LÍVIA SILVA MEDEIROS DE MESQUITA

**AÇÕES DA METILECGONIDINA SOBRE A SÍNTESE DE MELATONINA
NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS.**

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
2011

LÍVIA SILVA MEDEIROS DE MESQUITA

**AÇÕES DA METILECGONIDINA SOBRE A SÍNTESE DE MELATONINA
NA GLÂNDULA PINEAL DE RATOS.**

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: Profa. Dra. Solange Castro Afeche

Versão Corrigida

São Paulo
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Mesquita, Livia Silva Medeiros de.

Ações da Metilecgonidina sobre a síntese da melatonina na glândula pineal de ratos / Livia Silva Medeiros de Mesquita. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Solange Castro Afêche.

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

Versão do título para o inglês: *Methylecgonidine actions on melatonin synthesis in the rat pineal gland*

Descritores: 1. Glândula Pineal 2. Melatonina 3. Metilecgonidina 4. AEME 5. Crack 6. Acetilcolina I. Afêche, Solange Castro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0198/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Livia Silva Medeiros de Mesquita.

Título da Dissertação: Ações da Metilecgonidina sobre a síntese da melatonina na glândula pineal de ratos.

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 completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
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 **84** nas fls. **57** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Solange Castro Afeche, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Ações da metilecgonidina sobre a síntese de melatonina pela glândula pineal de ratos"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Lívia Silva Medeiros de Mesquita e o pesquisador 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 (CEEA)** em **19.11.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de novembro de 2008.

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

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

Aos meus filhos Jefferson Jr. e Isabelly pela colaboração e paciência, ao meu esposo Jefferson pelo apoio e incentivo, aos meus pais e irmãos pelo cuidado e dedicação constantes.

Obrigada !!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder-me essa grande vitória alcançada.

A prof^ª. Dr^ª Solange Castro Afeche pela orientação, amizade e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. José Cipolla Neto pelo acolhimento em seu laboratório e inestimável apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos e funcionários do Instituto Butantan, Jéssica Teixeira, Victória Atherino em especial a Eduardo Frare e Mariana Abrahão pela parceria e colabração nos experimentos realizados.

Aos amigos do laboratório de Neurobiologia, Rafael Peres, Julieta Scialfa, Fernanda Amaral, Daniela Buonfiglio, Ana Lopes, Rodrigo Peliciari, Rosana Dantas, Jéssica Andrade, Ronaldo Melo, Rafael Prévide pela colaboração e troca de informações.

Ao laboratório de Farmacologia pela colaboração, em especial ao Raphael Caio e Lívia Dati.

Ao Centro de Apoio a Pesquisa (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos amigos, enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada !!!

*“... Esforça-te e tenha bom ânimo; não temas nem te
espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo...”*

Josué 1:9

RESUMO

MESQUITA, L. S. M. **Ações da metilecgonidina sobre a síntese de melatonina na glândula pineal de ratos.** 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

A glândula pineal sintetiza o hormônio melatonina no período escuro. No rato, a ativação dos receptores α e β -adrenérgicos presentes nos pinealócitos aumenta os níveis de AMPc, levando à síntese e ativação da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), principal enzima da via de síntese da melatonina. Além da inervação simpática, a glândula recebe também inervação parassimpática, sendo o efeito da acetilcolina inibitório ao atuar em receptores nicotínicos pós-sinápticos e muscarínicos pré-sinápticos. A metilecgonidina, também chamada de anidroecgonidina metil éster (AEME) é o produto da pirólise da cocaína, quando esta é usada sob a forma de “crack”. Neste trabalho estudamos os efeitos da AEME sobre a síntese da melatonina, *in vitro* e *in vivo*. Culturas primárias de glândulas pineais de ratos foram usadas como modelo. As glândulas foram estimuladas com noradrenalina (1 μ M), em associação com a AEME (1 e 100 μ M), e/ou antagonistas colinérgicos muscarínicos (atropina), nicotínicos (TMPH) e glutamatérgicos (MK801 e NBQX), e analisada a síntese de melatonina. Foram investigados também a atividade da enzima AANAT, por medição radiométrica, o cálcio intracelular por microscopia confocal, o AMPc por ELISA e a viabilidade celular e a fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Nos experimentos *in vivo* foi observado o perfil noturno de síntese da melatonina após injeção intraperitoneal de AEME (2,8 mg/kg peso) ou de salina (0,9%), por 10 dias. A melatonina das glândulas foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. A AEME reduziu a síntese da melatonina em ambas as concentrações utilizadas em experimentos *in vitro*. A análise *in vivo* mostrou haver redução significativa da melatonina somente no ZT 22, que representa o final do período escuro. A atividade da enzima AANAT não foi alterada pela AEME. Os receptores nicotínicos e glutamatérgicos parecem não estar envolvidos nas ações da AEME. Os efeitos de redução da melatonina foram revertidos pela atropina, o que indica que a ação da AEME parece ser mediada pelo sistema colinérgico muscarínico. A AEME induziu um aumento do cálcio intracelular, não alterando o AMPc. Com relação à viabilidade celular e fragmentação do DNA não houve alterações, indicando que a AEME nas concentrações utilizadas não levou à morte celular. Tendo em vista os fatos expostos podemos concluir que a AEME mesmo sem atuar sobre a AANAT, reduz acentuadamente a síntese da melatonina, tanto em culturas de glândulas pineais quanto em experimentos *in vivo*, e que a

ação da AEME se dá por interferir com o sistema colinérgico muscarínico, aumentando a concentração de Ca^{+2} nos pinealócitos da glândula pineal.

Palavras-chave: Glândula pineal. Melatonina. Metilecgonidina. AEME. Crack. Acetilcolina.

ABSTRACT

MESQUITA, L. S. M. **Actions of the methylecgonidine on the synthesis of melatonin in the pineal gland of rats.** Thesis (Masters in Human Physiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2011.

The pineal gland synthesizes the hormone melatonin in the dark. In rats, the activation of α and β -adrenergic receptors increases cAMP levels and the synthesis and activity of arylalkylamine-N-acetyltransferase enzyme (AANAT), that is a key enzyme of the melatonin synthesis pathway. The pineal gland is also innervated by parasympathetic fibers, being inhibitory the effect of acetylcholine. Methylecgonidine, also called androecgonidine methyl ester (AEME), is the pyrolysis product of cocaine when it is consumed as "crack." In this work we studied the effects of AEME on the melatonin synthesis, *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* studies have used primary culture of rat pineal glands stimulated with noradrenaline, in association with AEME or AEME plus muscarinic (atropine) or nicotinic (TMPH) cholinergic antagonists or glutamatergic antagonists (NBQX and MK8001). It was analyzed: cell viability, DNA fragmentation, melatonin content, AANAT activity, intracellular calcium and intracellular cAMP content. In the *in vivo* experiments it was observed the nocturnal profile of melatonin synthesis after intraperitoneal injection of AEME (2.8 mg/kg) or saline (0,9 %) for 10 days. Melatonin content was analyzed by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. AANAT activity was evaluated by radiometric assay. Cell viability and DNA fragmentation were analyzed by flow cytometry. Ca^{2+} was analyzed by confocal microscopy. cAMP was quantified by ELISA. AEME reduced melatonin synthesis in both conditions, *in vitro* and *in vivo*. *In vivo*, the difference was statistically significant only in ZT=22, at the end of the dark period. AANAT activity was not altered by AEME. Cholinergic muscarinic receptors seem to be involved in AEME effects, but nicotinic and glutamatergic receptors do not. There was an increase in Ca^{2+} induced by AEME; on the other hand, cAMP was not altered by AEME. AEME did not induce cell death, because cell viability and DNA fragmentation were not affected by AEME. Given the facts presented we can conclude that AEME reduces the synthesis of melatonin without acting on the AANAT activity and that the action of AEME occurs by increasing Ca^{2+} concentration in pinealocytes. Moreover, AEME exerts its actions on melatonin synthesis by interfering with the muscarinic cholinergic system.

Keywords: Pineal gland. Melatonin. Methylecgonidine. AEME. Crack. Acetylcholine.

