no 3ºV de ratos Wistar.

3 OBJETIVOS

- 3.2 Observar o perfil diário da melatonina liquórica em ratos jovens e idosos;
- 3.3 Analisar o perfil diário da melatonina liquórica em animais jovens sem a presença de melatonina plasmática (pinelectomizados – PINX).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Desenho Experimental

Utilizaram-se ratos albinos da linhagem Wistar jovens (2 meses) e idosos (12 meses). Os animais foram mantidos em biotério com ciclo invertido de claro-escuro 12/12 (luzes acesas às 20:00) e temperatura controlada (21 ± 2 °C). Os animais receberam comida e água à vontade. Os procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB). Analisaram-se 3 grupos experimentais: animal jovem, idoso e jovem pinealectomizado.

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

4.2.1 *Pinealectomia*

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Dopalen[®] (Paulínia, SP, Brasil) (5 ml) e Anasedan[®] (Paulínia, SP, Brasil) (1,7 ml), dessa mistura injetou-se intraperitonealmente 0,15 ml/100 g de peso por animal. Eles foram posicionados em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) após perda dos reflexos. Usando-se uma broca circular fez-se uma perfuração centrada no lambda () e a calota foi delicadamente retirada para remoção da glândula pineal. Após a remoção da glândula com pinça cirúrgica a calota foi reposicionada e seguiu-se a implantação das sondas para microdiálise.

4.2.2 *Implantação das sondas para microdiálise*

Todos os grupos experimentais foram implantados com cânulas para microdiálise (CMA 12 Elite – Microdialysis Probe[®], Solna, Suécia) (figura 5). Os animais foram anestesiados e posicionados em aparelho estereotáxico após perda de reflexos. Fez-se uma perfuração na posição, 2 mm posterior ao bregma, na linha média. Outras 3 perfurações foram feitas para colocação de parafusos que deram base para a fixação da cânula. Após a fixação dos parafusos a sonda foi implantada no 3º ventrículo cerebral (coordenadas: anteroposterior - 2,00 mm do bregma e dorsoventral 7.55 mm a partir da calota) (Nível 27, SWANSON, 1998) (Figura 5). A cânula foi fixada na superfície do crânio com cimento dentário (co-polímero de acrílico e acrílico auto polimerizante (Clássico Artigos Odontológicos®, São Paulo, SP, Brasil). Após a fixação da cânula os animais tiveram o escalpo suturado. A coleta de amostras se iniciou após 7 dias da cirurgia.

Figura 6. (A) Cânula para microdiálise CMA 12 Elite (Microdialysis Probe®). (B) Procedimento cirúrgico para implantação da sonda guia para a cânula.

4.3 Coletas das Amostras

Uma hora antes do início da coleta das amostras, a entrada de cada sonda foi conectada a uma bomba de perfusão (PHD 22/2000, Harvard Apparatus, Madras, OR, EUA) (Figura 6) através de um cateter de polietileno (Portex Limited, Hythe, Kent, Inglaterra). Outro cateter foi conectado à saída da sonda. A cânula de saída leva o dialisado a um tubo de coleta de polipropileno (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

Os cateteres passam por um túnel articulado de malha metálica, conectado a um sistema de juntas giratórias com braço móvel (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, EUA). Este sistema está associado a um balanceador que permite aos animais liberdade de movimentos na gaiola (Figura 6). Durante todo o período de microdiálise os animais foram perfundidos com uma solução de Ringer (NaCl 174 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ mM, Hepes 10 mM) com fluxo de 3 µL/min.

As amostras de dialisado (180 µL) foram coletadas a cada hora durante todo o período escuro (ZT 12 ao ZT 24) e sabendo-se que a liberação diurna de MEL é basal (REITER, 1991) uma única amostra foi coletada durante o dia no ZT 11 (uma hora antes do momento da inversão do período claro com o escuro). A coleta descrita aconteceu durante os 5 dias de experimentos.

Figura 7. (Fonte: Modificado de Amaral, 2009). **(A)** Bomba de infusão com seringas conectadas aos cateteres de polietileno. As seringas contêm Ringer que infundirão o animal. O dialisado será coletado em tubo conectado à base do braço móvel. **(B)** Sistema de juntas giratórias com braço móvel, mostrando ligação dos cateteres de polietileno protegidos por túnel de malha metálica articulado que permitem livre movimentação do animal na caixa.