LISTA DE ABREVIATURAS

AANAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
ACh	acetilcolina
AEEE	anidroecgonina etil éster
AEME	anidroecgonidina metil éster
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoazolepropionico
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANEEE	anidronorecgonina etil éster
ANEME	anidronorecgonina metil éster
CIL	coluna intermédiolateral
CREB	“cAMP response element binding”
Fra-2	“fos-related antigen-2”
GABA	ácido gama-aminobutírico
GCS	gânglios cervicais superiores
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
HIOMT	hidroxi-indol-oxi-metiltransferase
HPLC	High-performance liquid chromatography
ICER	“inducible cAMP early repressor”
IGL	folheto intergeniculado talâmico
IP ₃	fosfato de inositol
IP	intraperitoneal
JunB	jun B proto-oncogene
mAChRs	receptores muscarínicos da acetilcolina
MAO	monoamina: o ₂ oxiredutase
MAPk	proteína quinase ativada por mitógeno
MK801	(5S, 10R)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a, α]cicloheptano-5,10-imina maleato
MTT	brometo de tetrazólio
n	número de amostras
nAChRs	receptores nicotínicos da acetilcolina
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4- tetrahidrobenzo[f]quinoxalina-7-sulfonamida

NC	nervos conários
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
Nor	noradrenalina
NOS	sintase do óxido nítrico
NPVH	núcleo paraventricular hipotalâmico
NPY	neuropeptídio Y
NSQ	núcleo supraquiasmático
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	sistema nervoso central
TMPH	hidroclorato de 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-4-yl heptanoato
TPH	triptofano hidroxilase
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
VP	vasopressina
ZT	zeitgeber time

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1 Variação rítmica diária e sazonal da síntese da melatonina	18
Figura - 2 Localização da glândula pineal em humanos e ratos.....	19
Figura - 3 Estrutura molecular da melatonina	25
Figura - 4 Representação esquemática da circuitaria neural da síntese da melatonina.....	26
Figura - 5 Bioquímica da glândula pineal	27
Figura - 6 Vias metabólicas da síntese e degradação da melatonina.....	29
Figura -7 Decomposição térmica da cocaína	31
Figura - 8 Produtos de biotransformação da AEME	32
Figura - 9 Efeito da AEME sobre a produção de melatonina pela glândula pineal de ratos....	46
Figura - 10 Avaliação da viabilidade celular e fragmentação de DNA.....	47
Figura - 11 Análise da atividade da enzima AANAT	48
Figura - 12 Análise do efeito colinérgico muscarínico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura	49
Figura -13 Análise do efeito colinérgico nicotínico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura.....	50
Figura -14 Análise do efeito glutamatérgico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura.....	51
Figura -15 Análise da produção de melatonina na glândula pineal- estudos in vivo.....	52
Figura -16 Análise do efeito da AEME sobre o AMPc intracelular.....	53
Figura -17 Análise do efeito da AEME sobre o cálcio.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Glândula Pineal	17
1.2 Inervação da glândula pineal	20
1.3 Inervação colinérgica	20
1.3.1 Receptor colinérgico muscarínicos e nicotínicos	21
1.3.2 Papel da inervação colinérgica na glândula pineal	22
1.4 Papel do glutamato na síntese de melatonina	23
1.4.1 Receptores para glutamato	23
1.4.2 Ações do glutamato na glândula pineal	24
1.5 Melatonina	24
1.6 Controle neural da síntese de melatonina	25
1.7 Bioquímica da síntese de melatonina	26
1.8 Metilecgonidina ou Anidroecgonidina metil éster (AEME)	30
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Animais	36
3.2 Síntese da AEME	36
3.2.1 Preparação da AEME	36
3.3 Cultura de glândula pineal	37
3.4 Dissociação de glândulas pineal	38
3.5 Grupos experimentais	38
3.5.1 Efeito da AEME em diferentes concentrações sobre a síntese de melatonina de glândulas pineais em cultura	38
3.5.2 Avaliação da viabilidade celular e fragmentação do DNA sob a ação da AEME	39
3.5.3 Análise do efeito colinérgico muscarínico da AEME sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura	39
3.5.4 Análise do efeito colinérgico nicotínico da AEME sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura	39

3.5.5	Análise do efeito glutamatérgico da AEME sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura.....	39
3.5.6	Efeito da AEME em diferentes concentrações sobre a atividade da enzima AANAT em glândulas pineais em cultura.....	40
3.5.7	Avaliação do efeito da AEME sobre o Cálcio intracelular.....	40
3.5.8	Avaliação do efeito da AEME sobre o AMPc.....	40
3.6	Análise da síntese de melatonina na glândula pineal - estudos <i>in vivo</i>	41
3.7	Dosagem da melatonina nas glândulas pineais em HPLC.....	41
3.8	Medição radiométrica da atividade da AANAT	42
3.9	Avaliação da Viabilidade e Fragmentação do DNA por Citometria de Fluxo.....	43
3.10	Avaliação do cálcio intracelular por microscopia confocal.....	43
3.11	Dosagem do AMPc por ensaio imunoenzimático.....	44
3.12	Análises estatística.....	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Efeito da AEME em diferentes concentrações sobre a síntese de melatonina de glândulas pineais em cultura.....	46
4.2	Avaliação da viabilidade celular e fragmentação do DNA sob a ação da AEME.....	47
4.3	Análise do efeito colinérgico muscarínico da AEME sobre a síntese de melatonina de glândulas pineais em cultura.....	48
4.4	Análise do efeito colinérgico nicotínico da AEME sobre a síntese de melatonina de glândulas pineais em cultura.....	49
4.5	Análise do efeito glutamatérgico da AEME sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura.....	50
4.6	Efeito da AEME em diferentes concentrações sobre a atividade da enzima AANAT em glândulas pineais em cultura.....	51
4.7	Análise da síntese de melatonina em glândulas pineais – estudos <i>in vivo</i>	52
4.8	Avaliação do efeito da AEME sobre o AMPc.....	53
4.9	Avaliação do efeito da AEME sobre o Cálcio intracelular.....	54
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	61
	*REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândula Pineal

A glândula pineal foi descrita pela primeira vez pelo anatomista Herófilos (335-280a.C), que considerava a pineal como uma espécie de esfíncter regulador dos pensamentos que estariam armazenados nos ventrículos. Alguns anos depois, Galeno (129-200 d.C) observou que a estrutura pineal era diferente das estruturas cerebrais, mas era similar às glândulas endócrinas. No final do século XIX, uma série de trabalhos comparativos foi realizada, constatando a semelhança entre a pineal de mamíferos e a epífise de outros vertebrados, considerando aspectos anatômicos, histológicos e embrionários e incluindo o padrão de inervação (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). O marco inicial para a pineal ser considerada uma glândula endócrina foi o isolamento e caracterização do seu hormônio, denominado melatonina (5-metoxi-N-acetiltryptamina) e, a partir de então, surgiram vários estudos relacionados à glândula e seu hormônio (LERNER; CASE; TAKAHASHI, 1959). Esta descoberta revigorou os estudos sobre a pineal e em pouco tempo foram investigados outros locais de produção, suas vias metabólicas e até mesmo o caráter rítmico com que a pineal produz a melatonina (LERNER; CASE; TAKAHASHI, 1960).

A glândula pineal de peixes, anfíbios, répteis e algumas aves (passariformes) é diretamente fotossensível, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina de mamíferos. Nessas mesmas classes, além de suas características de fotosensibilidade e de secreção 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, apesar de manter-se conectada diretamente com o SNC, passa a estar sob o comando do ciclo de iluminação ambiental, de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas que através de projeções diretas (poucas) ou indiretas, via sistema nervoso autônomo simpático, atingem a glândula pineal. (CIPOLLANETO; AFECHÉ, 2008).

A principal função da glândula pineal é sincronizar os ritmos biológicos ao ciclo de iluminação ambiental através da produção noturna de melatonina. A flutuação diária de síntese e secreção da melatonina sinaliza para o meio interno do organismo se é noite ou dia no meio externo. Além disso, a duração da secreção de melatonina acompanha a duração do escuro e, portanto, as estações do ano, ou seja, em noites mais longas como no inverno há um

maior pico secretório de melatonina ao contrário das noites mais curtas como no verão em que a duração do pico de melatonina é menor (Figura 1). Este sistema garante a organização temporal nas funções fisiológicas, permitindo ao organismo a antecipação e a adaptação aos fenômenos cíclicos ambientais (REITER, 1993). A marcação temporal da melatonina é tão importante que, qualquer que seja a espécie considerada (seja de atividade diurna, noturna ou crepuscular), a produção de melatonina é exclusivamente noturna e a duração de sua concentração no meio extracelular está na estrita dependência da duração do período de escuro da alternância dia-noite (AFECHE; CIPOLLA-NETO, 2008).

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

FONTE: modificada por MESQUITA, L. S. M de CIPOLLA-NETO; AFECHE, (2008)

A glândula pineal é derivada de uma evaginação do diencéfalo e está localizada entre os dois hemisférios cerebrais, acima do terceiro ventrículo (Figura 2). Em mamíferos, o parênquima da glândula pineal consiste de um cordão de células separadas por capilares com amplos espaços perivasculares. Em alguns mamíferos, como por exemplo, homem, macaco, vaca, cavalo, ovelha e porco, a pineal exibe uma forma piramidal e está localizada na parte dorsal do tronco encefálico (MOLLER; BAERES, 2002). Em roedores, a pineal migrou no sentido dorso-caudal e subdividiu-se morfológicamente em três partes distintas formando o

complexo pineal: pineal profunda, pendúnculo pineal, pineal superior (ARENDT, 1998; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003) (Figura 2).

Vários tipos celulares constituem a glândula pineal, e no parênquima da glândula são encontrados pinealócitos, células intersticiais compostas pelas células da glia (astrócitos, microglia, oligodendrócitos, células de Schwann) (MØLLER; BAERES, 2002), células endoteliais, fagócitos, perivasculares e neurônios (REITER, 1981).

Os pinealócitos são as células mais abundantes na pineal e encontram-se distribuídos em todo parênquima na proporção de aproximadamente 90% do total das células (CALVO; BOYA; GARCIA-MAURIÑO, 1988; VOLLRATH, 1985). Estas células apresentam alta atividade neuroendócrina e são responsáveis por sintetizar e liberar a melatonina. A sua morfologia consiste basicamente de um corpo celular (7-12µm de diâmetro) apresentando um citoplasma claro e grandes núcleos esféricos (MØLLER; BAERES; 2002).

Figura 2. Localização da glândula pineal em humanos e em ratos

FONTES: Luke (2001); Richter et al.; (2004)

1.2 Inervação da Glândula Pineal

A glândula pineal de mamíferos é innervada por fibras de várias origens, sendo que a mais importante é proveniente das fibras simpáticas pós-ganglionares de origem do gânglio cervical superior. Essa innervação é sem dúvida essencial para a produção de melatonina, uma vez que a noradrenalina é o estímulo que a deflagra. As fibras adrenérgicas terminam na pineal, no espaço perivascular, e neste a noradrenalina é liberada. A liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos é regulada por uma via proveniente dos núcleos supraquiasmáticos (ARENDET, 1998; VOLLRATH, 1985).

Embora em menor densidade que a innervação simpática, a pineal também recebe fibras nervosas provenientes de vários locais tais como do núcleo paraventricular hipotalâmico, do folheto intergeniculado talâmico (IGL), do núcleo dorsal da rafe, das comissuras habenular e posterior e até mesmo do gânglio trigeminal (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

A importância de outras innervations na pineal, que não a simpática, pode ser exemplificada pelo fato de que um único pulso de luz no meio da fase escura reduz drasticamente os níveis de melatonina. Acredita-se que esse efeito inibitório imediato deve-se à innervação proveniente do IGL que contém principalmente o neurotransmissor GABA (CIPOLLA-NETO et al., 1995). As fibras peptidérgicas são abundantes e juntamente com outros neurotransmissores permitem que os pinealócitos entrem em contato com uma grande variedade de substâncias como, ocitocina, substância P, dopamina, serotonina (5-HT), peptideo intestinal vasoativo (VIP), vasopressina (VP), acetilcolina, ácido gama-aminobutírico (GABA). A ação destas substâncias geralmente está relacionada a uma modulação da transmissão simpática, não exercendo papel isoladamente (ARENDET, 1998).

1.3 Inervação colinérgica

A existência de innervação parassimpática foi demonstrada na glândula pineal de mamíferos por Korf (1996). Esta innervação colinérgica tem origem no gânglio pterigopalatino (MØLLER, 1992). De modo geral o efeito da acetilcolina é tido como inibitório e pode ocorrer tanto pré-sinápticamente como diretamente nos pinealócitos. Quando as fibras colinérgicas são estimuladas, a acetilcolina liberada dos terminais nervosos liga-se aos receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs) e nicotínicos (nAChRs) encontrados na glândula pineal (PHANSUWAN-PUJITO; MOLLER; GOVITRAPONG, 1999).

Estudos bioquímicos revelaram a presença da enzima acetilcolinesterase em várias espécies de mamíferos. Wessler et al. (1997) identificaram a atividade da enzima colina acetiltransferase e a presença de acetilcolina em glândulas pineais de rato e ambos aumentaram cerca de 10 vezes durante o período da noite.

1.3.1 Receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos

Os mAChR são receptores metabotrópicos ligados a uma proteína G e foram descritos pelo menos 5 tipos de receptores, de M_1 a M_5 . A ação que exercem depende da sua localização, assim como do tipo de proteína G a que estão acoplados. Os subtipos M_1 , M_3 e M_5 estão acoplados a proteína $G_{q/11}$ e ativam a enzima fosfolipase C, que cataliza a formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol a partir da hidrólise dos fosfatidilinositóis que fazem parte dos fosfolípidos da membrana celular. O trifosfato de inositol fixa-se a receptores específicos na membrana do retículo endoplasmático em cujo interior estão contidos depósitos intracelulares de cálcio. A ativação dos receptores do trifosfato de inositol provoca abertura de canais iônicos permeáveis ao cálcio que se movimenta do interior do retículo endoplasmático para o citosol. Os subtipos M_2 e M_4 estão acoplados a proteína $G_{i/o}$, uma proteína inibitória, que inibe a enzima adenilciclase. A síntese de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) diminui, e a atividade das quinases dependentes do AMPc também são reduzidas. A subunidade alfa-GTP e o dímero beta-gama da proteína G_i associada ao receptor M_2 podem ainda atuar diretamente sobre canais de potássio, como é o caso da membrana celular cardíaca, e provocar abertura destes canais com a consequente hiperpolarização com redução da excitabilidade cardíaca (EGLÉN, 2006).

Os nAChR são proteínas integrais de membrana e pertencem à família de canais iônicos controlados por ligante. São compostos por subunidades α e β , sendo nove subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e três subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (HERNANDEZ et al., 2004). Esses receptores desempenham um papel-chave na transmissão de sinal entre os neurônios no SNC e periférico. O subtipo $\alpha_3\beta_4$, por exemplo, é o neuronal mais expresso no sistema nervoso autônomo; os nAChRs contendo a subunidade $\alpha 3$ estão presentes em alta densidade no gânglio cervical superior, glândula pineal e adrenais. Também estão presentes na substância negra, estriado, hipocampo, *locus ceruleus*, trato habênulo-interpeduncular e cerebelo (COURT et al., 2000). Os nAChRs são classificados em duas categorias com base na sensibilidade à nicotina e à α -bungarotoxina. Uma classe requer concentrações relativamente altas de nicotina ($\sim 100 \mu M$) para sua ativação e é insensível à α -bungarotoxina, enquanto a

outra classe requer baixas concentrações de nicotina para sua ativação ($< 1 \mu\text{M}$) e é bloqueada pela α -bungarotoxina.

1.3.2 Papel da inervação colinérgica na glândula pineal

Os receptores colinérgicos muscarínicos são encontrados nas membranas dos pinealócitos e em neurônios intrapineais (PHANSUWAN-PUJITO; MØLLER; GOVITRAPONG, 1999). Phansuwan-Pujito, Lasen, Møller (1994) e Møller et al. (1997) demonstraram a presença de RNAm codificando o receptor muscarínico do subtipo 1 (M_1) por hibridização *in situ* em glândulas pineais de ratos utilizando oligonucleotídeos derivados de sequências de cDNA humanos. Outros estudos farmacológicos mostraram a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos pelo carbacol levando à ativação da fosfolipase C, gerando IP_3 , e este efeito foi antagonizado pela pirenzepina, antagonista seletivo do subtipo M_1 (LAITINEN; TORDA; SAAVEDRA, 1989).

A infusão de agonista muscarínico carbacol e oxotremorina, em ratos *in vivo*, durante o período noturno resultou em uma diminuição significativa da liberação da melatonina, e este efeito foi mediado por uma diminuição da atividade da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e da concentração de N- acetilserotonina e um aumento do nível da serotonina (DRIJFHOUT; GROL; WESTERINK, 1996). Entretanto, outros estudos com glândulas pineais de rato em cultura, estimuladas com carbacol mostraram um aumento significativo da secreção de melatonina (LAITINEN et al., 1992, 1995).

Alguns autores restringem a ação muscarínica da acetilcolina somente aos terminais pré-sinápticos, inibindo a liberação de noradrenalina das fibras nervosas simpáticas (DRIJFHOUT; GROL; WESTERINK, 1996), levando, portanto, a uma redução da síntese de melatonina (MØLLER; KORF, 1983). Há evidências indicando que os receptores muscarínicos não são exclusivamente localizados nos terminais simpáticos como o fato de que não há diminuição no número desses receptores na glândula pineal de ratos e ovelhas após a ganglionectomia cervical superior bilateral (TAYLOR; ALBUQUERQUE; BURT ALBUQUERQUE, M.L.C.; BURT, 1980).

Os receptores nicotínicos da glândula pineal de ratos pertencem ao subtipo $\alpha_3\beta_4$ (HERNANDEZ et al., 2004). São expressos na sua maioria nos pinealócitos, indicando um importante papel na regulação da função da pineal. A estimulação dos nAChRs nos pinealócitos induz uma despolarização principalmente através do influxo de sódio, causando, em seguida, a ativação dos canais para cálcio do tipo L (LETZ, 1997). O aumento do cálcio estimula a liberação exocitótica de glutamato acumulado em microvesículas nos pinealócitos.

Este quando liberado, apresenta uma ação inibitória sobre a produção da melatonina (YAMADA et al, 1996; YAMADA et al 1998).

1.4 Papel do glutamato na síntese de melatonina

1.4.1 Receptores para glutamato

Os receptores para glutamato são classificados genericamente como ionotrópicos (iGluR, ligados a um canal iônico) e metabotrópicos (mGluR, ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, via proteína G).

Os iGluRs foram subsequentemente classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em: NMDA (n-metil-D-aspartato), AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato. Os iGluR são compostos por quatro ou cinco subunidades que, agrupadas, formam um poro central com condutância seletiva para Ca^{2+} e Na^+ . O iGluR do subtipo NMDA possui sete subunidades identificadas: uma NR_1 , quatro NR_2 (A-D) e duas NR_3 (A-B). O receptor NMDA funcional é composto por ligações heteroméricas entre a subunidade essencial NR_1 e uma das quatro subunidades NR_2 (A-D), além de uma ou duas subunidades NR_3 (A-B). A expressão da subunidade NR_2 sozinha não leva à composição do canal iônico funcional, enquanto que a co-expressão de cada subunidade NR_2 com a subunidade NR_1 resulta em expressão de canais funcionais permeáveis ao Ca^{2+} em células de mamíferos (KÖHR, 2006). O iGluR subtipo AMPA 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 com o 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). Já os receptores cainato são formados por subunidades GluR 5-7 ou GluKA5-7, KA1-2 ou GluKA1-2.