4.4 Verificação da Localização de Implantação da Sonda

No fim das coletas, os ratos foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi removido delicadamente e mantido em formalina para fixação e facilitação da obtenção dos cortes histológicos. Cortes longitudinais de 30 μm de espessura foram feitos em criostato na região da implantação da cânula. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinadas para posterior coloração com tionina (coloração de Nissl) e análise sob microscópio. Os resultados da microdialise foram validados nos animais em que a cânula estava localizada no terceiro ventrículo cerebral.

4.5 Dosagem de Melatonina por HPLC

A concentração de melatonina foi dosada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica (HPLC Waters, Milford, MA, EUA). O sistema cromatográfico é composto por uma bomba Waters 610 que perfunde isocraticamente o sistema, uma coluna de fase reversa Resolve C18 (partícula esférica de 5 mm; 3,9 x 150 mm) e um detector eletroquímico Waters 464, operado em modo DC. O sistema é controlado pelo programa computacional Empower Software (Waters Corporation. V. 5.0, 2002) através de uma interface programável (Waters System Interface Module).

Os dialisados (40 μL) foram injetados no sistema de cromatografia (injetor modelo 7125, com loop de 20 μL , Rheodyne Inc./IDEX[®] Health and Science, Rohner Park, CA EUA).

Como fase móvel foi usada uma solução contendo tampão acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol a 35% pH 3,7. As cromatografias realizadas foram de fase reversa, o sistema foi operado isocraticamente com fluxo de 1 mL/min, potencial de oxidação de +900 mV e corrida com 6 minutos de duração.

As soluções estoque do padrão de melatonina (1 mM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foram preparadas em solução de HCL 0,1 M acrescida de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02% , aliqüotadas em tubos de microcentrífuga e mantidas a -80 °C. Quando foram utilizadas, uma alíquota de padrão de melatonina foi descongelada e fez-se uma diluição em Ringer para obtenção das concentrações desejadas. Todos os reagentes utilizados têm grau de pureza adequado para HPLC.

Curvas de calibração com 5 concentrações diferentes e conhecidas (1,74 a 27,84 ng/20µL) foram utilizadas para a quantificação da melatonina presente nas amostras. As curvas de calibração foram obtidas através do programa Empower Software (Waters Corporation v. 5.0) pela relação das concentrações de cada padrão com as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas. A identificação da melatonina das amostras deu-se pela comparação do seu tempo de retenção com aqueles padrões conhecidos e a quantificação foi realizada pelo mesmo programa computacional.

5 RESULTADOS OBTIDOS

5.1 Avaliação individual do perfil diário de melatonina no 3º ventrículo cerebral pela técnica de microdiálise no animal jovem, idoso e pinealectomizado

Após a implantação das cânulas os animais tiveram uma semana para se recuperar da cirurgia. Uma hora antes do início das coletas o animal foi ligado ao sistema de microdiálise como descrito anteriormente. Durante o experimento os animais tiveram acesso à água e comida à vontade e tiveram livre movimentação pela caixa.

Somente foram considerados os resultados dos animais em que a posição correta da cânula foi observada por histologia (Figura 8).

Figura 8. Lâmina histológica demonstrando cânula implantada no terceiro ventrículo do animal.

Seguem abaixo as quantificações das concentrações de melatonina líquórica nos animais jovem, idoso e pinealectomizado.

5.1.1 *Animal jovem*

A dosagem de MEL no animal jovem mostra que o perfil da concentração de MEL líquórica segue os mesmos padrões de liberação de melatonina pela glândula pineal, com uma quantidade basal durante o dia e concentrações mais elevadas durante a noite (aproximadamente 3 ng/ml).

Nos gráficos demonstrando a quantidade de MEL liquórica dia-a-dia observa-se uma variação do padrão de concentração no mesmo animal a cada noite.

Figura 9. Perfil diário de melatonina liquórica – média dos 5 dias de coleta (animal jovem).

Figura 10. Perfil de melatonina liquórica dia-a-dia (animal jovem).