Os mGluRs são compostos por oito subtipos de receptores (mGluR1-8) classificados em três grupos (I, II e III) cujas ações são exercidas através da proteína G. Os receptores do grupo I (mGluR1 e mGluR5) são acoplados a proteína Gq que ativa cascatas de segundos mensageiros (fosfolipase C, etc.) promovendo a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares. Os receptores do grupo II (mGluR2 e mGluR3) e do grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e

mGluR8) são acoplados a proteína Gi, inibindo a formação de AMPc (FERRAGUTI; SHIGEMOTO, 2006).

1.4.2. Ações do glutamato na glândula pineal

A ação do glutamato em receptores metabotrópicos do grupo II reduz a atividade da enzima adenilato ciclase, com redução do AMPc. Esta leva a uma diminuição da atividade das enzimas AANAT e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (GOVITRAPONG; EBADI, 1988; ISHIO, 1999). A interação com receptores ionotrópicos do tipo AMPA expressos em pinealócitos causa um aumento na concentração intracelular do cálcio através da ativação dos canais para cálcio do tipo L, promovendo uma maior liberação de glutamato. 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 assim como agir no próprio pinealócito responsável pela sua liberação, caracterizando, portanto uma ação glutamatérgica parácrina e autócrina na pineal (YAMADA et al., 1998). Recentemente, trabalho de nosso grupo mostrou que as ações do glutamato dependem da interação entre astrócitos e pinealócitos através da liberação de TNF- α (VILELLA, 2007).

1.5 Melatonina

A melatonina é produzida e secretada principalmente pelos pinealócitos da glândula pineal, segundo um padrão rítmico com pico secretório no período noturno. É uma indolamina de peso molecular 232,3Da, possui carácter anfifílico, podendo atravessar facilmente as membranas celulares por difusão (Figura 3). A melatonina, uma vez produzida na glândula pineal, é imediatamente secretada e pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo. A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos sendo que sua metabolização periférica se concentra especialmente no fígado. Neste processo a melatonina é convertida em 6-hidroximelatonina, que após conjugação com sulfatos ou com glucoronídeos é excretada na urina. No SNC e na própria glândula pineal a melatonina pode ser transformada em quinuraminas sob a ação da 2,3 indolamina dioxigenase. A melatonina pode atuar tanto em receptores de membrana quanto nucleares. Nos mamíferos estão bem caracterizados três tipos de receptores de membrana. Os receptores de alta afinidade, MT₁ e MT₂, pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. O terceiro tipo de receptor de membrana para melatonina em mamíferos é o MT₃, um receptor

cuja estrutura molecular é muito parecida com uma enzima, a quinona redutase, e cujas ações não estão completamente esclarecidas (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008).

Existem outros locais de síntese da melatonina, tais como retina e sistema gastrointestinal, mas acredita-se que a melatonina sintetizada nestas regiões tem maior importância na modulação de fenômenos locais (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008).

Figura 3. Estrutura molecular da melatonina

FONTE: CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008.

1.6 Controle neural da síntese de melatonina

O sistema neural envolvido no controle do metabolismo da glândula pineal origina-se no núcleo paraventricular hipotalâmico (NPVH) que de forma direta e indireta projeta-se sobre a coluna intermediolateral (CIL) da medula torácica alta e, conseqüentemente, sobre neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático. Estes neurônios se projetam para os gânglios cervicais superiores (GCS) que, através dos ramos carótídeos internos e nervos conários (NC), projetam-se para a glândula pineal. O ritmo diário da produção da melatonina é sincronizado pelo sistema neural que classicamente controla a ritmicidade circadiana, começando na retina, projetando-se através da via retino-hipotalâmica para as regiões hipotalâmicas periquiasmáticas, principalmente o núcleo supraquiasmático (NSQ), que por sua vez conecta-se com o núcleo paraventricular hipotalâmico, controlando ao longo das 24h a atividade da via responsável pela síntese de melatonina (Figura 4) (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008; ERLICH; APUZZO, 1985).

Figura 4. Representação esquemática da circuitaria de controle da síntese e secreção de melatonina pela pineal de ratos.

FONTE: Richter et al., (2004).

1.7 Bioquímica da síntese de melatonina

A glândula pineal sintetiza o hormônio melatonina no período noturno, induzida por estimulação noradrenérgica. A interação da noradrenalina com os receptores β -adrenérgicos (subtipo β_1) induz o aumento do AMPc intracelular através da ativação de uma proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilato ciclase. A ativação dos receptores α (subtipo α_{1B}) ativa uma proteína Gq ligada à estimulação da fosfolipase C, gerando fosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol. O IP_3 , atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação do cálcio desses estoques, tendo como consequência um aumento do cálcio intracelular. A rápida elevação do cálcio deve-se à liberação do retículo (SCHAAD et al., 1995) e o platô que se segue deve-se à entrada de cálcio pelos canais da membrana plasmática responsáveis pela reposição dos estoques intracelulares (os “SOCs”) (GOMPERTS; KRAMER; TATHAM, 2002; LEE et al., 2006).

O cálcio e o diacilglicerol ativam a proteína quinase C (PKC), a qual potencia o aumento do AMPc já induzido pela estimulação β -adrenérgica. Este efeito pode ocorrer pela fosforilação da adenilato ciclase ou da proteína Gs (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 (ANHOLT, 1994; TZAVARA et al., 1996).

O AMPc ativa a proteína quinase A 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 passo-limitante da síntese de melatonina, a AANAT. A presença da CREB fosforilada é muito importante também para a manutenção da atividade da AANAT, pois, quando a CREB é desfosforilada, se tem uma rápida queda na atividade da enzima (KLEIN; ROSEBOOM; COON, 1996; ROSEBOOM; KLEIN, 1995; TAMOTSU et al., 1995). A estimulação adrenérgica 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 5) (BALER; KLEIN, 1995; SPESSERT et al., 2000).

Figura 5. Bioquímica da síntese de melatonina

FONTE: modificada de Maronde, 2007

A síntese da melatonina inicia-se com a ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH), sendo o triptofano convertido em 5-hidroxitriptofano que, posteriormente, pela ação de uma descarboxilase, origina a serotonina (5-hidroxitriptamina). As concentrações de serotonina são elevadas na pineal e sua conversão em melatonina envolve duas enzimas principais: a AANAT e a HIOMT. A primeira converte a serotonina em N-acetilserotonina e a segunda transfere um grupo metil da S-adenosil-metionina para a N-acetilserotonina, originando a 5-metoxi-N-acetilriptamina, a melatonina (Figura 6) (SUGDEN, 1989).

Na glândula pineal do rato, a enzima TPH apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados no período noturno. Alguns autores atribuem esse aumento da atividade tanto à sua síntese aumentada, pela indução de transcrição gênica e síntese protéica, como à ativação da enzima por fosforilação. Além disso, demonstraram que tanto o ritmo do RNAm da TPH, como o ritmo da atividade da enzima são induzidos por estimulação noradrenérgica, através da via do AMPc e proteína quinase A (PKA) (BOADLE-BIBER, 1980; EHRET; CASH; HAMON; MAITRE, 1991; SHEIN; WURTMAN, 1971). Um trabalho mais recente, no entanto, demonstrou que não há variação do RNAm da enzima, mas somente a mesma é ativada por fosforilação dependente de PKA/AMPc (HUANG et al., 2008).

A AANAT é uma enzima instável e a manutenção de sua atividade depende de muitos fatores. Quando cessa a estimulação simpática, ou quando se submete o animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AANAT cai com uma meia vida de aproximadamente 3 min (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008). A estabilização da atividade desta enzima deve-se à presença do AMPc em níveis elevados durante todo o período noturno. A ativação da PKA pelo AMPc leva à fosforilação da enzima 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. Essa associação impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteassomal (GANGULY et al., 2001).

A atividade da HIOMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto que o seu RNA mensageiro tem um aumento de 2 vezes (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

Figura 6. Vias metabólicas da síntese e degradação da melatonina

FONTE: Cipolla-Neto; Afeche, 2008

1.8 Metilecgonidina ou Anidroecgonidina metil éster (AEME)

A metilecgonidina também chamada de anidroecgonina metil éster (AEME) é um produto da degradação térmica da cocaína quando fumada sob a forma de “crack”. A cocaína quando aquecida apresenta um ponto de fusão de 98 °C e a pressão de vapor adequada é acima de 160 °C. A ignição e combustão podem ocorrer em temperaturas muito mais elevadas, mas a degradação dos produtos de pirólise é mais comum, e começa em cerca de 170 °C. Como a cocaína se desloca da chama e esfria, o vapor se condensa formando “fumaça”, que é de fato um aerossol, onde estão associados os produtos de pirólise, sendo os principais: AEME e o ácido benzóico (WOOD et al., 1996) (Figura 7).

Estudos em ovinos e plasma humano, demonstraram que AEME é mais estável do que a cocaína e que o seu volume de distribuição aparentemente também é maior, chegando a ser mais potente do que a própria cocaína (SCHEIDWEILER et al., 2000; FANDINO; TOENNES; KAUERT, 2002).