5.1.2 Animal idoso

O animal idoso também apresentou o padrão de concentrações liquóricas baixas durante o dia e mais altas durante a noite. Porém não houve, como se esperava, uma diminuição considerável das concentrações de MEL liquóricas no animal idoso.

Figura 11. Perfil diário de melatonina liquórica – média dos 5 dias de coleta (animal idoso).

Figura 12. Perfil de melatonina liquórica dia-a-dia (animal idoso).

5.1.3 Animais Pinealectomizados (PINX)

Surpreendentemente, os resultados das quantificações nos animais PINX, demonstraram um claro perfil de concentração de MEL no líquido com concentrações semelhantes às do animal jovem.

Figura 13. Perfil diário de melatonina líquórica – média de 4 dias de coleta (animal PINX).

Figura 14. Perfil de melatonina líquórica dia-a-dia (animal PINX).

6 DISCUSSÃO

Eventos rítmicos como a secreção de melatonina apresentam mudanças dinâmicas durante o ciclo claro/escuro. Com a microdiálise essas mudanças podem ser acompanhadas efetivamente *in vivo* por monitoração contínua de animais individuais (BORJIGIN, 2008).

Observou-se neste trabalho, através de microdiálise no 3ºV de ratos, que os perfis de concentração de melatonina em todos os animais experimentais (jovem, idoso e pinealectomizado) seguiram os mesmos padrões da liberação de MEL pela glândula pineal com níveis baixos durante o dia e níveis aumentados durante a noite. No líquor as quantidades encontradas estão em torno de 3 ng/ml. Na pineal a quantidade de melatonina tem um pico no ZT 18 de aproximadamente 5 ng/ml (AMARAL, 2009) evidenciando que a maior parte da melatonina produzida pela glândula pineal é liberada diretamente no 3ºV em ratos.

A observação da liberação de MEL no líquido cerebroespinal do 3ºV enfatiza o papel essencial desse hormônio na fisiologia cerebral (TRICOIRE, 2002). A quantidade de MEL neste compartimento excede os níveis plasmáticos e o número de receptores conhecidos no SNC (REITER, 2002). Isto sugere sua ação independente de receptores, ou seja, o efeito neuroprotetor da MEL depende principalmente de sua atividade antioxidante (KARASEK, 2006), protegendo macromoléculas citosólicas e nucleares da citotoxicidade dos radicais livres (SIMONNEAUX, 2003).

Sabe-se que a de MEL circulante diminui progressivamente com a idade (REITER, 1994). Existe na literatura somente um trabalho sobre a quantidade líquórica desse hormônio *in vivo* no líquido cerebrospinal, porém, as amostras foram coletadas na cisterna magna. Neste estudo observaram que os níveis de MEL no líquido cerebrospinal desse compartimento foram mais baixos que os níveis plasmáticos e não apresentaram mudanças circadianas significativas (WITHYACHUMNARNKUL, 1980).

Surpreendentemente não observamos uma diminuição significativa na quantidade de melatonina no líquor do animal idoso. Uma hipótese que explicaria esse achado é que os níveis encontrados nos animais idosos teriam uma ação unicamente central, já que os níveis plasmáticos de MEL devem estar diminuídos com a idade.

Uma das maiores causas da destruição dos tecidos neurais no envelhecimento é o resultado do metabolismo aeróbico natural no cérebro: os radicais livres. O cérebro é particularmente susceptível ao ataque dos radicais livres por gerar mais agentes tóxicos que qualquer órgão do corpo. Devido a sua alta atividade metabólica, o cérebro utiliza muito

oxigênio (aproximadamente 20% do total de oxigênio inspirado em um indivíduo em repouso e o cérebro representa apenas 2% do peso corporal). As vitaminas antioxidantes E e C protegem o cérebro contra danos oxidativos. A melatonina também é conhecida como um potente antioxidante. *In vitro*, MEL é mais efetiva que glutathione peroxidase na eliminação de radicais hidroxila (TAN, 1993) e mais eficiente que a vitamina E em neutralizar radicais peróxido (PIERI, 1994). Além disso, MEL estimula a ação da glutathione peroxidase que é a principal enzima antioxidante do SNC (BARLOW-WALDEN, 1995). A MEL, por sua característica anfifílica é única entre os agentes antioxidantes, pois vitamina E é lipossolúvel e vitamina C é hidrossolúvel, ou seja, MEL pode exercer sua ação em qualquer compartimento celular do SNC (REITER, 1995).

Além disso, radicais livres estão envolvidos em várias patologias neurodegenerativas, incluindo doenças relacionadas ao envelhecimento como a doença de Alzheimer, Parkinson, Esclerose e Isquemia cerebral por exemplo. Inúmeros estudos observaram que além do papel antioxidante, a ação anti-apoptótica da MEL nessas patologias (WANG, 2009).

Com base nesses dados, pode-se atribuir a MEL presente no líquido cefalorraquiano ventricular um papel essencial na prevenção de danos oxidativos no cérebro, sendo, portanto, imprescindível no SNC durante o envelhecimento quando o stress oxidativo atinge seu auge.

Outro dado importante desse trabalho foi a observação de níveis elevados de MEL no líquido de animais pinealectomizados. Esperava-se que a cirurgia eliminaria, ou diminuísse consideravelmente os níveis de MEL no líquido desses animais. Porém a pinealectomia remove somente a pineal superficial. Acreditava-se que os corpos celulares dos pinealócitos estivessem na pineal superficial e que a retirada desta levaria o pedúnculo pineal e a pineal profunda à degeneração. Porém alguns trabalhos demonstraram a expressão do RNAm da AA-NAT *in vivo* na pineal profunda de ratos com um claro ritmo circadiano (RIBELAYGA, 1998;). Além disso, em outro estudo do mesmo grupo observou-se também a expressão do RNAm da HIOMT na pineal profunda, ou seja, a pineal profunda possui pinealócitos verdadeiros capazes de sintetizar MEL durante o período escuro (GARIDOU, 2001). Outro dado importante do estudo citado anteriormente é que a ganglionectomia bilateral, ou seja, a eliminação da estimulação noradrenérgica na glândula pineal, diminuiu os níveis de expressão do RNAm da AA-NAT, mas seus níveis não decaíram aos valores diurnos, além disso, os níveis noturnos de RNAm ainda eram 10 vezes maiores que nos ratos controle, porém perderam a ritmicidade, sugerindo uma regulação não-noradrenérgica da expressão gênica da AA-NAT na pineal profunda. Segundo Garidou (2001), está bem estabelecido que a MEL

sintetizada na pineal superficial é liberada diretamente na corrente sanguínea, porém ainda não se conhecia o local onde MEL sintetizada pela pineal profunda era liberada.

Neste trabalho fica evidenciado, portanto, que a pineal profunda continua produzindo MEL. Além disso, pode-se atribuir à pineal profunda a MEL encontrada no líquido do 3ºV dos animais jovem e PINX, pois ambos apresentaram semelhantes concentrações de MEL líquórica. A demonstração dessa hipótese está na dependência de experimentos adicionais a serem realizados em breve (lesão da pineal profunda ou ganglionectomia e/ou exposição à luz de animais pinealectomizados e estudo da dinâmica da melatonina líquórica).

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, portanto, com esse trabalho a extrema importância da melatonina para o sistema nervoso central, visto que seus níveis continuam semelhantes no animal jovem, no idoso e no pinealectomizado. Porém esse estudo levantou outras perguntas: 1) Os níveis encontrados nos animais idosos seriam somente de origem pineal, já que se sabe que com o passar dos anos a produção de melatonina pela glândula pineal decai? 2) As quantidades encontradas no animal pinealectomizados seria estritamente originada na pineal profunda, considerando que seus níveis foram muito próximos dos níveis encontrados no animal não pinealectomizado? 3) Os níveis de melatonina no líquido dos animais analisados seriam originados somente na pineal profunda? 4) Melatonina é produzida em diversos tecidos periféricos. Porque justamente no cérebro onde sua ação antioxidante é mais necessária, não haveria outros locais de produção desse hormônio?

São necessários mais estudos para responder consistentemente a essas dúvidas. Para isso seriam necessários experimentos com pinealectomia e lesão da pineal profunda e posterior observação dos níveis líquóricos. Se esse níveis ainda forem detectados podemos inferir que outras estruturas também produzem melatonina no sistema nervoso central. Se isso se confirmar torna-se necessário a realização de experimentos para localização e caracterização de locais no SNC que produzem esse hormônio.