A AEME pode ser detectada por eletroforese na urina (JACOB et al., 1990), no plasma sanguíneo (TOENNES et al., 2003), na saliva, na transpiração, nos pelos, no cérebro e no fígado (SHIMOMURA; HODG; PAUL, 2001) de fumantes de “crack”, mas não em amostras de usuários de outras vias de administração da cocaína, sendo portanto reconhecida como um marcador específico para o fumante do “crack” (JACOB et al., 1990).

O “crack” quando fumado, alcança rapidamente os pulmões, onde é absorvido, atingindo quase que imediatamente o SNC e induzindo seus efeitos estimulantes. Alguns destes efeitos são relatados como alterações comportamentais, toxicidade cardiopulmonar, hipertensão, broncoconstrição fatal, graves crises asmáticas, depressões severas e crônicas, suicídios e homicídios (HASSAN, 1996; HUANG et al., 1997).

A máxima concentração de AEME no sangue ou plasma relatada na literatura é de 110 ng/ml, enquanto que a máxima concentração urinária é 6.340 ng/ml (TOENNES et al, 2003).

Figura 7. Decomposição térmica da cocaína.

FONTE: modificada de Garcia, (2009).

A AEME é metabolizada em anidroecgonina (AE) no fígado ou degradada na urina em temperatura ambiente e em pH superior a 8 (PAUL; MCWHORTER; SMITH, 1999). Estudos *in vitro* utilizando o plasma de ovinos mostraram que a AEME é rapidamente hidrolisada a AE, e que o tempo necessário para atingir a concentração máxima no plasma é de dois minutos (SCHEIDWEILER et al., 2003).

A degradação da AEME ocorre através de dois mecanismos: hidrólise química com pH básico e hidrólise enzimática através da enzima butiril colinesterase (FANDIÑO et al., 2002). Ela é também biotransformada em anidronorecgonina metil éster (ANEME) e anidroecgonina metil éster N-óxido (AEMENO) no fígado e no pulmão. Na presença de etanol, AEME é metabolizada a anidroecgonina etil éster (AEEE) e anidronorecgonina etil éster (ANEÉE) (FANDINO; TOENNES; KAUERT, 2002) (Figura 8). Os usuários de “crack” sofrem tanto os efeitos da cocaína como os efeitos de todos os seus produtos de pirólise.

Portanto, as baixas concentrações de AEME encontradas em amostras obtidas de sangue por forense parecem em grande parte ser devido à sua rápida distribuição e seu metabolismo.

Figura 8. Produtos de biotransformação da AEME

As setas contínuas correspondem às vias cientificamente comprovadas, enquanto que as setas pontilhadas correspondem às postuladas.

FONTE: (FANDIÑO et al., 2002).

A administração intravenosa de AEME produz efeitos cardiovasculares que diferem dos da cocaína. Erzouki et al (1995) relataram que 1,0 mg de cocaína administrada por via intravenosa em coelhos anestesiados, aumentou a pressão arterial média e frequência cardíaca; no entanto, 3,0 mg de AEME também administrada via intravenosa, diminuiu significativamente a pressão arterial e a frequência cardíaca.

A inalação da AEME induz broncoconstrição em cobaias e macacos (CHEN et al., 1995). Esta broncoconstrição levou a investigação do mecanismo pelo qual a AEME poderia estar produzindo este efeito. Jacob et al. (1990) sugeriram que ela poderia estar agindo como agonista colinérgico, isso provavelmente devido a sua estrutura ser semelhante à arecolina, um agonista de receptores muscarínicos (XIE et al., 2004) e à anatoxina-a, uma

cianotoxina que atua como bloqueador muscular (WOOD et al., 2007). Vários estudos *in vitro* mostraram que AEME age como agonista muscarínico do receptor M_2 (HUANG et al., 1997; WOOLF et al., 1997; YANG et al., 2001, 2002).

Em miocárdio de furão foi observado que a AEME e a cocaína em baixas concentrações possuem um efeito ionotrópico negativo o qual foi bloqueado por metoctramina (antagonista M_2), mas não por antagonistas M_1 e M_3 , sugerindo que esse efeito ionotrópico negativo da cocaína e da AEME é provavelmente devido à estimulação de receptores muscarínicos M_2 (HUANG et al., 1997). Outro estudo utilizando uma linhagem de células pulmonares de embriões humanos (células HEL299), que expressam especificamente receptores muscarínicos M_2 , mostrou que a AEME diminui a produção de AMPc devido a ativação da proteína G_i , inibindo a adenilciclase, e aumentando a produção de GMPc devido a produção aumentada de óxido nítrico (NO) por ativação da NO sintase (NOS) (YANG et al., 2001).

Em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatais a AEME aumentou a produção de NO, a qual foi revertida com a adição de $1\mu M$ atropina (YANG et al., 2002). Isso sugere que essa produção de NO provavelmente se deva também à estimulação de receptores muscarínicos.

Huang et al. (1997) viram que a cocaína e a AEME diminuem o Ca^{2+} intracelular e a contração do miocárdio de furão de maneira dose dependente (10^{-8} - $10^{-4}M$), sendo a AEME mais potente do que a cocaína.

Receptores muscarínicos de ACh regulam importantes atividades fisiológicas, como a frequência cardíaca, contratilidade da musculatura cardíaca e lisa, secreção exócrina e endócrina, e funções neuronais. Portanto, o esclarecimento da estimulação desses receptores induzida por AEME é de grande importância para compreendermos as alterações fisiopatológicas induzidas pela mesma.

Com relação aos efeitos da AEME sobre a síntese de melatonina não há qualquer tipo de dado na literatura.

Drogas de abuso interferem com a síntese de melatonina. Sabe-se que a cocaína através da sua ação de bloqueio da recaptura pré-sináptica da noradrenalina aumenta a síntese da melatonina na glândula pineal. Estudos com explantes de glândulas pineais de ratos mostraram que $10\mu M$ de cocaína aumentaram a síntese da melatonina e a atividade da enzima AANAT. Já em cultura de glândulas mantidas por 48 horas, onde havia exclusivamente terminais pós-sinápticos, não houve efeito algum sobre a síntese da melatonina (OXENKRUG et al., 1990). Em estudo recente, foi demonstrado que o álcool

diminui a síntese de melatonina, diminui a atividade da principal enzima da via de síntese da melatonina (AANAT), diminui a expressão das enzimas TPH e AANAT, e também aumenta a expressão dos receptores para melatonina MT₁ e MT₂ do cerebelo (PERES et al., 2011).

Além disso, a glândula pineal e a melatonina parecem ter um papel importante nos efeitos de sensibilização à cocaína que acontecem com o seu uso prolongado, aumentando alguns de seus efeitos, dentre eles o déficit da atividade locomotora. Alguns trabalhos mostraram que a sensibilização à cocaína ocorre predominantemente no período claro, quando a melatonina está ausente e que, em animais pinealectomizados, a ritmicidade de sensibilização deixa de existir (KURTUNCU et al., 2004). Em camundongos knockout para os receptores MT₁ a sensibilização à cocaína ocorre tanto durante o dia como a noite, o que não ocorre em animais knockout para os receptores MT₂, indicando que o receptor MT₁ é essencial para a sensibilização diurna da cocaína (MANEV; UZ, 2006).

2 OBJETIVOS

Tendo em vista as ações da cocaína sobre a síntese de melatonina e as implicações da melatonina como protetora na resposta de sensibilização a esta droga, é interessante estudar as ações também de um produto de pirólise da cocaína quando utilizada sob a forma de “crack”, a AEME, tendo em vista que o consumo de cocaína nesta forma é bastante acentuado.

Uma evidência de que a AEME possa interferir com a síntese de melatonina deve-se à sua aparente ação colinérgica, o que poderia resultar em um efeito inibitório da síntese e secreção de melatonina.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar as ações da AEME sobre a síntese de melatonina, investigando seus efeitos *in vitro*, em preparações de cultura primária de glândulas pineais.
- Estudar as ações da AEME *in vivo*, em animais injetados ip com a AEME, avaliando o perfil noturno de síntese de melatonina.
- Avaliar possíveis alterações induzidas pela AEME sobre a atividade da enzima AANAT, *in vitro*.
- Investigar uma possível ação colinérgica ou glutamatérgica da AEME, utilizando antagonistas colinérgicos nicotínicos, muscarínicos e para os receptores de glutamato dos subtipos NMDA e AMPA, em glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina.
- Investigar as ações da AEME sobre as duas principais vias de sinalização intracelular que poderiam interferir na síntese de melatonina: o conteúdo de cálcio intracelular e o AMPc intracelular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, provenientes do Biotério do Instituto Butantan. Para a cultura de glândula pineal e estudos *in vivo* os animais tiveram peso entre 220 e 250 g. Os animais ficaram alojados em biotério com iluminação (ciclo claro-escuro de 12 h/12 h; início do claro às 7 h) e temperatura controladas (21 ± 2 °C), com alimento e água à vontade. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Síntese da AEME

Uma solução de cloridrato de cocaína foi refluxada em ácido clorídrico concentrado por 24 h. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a mistura foi diluída com água e extraída com éter dietílico para remoção do ácido benzóico. A fase aquosa foi evaporada sob vácuo até a secura. O sólido branco obtido foi então seco sob vácuo a 100 °C por 24 h (ZHANG et al., 1997). O resíduo seco foi dissolvido em metanol absoluto e adicionou-se ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi aquecida e refluxada por aproximadamente 24 h. Após este período, removeu-se o álcool sob vácuo e dissolveu-se o resíduo em uma pequena quantidade de água. A solução aquosa foi saturada com carbonato de potássio, filtrada e extraída com éter. As frações orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de magnésio, filtradas e evaporadas sob vácuo, resultando em um líquido amarelado. O produto foi purificado por destilação a pressão reduzida e identificado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

3.2.1 Preparação da AEME

A AEME utilizada para este estudo foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sendo a cocaína utilizada para a síntese dessa droga proveniente do Núcleo de Exames de Entorpecentes do Instituto de Criminalística de São Paulo.