REFERÊNCIAS*

AMARAL, F. G. **Perfil diário e os mecanismos de produção de melatonina pela glândula pineal de ratos diabéticos por estreptozotocina**. Tese (Doutorado em 2009). Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade de São, Paulo São Paulo, 2009.

ARENDT J.; SKENE, D. J. Melatonin as a chronobiotic. **Sleep Med. Rev.** v.9, p.25-39, 2005.

AXELROD, J.; WEISSBACH, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. **Science**. v.131, p.1312, 1960.

BARLOW-WALDEN, L.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M. I.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CEHN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem Int.** v.26, n.5, p.497-502, 1995.

BORJIGIN, J.; LIU, T. Application of long-term microdialysis in circadian rhythm research. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.90, p.148-155, 2008.

BRODAL, P. The different parts of the nervous system. In: The central nervous system: structure and function. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1998.

CATALÁ, M. D.; CAÑETE-NICOLÁS, C.; ARADI, A.; TARAZONA, F. J.; TORMOS, J. M.; PASCUAL-LEONE, A. Melatonin levels in Parkinson's disease: drug therapy versus electrical stimulation of the internal globus pallidus. **Experimental Gerontology**, v.32, p.553-558, 1997.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula Pineal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p.981-990.

CIPOLLA-NETO, J. **Controle neural do metabolismo da glândula pineal**. Tese (livre docência). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia e Biofísica, São Paulo, 1996.

EL-SHERIF, Y.; TESORIERO, J.; HOGAN M. V.; WIERASZKO, A. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. **J. Neurosci Res.** v.72, p.454-460, 2003.

***De acordo com:**

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

GARIDOU, M. L.; BARTOL, I.; CALGARI, P.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX V. In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine n- acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. **Neuroscience**. v.105, n. 3, p.721-729, 2001.

HO, A. K.; KLEIN, D. C. Activation of alpha 1-adrenoreceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca^{2+} elevating agents increases pineal phospholipase A2 activity. Evidence that protein kinase C may participate in Ca^{2+} -dependent alpha 1-adrenergic stimulation of pineal phospholipase A2 activity. **J. Biol. Chem.** v.262, p.11764-11770, 1987.

KALSBECK, A.; GARIDOU, M. L.; PALM, I. F.; SIMONNEAUX, V.; PEVET, P.; BUIJS, R. M. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. **Eur. J. Neurosci.** v.12, p.3146-3154, 2000.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. Ventricular organization of cerebral fluid: blood-brain-barrier, brain edema and hydrocephalus. In: **Principles of Neural Science**. 4^a ed. Local: McGraw-Hill Companies Inc. USA, 2000.

KAPPERS J. A. The development, topographical relations and innervations of epiphysis cerebri in albin rat. **Zeitschrift fur Zellforschung**. v.52, p.163-215, 1960.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Experimental Gerontology**. v.39, p.1723-1729, 2004.

KARASEK, M.; WINCZYK, K. Melatonin in humans. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.57, p.19-39, 2006.

KLEIN, D. C.; WELLER, J. L.; MOORE, R. Y. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. **Proc. Natl. Acad Sci.** v.68, p.3107-3110, 1971.

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

KLEIN, D. C.; SCHAAD, N. L.; NAMBOODIRI, M. A. A.; WELLER, J. L. Regulation of pineal serotonin N acetyltransferase activity. **Biochem. Soc. Trans.** v.20, n.2, p.299-304, 1992.

LAHIRI, D. K.; GE, Y. W.; SHARMAN E. H.; BONDY, S. C. Age related changes in serum melatonin in mice: higher levels of combined melatonin and 6-hydroxymelatonin sulfate in the cerebral cortex than serum, heart, liver and kidney tissues. **J. Pineal Res.**, v.36. n.4, p.217-23, 2004.

LESTON J.; HARTHÉ C.; BRUN J.; MOTTOLESE C.; MERTENS P.; SINDOU M.; CLAUSTRAT B. Melatonin is released in the third ventricle in humans. A study in movement disorder. **Neuroscience Letters**. v.469, p.294-297, 2010.

LEWY, A. J.; TETSUO, M.; MARKEY, S. P.; GOODWIN, F. K.; KOPIN, I. J. Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.50, n.1, p.204-205, 1980.

LOVENBERG W.; WEISSBACH H.; UNDEFRIEND, S. Aromatic L-aminoacid decarboxylase. **J. Biol. Chem**. v.237, p.89-92, 1962.

LOVENBERG, W.; JEQUIER, E.; SJOERDSMA, A. Thryptophan hydroxylation, measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. **Science**. v.155, p.217-19, 1967.

MATSUBARA, E.; BRYANT-THOMAS, T.; QUINTO, J. P.; HENRY, T. L.; POEGGELER, B.; HERBERT, D.; CRUZ-SANCHES, F.; CHYAN Y.; SMITH, M. A.; PERRY, G.; SHOJI M.; ABE, K.; LEONE, A.; GRUNDKE-IKBAL, I.; WILSON, G.L.; GHISO, J.; WILLIAMS, C.; REFOLO, L. M.; PAPPOLLA, M. A. Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. **J Neurochem**. v.85, p.1101-1108, 2003.

MEFFORD, I. N.; CHAG, P.; KLEIN, D.C.; NAMBOODIRI, M. A.; SUDGEN, D.; BARCHAS, J. Reciprocal day/night relationships between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. **Endocrinology**. v.113 n.5, p.1582-6, 1983.

MIYAZAKI, T.; KUWANO, H.; KATO, H.; ANDO, H.; KIMURA, H.; INOSE, T.; OHNO, T.; SUZUKI, M.; NAKAJIMA, M.; MANDA, R.; FUKUCHI, M.; TSUKADA, K. Correlation between serum melatonin circadian and intensive care unit psychosis after thoracic esophagectomy. **Surgery**. v.133, p. 662-668, 2003.

MOLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the pineal gland. **Microsc Res Tech**, v.12, n.3, p.188-204, 1992.

MOORE, R. Y. Neural control of pineal gland. **Behav. Brain Res**. v.73, p.125-130, 1996.

OLCESE J. M; CAO, C.; MORI, T.; MAMCARZ, M. B.; MAXWELL, A.; RUNFELDT, M. J.; WANG, L.; ZHANG, C.; LIN, X.; ZHANG, G.; ARENDASH, G. W. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer's disease. **J. Pineal Res.** v.47, p.82-96, 2009.

OZAKI, Y.; LYNCH, H. J. Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. **Endocrinology.** v.99, p.641-644, 1976.

PACCHIEROTTI, C.; IAPICHINO, S.; BOSSINI, L.; PIERACCINI, F. Melatonin in psychiatric disorders: a review on the melatonin involvement in psychiatry. **Frontiers in Neuroendocrinology.** v.22, p.18-32, 2001.

PANDI-PERUMAL S. R.; TRAKHT I.; SRINIVASAN V.; SPENCE D. W.; MAESTRONI G. J. M.; ZIZAPEL N.; CARDINALI, D. P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology,** v.85, p.335-353, 2008.

PANDI-PERUMAL, S. R.; ZIZAPEL, N.; SRINIVASAN, V.; CARDINALI, D. P. Melatonin and sleep in aging population. **Experimental Gerontology.** v.40, p.911-925, 2005.

PAULIS, L.; SIMKO, F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanism behind. **Physiol. Res.** v.56, p.671-684, 2007.

PERES, M. F. P. Melatonin, the pineal gland and their implication for headache disorders. **Cephalgia.** v.25, p.403-411, 2005.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; DECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci.** v.55, p.271-276, 1994.

REITER, R.J. Pineal function during aging attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. **Acta Neurobiol Exp (Wars).** Suppl:31-9, 1994.

REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **The Endocrine Society.** v.12, p.151-180, 1991.

REITER, R.J. What constitute a physiological concentration of melatonin? **J. Pineal Res.** v.34, p.79-80, 2003.

RIBELAYGA, C.; GAUER, F.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX, V. Distribution of hydroxyindole-O-methyltransferase in the rat brain: an *in situ* hybridization study. **Cell Tissue Res.** v.291, p.415-421, 1998.

ROSEBOOM P. H.; COON, S. L.; BALER, R.; McCUNE, S. K.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Melatonin synthesis: analysis of more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology.** v.137, n.7, p.3033-3044, 1996.