A AEME foi cedida em forma pastosa, pesada e dissolvida em HCl para uma concentração de 10^{-2} M, sendo armazenada em tubos de microcentrífuga e conservada durante

30 dias em congelador a -80°C . Para os experimentos utilizou-se esta AEME estocada, sendo diluída em água Milli-Q para as concentrações de $1\text{ }\mu\text{M}$ e $100\text{ }\mu\text{M}$.

Nos estudos *in vivo* a AEME foi dissolvida em solução de NaCl 0,9% e estocada em geladeira. Foram injetados por via intraperitoneal $100\text{ }\mu\text{l}$ desta solução de concentração $2,8\text{ mg/ml}$, resultando em doses de $1,12\text{ mg/kg}$ de peso/dia.

3.3 Cultura de glândula pineal

Os animais foram sacrificados por decapitação, sempre às 10 h, e as glândulas pineais foram retiradas e colocadas em meio de cultura BGJb modificado (Fitton-Jackson Modification, Gibco, Grand Island, NY, USA) 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 $200\text{ }\mu\text{l}$ de meio de cultura e um disco de nylon de 4 mm sobre o qual as glândulas foram colocadas. Utilizou-se o meio BGJb com BSA (1 mg/ml) e vermelho de fenol acrescido de glutamina (2 mM), ácido ascórbico ($0,1\text{ mg/ml}$) e penicilina (100 U/ml) -estreptomicina ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) (PARFITT; WELLER; KLEIN, 1976).

As placas foram acondicionadas em uma câmara incubadora modular, a qual foi preenchida com carbogênio ($95\%\text{ O}_2$ e $5\%\text{ CO}_2$) por 5 minutos, saturada de umidade e colocada em estufa de CO_2 a 37°C .

As glândulas foram mantidas em cultura por 48 h, sendo transferidas para uma nova placa, com meio fresco, a cada 24 h. A manutenção das glândulas em cultura por 48 h teve como objetivo permitir a completa degeneração dos terminais nervosos e a obtenção, portanto, de uma preparação exclusivamente pós-sináptica (PARFITT; WELLER; KLEIN, 1976). No terceiro dia, após permanecerem 1 h em meio fresco, as glândulas foram submetidas aos diversos tratamentos farmacológicos por 5 h. Após esse período as glândulas foram coletadas e armazenadas em congelador a -80°C até a realização das dosagens

3.4 Dissociação da glândula pineal

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

Glândulas pineais foram isoladas e colocadas em meio de cultura DMEM, em gelo. Em seguida, as glândulas foram lavadas com solução de Hanks e picotadas de modo a obter pedaços menores de tecido. O material foi então transferido para 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. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 300 g (Eppendorf 5410C, Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY, USA), por 5 minutos, em uma temperatura de 20 °C. 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 300 g, por 6 minutos. As células foram ressuspensionadas em meio DMEM (Sigma; glicose: 1000 mg/l, HEPES: 5.958g, bicarbonato de sódio: 3,7 g, antibióticos 1%) + 10% soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota de 10 µl foi retirada e corada com o corante azul de Tripán (concentração de 1% em PBS) para que se pudesse avaliar a viabilidade celular. Quinze 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.

3.5 Grupos experimentais

Foram realizados os seguintes grupos experimentais para dosagem da melatonina, análise do cálcio, do AMPc ou quantificação da atividade da enzima AANAT. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes (n=3), com 6-10 glândulas por grupo.

3.5.1. Efeito da AEME em diferentes concentrações sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura

- a) Grupo Controle: glândulas pineais estimuladas com Noradrenalina (Nor) 1 µM;
- b) Grupo Nor 1µM + AEME 1µM agudo: glândulas pineais incubadas por 30 min com AEME previamente à estimulação com Nor.

c) Grupo Nor 1 μ M + AEME 100 μ M agudo: idem ao anterior com AEME 100 μ M.

d) Grupo Nor 1 μ M + AEME 100 μ M crônico: glândulas pineais incubadas por 48 h com AEME previamente à estimulação com Nor.

3.5.2. Avaliação da viabilidade celular e fragmentação do DNA sob a ação da AEME:

a) Grupo Controle: glândulas pineais estimuladas com Nor 1 μ M;

b) Grupo Nor 1 μ M + AEME 1 μ M agudo.

c) Grupo Nor 1 μ M + AEME 100 μ M agudo.

3.5.3. Análise de efeito colinérgico muscarínico da AEME sobre a síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura:

a) Grupo Controle: glândulas pineais estimuladas com Nor 1 μ M;

b) Grupo Nor 1 μ M + AEME 1 μ M agudo.

c) Grupo Nor 1 μ M + AEME 1 μ M + atropina 1 μ M, 10 μ M ou 50 μ M: glândulas pineais incubadas com atropina (antagonista muscarínico) e, em seguida, com o AEME por 30 min, previamente à estimulação com Nor.

3.5.4. Análise do efeito colinérgico nicotínico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura:

a) Grupo Controle: glândulas pineais estimuladas com Nor 1 μ M;

b) Grupo Nor 1 μ M + TMPH 10 μ M (Hicrocloreto de 4-yl heptanoato de 2,2,6,6,tetrametilpiperidina) (Tocris Bioscience, Missouri, USA) (antagonista de receptores colinérgicos nicotínicos do tipo $\alpha 3\beta 4$): glândulas incubadas com TMPH e após 30 min estimuladas com Nor.

c) Grupo Nor 1 μ M + AEME 1 μ M agudo.

d) Grupo Nor 1 μ M + AEME 1 μ M + TMPH 10 μ M: glândulas pineais incubadas com TMPH e, em seguida, com o AEME por 30 min, previamente à estimulação com Nor.

3.5.5. Análise do efeito glutamatérgico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura :

a) Grupo Controle: as glândulas pineais foram estimuladas com Nor 1 μ M;

b) Grupo Nor 1 μ M + AEME 1 μ M agudo.

c) Grupo Nor 1 μM + AEME 1 μM + MK801 (100 μM) ou NBQX (50 μM): glândulas pineais incubadas com MK801 (antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA) ou NBQX (antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA) e, em seguida, com o AEME por 30 min, previamente à estimulação com Nor.

3.5.6. Efeito da AEME em diferentes concentrações sobre a atividade da enzima AANAT em glândulas pineais em cultura:

- a) Grupo Controle: as glândulas pineais foram estimuladas com Noradrenalina (Nor) 1 μM ;
- b) Grupo Nor 1 μM + AEME 1 μM agudo.
- c) Grupo Nor 1 μM + AEME 100 μM agudo.
- d) Grupo Nor 1 μM + AEME 100 μM crônico.

3.5.7. Avaliação do efeito da AEME sobre o cálcio intracelular

- a) Grupo Controle: os pinealócitos foram estimulados com Noradrenalina (Nor) 1 μM ;
- b) Grupo AEME: os pinealócitos foram estimulados com AEME 1 μM .

3.5.8. Avaliação do efeito da AEME sobre o AMPc

- a) Grupo Controle: glândulas sem estimulação;
- b) Grupo AEME: as glândulas foram incubadas com AEME 1 μM ;
- c) Grupo Nor: glândulas incubadas com Nor 1 μM ;
- d) Grupo Nor 1 μM + AEME 1 μM agudo: glândulas pineais incubadas por 30 min com a AEME previamente à estimulação com Nor.

3.6 Síntese de melatonina em glândulas pineais em cultura- estudos *in vivo*.

Nos experimentos *in vivo*, os animais foram alojados em biotério com ciclo invertido (12 h/12 h), sendo o início do escuro às 8 h. Permaneceram por 1 mês para completa adaptação e, após este período, os animais foram injetados com a AEME (2,8 mg/ml; 1,12 mg/kg) por via intraperitoneal (100 µl) durante 10 dias consecutivos, e as injeções foram administradas no final do período de claro. Os animais controle foram injetados nos mesmos horários somente com o veículo (solução salina 0,9%).

Após os tratamentos, os animais foram sacrificados durante o período escuro, sob luz vermelha a cada 2 h30 min, sendo 6 animais por grupo experimental, por horário. Os horários formam expressos como “zeitgeber time” (ZT), sendo o ZT 12 a transição do claro para o escuro e o ZT 0 a transição do escuro para o claro. Os horários analisados foram: ZT 12, ZT 14,5, ZT 17, ZT 19,5, ZT 22, ZT 24. As glândulas pineais foram coletadas e armazenadas em congelador a -80 °C até as dosagens de melatonina.

3.7 Dosagem da melatonina nas glândulas pineais em HPLC

A concentração de melatonina foi avaliada utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC Waters, Milford, Mass., USA). O sistema cromatográfico é composto por uma bomba Waters 510 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 Millenium através de uma interface programável (Waters System Interface Module).