SCHNEIDER T.; SEMM P.; VOLLRATH, L. Ultrastructural observations on the central innervations of the guinea-pig pineal gland. **Cell Tissue Res.** v.220, n.1, p.41-9, 1981.

SILVA, S. O.; XIMENES, V. F.; LIVRAMENTO, J. A.; CATALANI, L. H.; CAMPA, A. High concentrations of the melatonin metabolite, N-acetyl-N- formyl-5-metoxykynuramine, in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis: a possible immunomodulatory mechanism. **J. Pineal Res.** v.39, p.302-306, 2005.

SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. Generation of melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.** 55:325-95, 2003.

SKINNER D. C.; MALPAUX B. High melatonin concentration in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to galen vein blood recirculation through the choroid plexus. **Endocrinology**, v.140, p.4399-4405, 1999.

SKIPO, J; THIERRY, J. C. The choroid plexus – cerebrospinal fluid system: undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. **Acta Neurobiol Exp.** v.68, p.414-428, 2008.

SNYDER, S.H.; AXELROD, J. A sensitive assay for 5-hydroxytryptophan decarboxylase. **Biochem. Pharmacol.** v.13, p.805-06, 1964.

STEVENS, R. G.; BLASK, D. E.; BRAINARD G. C.; HANSEN J.; LOCKLEY, S. W.; PROVENCIO, I.; REA, M. S.; REINLIB, L. Meeting report: the role of environmental lighting and circadian disruption in cancer and other diseases. **Environmental Health Perspectives.** v.115, p.1357-62, 2007.

STONE, T. W. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. **Progress in Neurobiology.** v.64, p.185-218, 2001.

SUGDEN, D.; KLEIN, D. C. Rat pineal alpha 1-adrenoreceptors: identification and characterization using [125I]iodo-2-[beta-(4-hydroxyphenyl)-ethylaminomethyl] tetralone. **Endocrinology**. v.114, p.435-440, 1984.

SWANSON, L. W. **Brain Maps: Structure of the Rat Brain**. 2. ed. The Netherlands. Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1998.

TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B.; MANCESTER, L. C.; REITER, R. J. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine J.** v.1, p.57-60, 1993.

TRICOIRE, H.; LOCATELLI, A.; CHEMINUAUX, P.; MALPAUX, B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. **Endocrinology**. v.143, n.1, p.84-90, 2002.

TRICOIRE, H.; MALPAUX, B.; MOLLER, M. Cellular lining of the sheep pineal recess studied by light-, transmission-, and scanning electron microscopy: morphologic indications for a direct secretion of melatonin from the pineal gland to the cerebrospinal fluid. **The Journal of Comparative Neurology**. v.456, p.39-47, 2003.

TRUEX, R. C.; CARPENTER, M. B. The meninges and the cerebrospinal fluid. In: **Human Neuroanatomy**. 6. ed. Baltimore, Maryland. The Williams & Wilkins Company, 1969.

VOISIN, P.; NAMBOODIRI, M. A. A.; KLEIN, D. C. Arylamine N-acetyltransferase and aryl-alkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. **J. Biol. Chem.** v.259, p.10913-18, 1984.

WANG, X. The anti-apoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. **CNS Neurosci Ther.** v.15, n.4, p.345-357, 2009.

WEISSBACH, H.; REDFIELD, B. G.; AXELROD, J. Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetyl-serotonin. **Biochem. Biophys. Acta**. v.43, p.352-53, 1960.

WITHYACHUMNARNKUL B.; KNIGGE, K. M. Melatonin concentration in cerebrospinal fluid, peripheral plasma and plasma of the confluens sinuum of the rat. **Neuroendocrinology**, v.30, n.6. p.382-388, 1980.

WU, Y.; FEENSTRA, G. P.; ZHOU, J.; LIU, R.; TORAÑO, J. S.; KAN, H. J. M. V.; FISCHER D. F.; RAVID, R.; SWAAB, D. F. Molecular changes underlying reduced pineal

melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. **J. Clin Endocrinol Metab.** V.88, n.12, p.5898-5906, 2003.

ZAWILSKA, J. B.; SKENE, D. J.; ARENDT, J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. **Pharmacological Reports.** v.61, p.383-410, 2009.