As glândulas foram sonicadas (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) individualmente em 120 µl de uma solução de ácido perclórico 0,1 M, EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%. Em seguida, foram centrifugadas por 2 min a 12.000 rpm (Eppendorf 5410C, Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY, USA). Do sobrenadante, 40 µl foram injetados no sistema de cromatografia (injetor mod. 7125, com *loop* de 20 µl, Rheodyne Inc., Ca., USA). 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 5 min de duração.

As soluções-estoque dos padrões (1 mM) foram preparadas em solução de HCl 0,1 M acrescida de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, aliquotadas em tubos de microcentrífuga e mantidas em congelador a -85 °C. Na ocasião de sua utilização uma alíquota do padrão de melatonina foi descongelada e diluída em solução de ácido perclórico 0,1 M acrescido de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02% para obtenção das concentrações desejadas. Todos os reagentes utilizados tiveram grau de pureza adequado para HPLC.

Curvas de calibração com 5 concentrações diferentes e conhecidas (0,58 a 4,64 ng/20 µl) foram utilizadas para a quantificação da melatonina presente nas amostras. As curvas de calibração foram obtidas através do programa Millenium 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 dos padrões conhecidos e a quantificação foi realizada pelo mesmo programa computacional.

3.8 Medição radiométrica da atividade da AANAT

O método baseia-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 é extraído em clorofórmio e medida a radioatividade (método desenvolvido por PARFITT et al., 1975, modificado a partir do método de DEGUCHI; AXELROD, 1972).

Para isso, foram adicionados aos tubos de microcentrífuga contendo a amostra 25 µl de triptamina (40 mM), 25 µl de [³H] acetilCoA (2 mM) e 50 µl de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH = 6,8), a 4 °C. As células foram sonicadas aplicando-se 1 pulso de 30s, de modo a romper os tecidos. As amostras foram incubadas a 37 °C por 20 min. Em seguida, foi acrescentado 1 ml de clorofórmio a cada uma das amostras e o produto extraído agitando-se os tubos durante 1 min. Para a separação completa das fases as amostras foram centrifugadas por 20 s a 14000 rpm. As fases aquosas foram removidas por sucção e acrescentados 200 µl do tampão. Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas e as fases aquosas removidas. 500 µl 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 (Optiphase Hisafe-Perkinelmer) foi então acrescentado e medida a radioatividade em contador de radiação β (Beckman-LS 6500).

3.9 Avaliação da viabilidade celular e fragmentação do DNA por Citometria de Fluxo

Para avaliar os efeitos da AEME na viabilidade celular e na fragmentação do DNA em uma situação semelhante àquela em que foi avaliada a melatonina, as glândulas após a incubação de 5h tiveram suas células dissociadas pelo método de digestão proteolítica com papaína e analisadas no citômetro FACScan (Becton and Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Para análise da integridade da membrana celular (viabilidade), adicionou-se às amostras 300 µl de tampão salina (PBS) e 50 µl da solução de iodeto de propídeo (2 µg/ml). As mesmas foram agitadas suavemente e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. A leitura no citômetro realizou-se imediatamente após a incubação (585/42 nm).

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 2 µg/ml de iodeto de propídeo) nas amostras que foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura foi realizada imediatamente após o término da incubação (585/42 nm).

3.10 Avaliação do cálcio intracelular por microscopia confocal

Após a dissociação celular da glândula pineal e cultura das células em garrafas de cultura retirou-se todo o meio da garrafa e centrifugou-se a 300 g por 5 min a 20 °C, ressuspendendo-se o precipitado em meio DMEM, para obter-se uma concentração de 5×10^5 células/ml. A separação dos pinealócitos se dá porque os astrócitos aderem ao fundo das garrafas de cultura, sendo as células em suspensão no meio de cultura predominantemente pinealócitos.

Transferiu-se para um tubo de microcentrífuga o volume de 1ml de células, que foram tratadas com fluo 4 na concentração de 16 nM (dissolvido em DMSO seco, 5µl). As células foram levadas ao banho-maria por 1 h, a 37 °C. Deve-se salientar que todos os procedimentos que tenham envolvido o uso do Fluo 4 foram realizados na ausência de luz, pelo fato de este ser fotossensível.

As placas próprias para microscopia confocal foram tratadas com 200 µl de poli-l-lisina (0,01%), deixando-se por 1 h. Passado esse período, retirou-se o excesso de poli-l-lisina, deixando-se apenas uma fina camada.

Após o tratamento com Fluo 4, os pinealócitos foram centrifugados a 300 g por 5 min a 20 °C, e em seguida ressuspensos em 1 ml de meio DMEM (sem adição de SFB.) por três vezes, para lavar as células e tirar toda a fluorescência do meio, sendo que na terceira vez, ressuspendeu-se os pinealócitos em 1ml de DMEM, adicionando 200 µl em cada placa tratada com poli-l-lisina. Aguardou-se cerca de 5 min para adesão das células à placa, e os pinealócitos foram analisados em 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 505 nm para excitação com laser de argônio e de 530 nm para a emissão. Os gráficos para análise dos resultados foram montados com o programa Origin 5.0.

3.11 Dosagem de AMPc por ensaio imunoenzimático

O AMPc foi quantificado pela técnica de ensaio imunoenzimático (EIA) utilizando o kit comercial (Biovision Incorporated). As dosagens foram realizadas após a estimulação das glândulas pineais, em cultura, por 15 minutos (ver cultura de glândula pineal).

As glândulas foram individualmente acondicionadas em microtubos contendo 100 µL de HCl (0,1 M), imediatamente congeladas em gelo seco e mantidas em congelador -80 °C até o momento das dosagens.

As glândulas, mantidas em gelo, foram sonicadas com 3 pulsos de 10 segundos, centrifugadas a 500 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos onde as amostras foram preparadas para o plaqueamento em placa de 96 poços revestidas com proteína G recombinante, que ancoram anticorpo policlonal anti AMPc dando início à competição entre o conjugado AMPc-HRP (proveniente do kit) com o AMPc da amostra pelo anticorpo presente na placa. Após incubação e lavagem a quantidade de AMPc-pode ser estimada após leitura em espectrofotômetro (Biotek - Power Wave XS2) em comprimento de onda de 450 nm. A intensidade da densidade óptica a 450 nm é inversamente proporcional à concentração de AMPc na amostra e a determinação da quantidade de AMPc em pmol/glândula foi obtida realizando-se uma curva com padrões de concentrações conhecidas.

3.12 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias e erros padrões. Nas dosagens do conteúdo intracelular da melatonina, os dados foram expressos em ng/glândula e a atividade da enzima AANAT foi expressa em pmol do produto formado por glândula em 1 hora. Para a comparação estatística entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Para mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), unifatorial ou bi-fatorial, seguida do teste de Bonferroni, para comparações entre todos os grupos, ou do teste de Dunnett, para comparações com o grupo controle (GraphPad Prism 5).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da AEME sobre a produção de melatonina pela glândula pineal em cultura.

As glândulas pineais foram estimuladas com noradrenalina na concentração de 1 μ M, associadamente a AEME nas concentrações de 1 μ M agudo e 100 μ M agudo (colocados 30 minutos antes da incubação com noradrenalina), ou 100 μ M crônico (que permaneceu por 48h antes da estimulação com noradrenalina). Pode-se observar que a AEME diminuiu a síntese da melatonina em todas as concentrações utilizadas, tanto no tratamento agudo quanto no crônico (ANOVA: $p=0,0026$; Dunnett: $p<0,05$, em relação ao grupo controle) (Figura 9).

Figura 9. Efeito da AEME sobre a síntese de melatonina

Conteúdo de melatonina das glândulas pineais quando estimuladas com noradrenalina 1 μ M (Nor) ou Nor associadamente ao AEME 1 μ M agudo, 100 μ M agudo ou 100 μ M crônico. ANOVA: $p<0,05$; Dunnett: * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle. Foram realizadas 3 repetições de experimentos com $n=8$ por grupo.

FONTE:(MESQUITA, 2011).

4.2 Avaliação da viabilidade celular e fragmentação do DNA

Para avaliar se a AEME induz morte celular, as glândulas pineais em cultura foram estimuladas com noradrenalina 1 μ M ou Nor associadamente a AEME 1 μ M ou 100 μ M, por 5 h, da mesma forma que os outros experimentos que envolveram os estudos em cultura com a AEME. Pôde-se constatar que o AEME não alterou a viabilidade celular, avaliada pela integridade da membrana celular, e nem tampouco a fragmentação do DNA, para as duas concentrações de AEME estudadas (Figura 10).

Figura 10. Viabilidade celular e fragmentação de DNA

Análise da viabilidade celular e fragmentação do DNA de glândulas pineais em cultura quando estimuladas com noradrenalina 1 μ M (Nor) ou noradrenalina associada ao AEME 1 μ M ou AEME 100 μ M. ANOVA: $p > 0,05$, $n = 3$ por grupo.

FONTE: (MESQUITA, 2011).

4.3 Análise da atividade da enzima AANAT

Para melhor esclarecer as mudanças ocorridas na glândula pineal ocasionadas pela AEME, que levaram a uma queda significativa da produção de melatonina, analisou-se a atividade da principal enzima da via de síntese da melatonina, a AANAT. Os resultados mostraram que a AEME não diminui a atividade da enzima AANAT, pois não houve diferença significativa na atividade desta enzima em nenhuma das concentrações utilizadas da AEME (1 e 100 μ M agudos e 100 μ M crônico), em relação ao controle (ANOVA: $p>0,05$) (Figura 11).

Figura 11. Atividade da enzima AANAT

Análise da atividade da enzima AANAT de glândulas pineais em cultura estimuladas com noradrenalina 1 μ M (Nor) ou associadamente ao AEME 1 μ M, 100 μ M (agudos) e 100 μ M crônico. ANOVA: $p>0,05$. Foram realizadas 3 repetições de experimentos com $n=8$ por grupo.

FONTE: (MESQUITA, 2011).

4.4 Análise do efeito colinérgico muscarínico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura.

Neste experimento pode-se verificar a diminuição significativa da melatonina no grupo AEME 1 μ M, confirmando experimentos anteriores (ANOVA: $p=0,0140$; Bonferroni: $p<0,01$). A adição de 1, 10 ou 50 μ M de atropina, antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, reverteu a inibição induzida pela AEME sobre a síntese de melatonina (ANOVA $p<0,01$, Bonferroni: $p<0,05$) (Figura 12). Isto indica que a AEME atua sobre receptores colinérgicos muscarínicos pós-sinápticos para exercer seus efeitos, uma vez que essa preparação não possui os terminais adrenérgicos, pois estes degeneram após 48h da glândula em cultura.

Figura 12. Efeito colinérgico muscarínico da AEME

Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura quando estimuladas com noradrenalina 1 μ M (Nor), noradrenalina associada ao AEME 1 μ M, ou ao AEME 1 μ M + Atropina 1, 10 ou 50 μ M (Atrop). ANOVA: $p<0,01$; Bonferroni: *** $p<0,001$ em relação ao grupo Nor; # $p<0,05$ em relação ao grupo Nor+AEME. Foram realizadas 3 repetições de experimentos com $n=8$ por grupo.

FONTE: (MESQUITA, 2011).

4.5 Análise do efeito colinérgico nicotínico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura

O antagonista seletivo para os receptores nicotínicos do subtipo $\alpha 3\beta 4$ (TMPH), que é o tipo descrito na glândula pineal de ratos, não reverteu o efeito da AEME de redução da síntese de melatonina, mostrando que a AEME não atua sobre este tipo de receptor para exercer o seu efeito (ANOVA: $p < 0,05$; Bonferroni: $p < 0,05$ entre Nor e Nor+AEME) (Figura 13).

Figura 13. Efeito colinérgico nicotínico da AEME

Conteúdo de melatonina de glândulas pineais em cultura quando estimuladas com Nor 1µM, Nor associada ao AEME 1 µM ou ao TMPH 10 µM, ou ao AEME 1 µM + TMPH 10µM. ANOVA: $p < 0,05$; Bonferroni: $*p < 0,05$ em relação ao grupo Nor. Foram realizadas 3 repetições de experimentos com $n=8$ por grupo.

FONTE: (MESQUITA, 2011).

4.6 Análise do efeito glutamatérgico da AEME sobre a síntese da melatonina de glândulas pineais em cultura

Os antagonistas seletivos para os receptores glutamatérgicos dos tipos NMDA (MK801) 100 μ M e AMPA (NBQX) 50 μ M não reverteram o efeito do AEME de redução da síntese de melatonina, mostrando que a AEME não atua sobre estes dois tipos de receptores para exercer o seu efeito (ANOVA: $p < 0,05$; Bonferroni: $p < 0,05$ entre grupos Nor e Nor+AEME) (Figura 14).

Figura 14. Efeito glutamatérgico da AEME

Quantificação da melatonina de glândulas pineais em cultura quando estimuladas com noradrenalina 1 μ M (Nor), noradrenalina associada ao AEME 1 μ M, ou ao AEME 1 μ M + MK801(100 μ M) ou NBQX (50 μ M). ANOVA: $p < 0,05$; Bonferroni: * $p < 0,05$ em relação ao grupo Nor. Foram realizadas 3 repetições de experimentos com $n=8$ por grupo.

FONTE: (MESQUITA, 2011).

4.7 Análise da produção de melatonina pela glândula pineal – estudos *in vivo*.

Nos experimentos *in vivo*, observou-se uma diminuição na síntese da melatonina no início e no final do período escuro, sendo estatisticamente significativa para o ZT 22 (ANOVA bifatorial: tratamento: $p < 0,01$; ZT: $p < 0,001$; interação: $p < 0,05$; Bonferroni: ZT22: $p < 0,01$) (Figura 15). Esses dados confirmaram a redução da melatonina induzida pela AEME já observada nos experimentos *in vitro*, ainda que o efeito tenha se restringido ao ZT 22.

Figura 15. Efeito da AEME- estudos *in vivo*

Concentração da melatonina das glândulas pineais extraídas de animais ao longo do período noturno, após injeções ip de AEME (2,8 mg/ml) por 10 dias sucessivos. A- Gráfico de barras somente do período noturno; B- Curvas para os grupos controle e AEME, durante o período de escuro (sombreado de cinza). Bonferroni: * $p < 0,05$

FONTE: (MESQUITA, 2011)

4.8 Análise do efeito da AEME sobre o AMPc intracelular

A AEME não alterou o conteúdo do AMPc, indicando que a AEME não causa alterações nesta via de sinalização celular para exercer seu efeito sobre a síntese de melatonina na glândula pineal (ANOVA: $p < 0,05$; Bonferroni: $p < 0,01$, entre Nor, Nor+AEME x controle, AEME) (Figura 16).

Figura 16. Efeito da AEME sobre o AMPc intracelular

Análise do conteúdo de AMPc nas glândulas pineais em cultura quando estimuladas com Nor 1µM, AEME 1µM e associados Nor 1 µM ao AEME 1 µM. ANOVA: $p < 0,05$; *Bonferroni: $p < 0,01$ (Nor, Nor+AEME x controle, AEME). Foram realizadas 3 repetições de experimentos com $n=8$ por grupo

FONTE: (MESQUITA, 2011).

4.9 Análise do efeito da AEME sobre o cálcio.

A AEME causou um aumento significativo no conteúdo do cálcio intracelular observado por microscopia confocal na concentração de 1 μ M (Figura 17 B). A noradrenalina foi utilizada como controle positivo, pois se sabe que esta induz o aumento do cálcio intracelular (Figura 17 A).

Figura 17. Efeito da AEME sobre o Cálcio

(A)

Média do Ratio de Fluorescência: $10,667 \pm 1,19$

(B)

Média do Ratio de Fluorescência: $4,091 \pm 0,343$

Aumento do cálcio intracelular em pinealócitos isolados estimulados com: (A) noradrenalina (1 μ M) (controle positivo) ou (B) AEME 1 μ M. As porcentagens de células que responderam foram: (A): 80% (n=38); (B): 84% (n=18).

FONTE: (MESQUITA, 2011)

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados mostraram uma diminuição na síntese da melatonina induzida pela AEME, tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro* os efeitos da AEME ocorreram para as duas concentrações utilizadas de 1 μ M e 100 μ M, tanto na incubação aguda como na incubação crônica.

Inicialmente analisou-se a viabilidade celular e fragmentação do DNA quando as glândulas pineais foram incubadas com as concentrações utilizadas de AEME (1 μ M e 100 μ M) por 5 h, período de análise das ações da AEME. Observou-se que a AEME não alterou a viabilidade celular, avaliada pela integridade da membrana celular, e nem a fragmentação do DNA, para as duas concentrações de AEME estudadas. Em um trabalho recente, foi investigada a viabilidade celular através do teste do MTT (brometo de tetrazólio) em neurônios hipocâmpais em cultura expostos à AEME por 24 h (GARCIA, 2009). Neste estudo, mostrou-se que a AEME reduziu a viabilidade celular quando utilizada em concentrações superiores a 100 μ M. O mesmo trabalho mostrou que em períodos de incubação inferiores a 24 h, como 3 h e 6 h, não houve redução da viabilidade celular. Assim, os nossos resultados corroboram os dados deste trabalho, mostrando que a AEME não induziu morte celular nas concentrações de 1 μ M e 100 μ M por um período de incubação de 5 h, e que ambas as concentrações induziram um efeito de redução da síntese de melatonina. Nos experimentos subseqüentes de caracterização de mecanismos de ação optou-se por utilizar a menor concentração, de 1 μ M, salvo algumas exceções em que se utilizaram ambas as concentrações.

Para avaliar se o efeito da AEME poderia ocorrer sobre a atividade da principal enzima da via de síntese de melatonina, a AANAT, glândulas pineais em cultura foram incubadas com AEME (1 μ M e 100 μ M, tratamentos agudo e crônico) e estimuladas com noradrenalina. Observou-se que a AEME não alterou a atividade desta enzima em qualquer das concentrações utilizadas, indicando, portanto, que a AEME age por outros mecanismos, não interferindo com a atividade desta enzima que é passo-limitante para a síntese da melatonina. A enzima AANAT, no rato, é ativada somente à noite pela noradrenalina, dependendo para sua ativação de transcrição e tradução gênicas (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008). Apesar do papel fundamental desta enzima no processo de síntese noturna de melatonina, não foi detectada alteração em sua atividade pela AEME. É possível, então, que a redução da síntese de melatonina se deva a alterações na atividade de outras enzimas que fazem parte da via de síntese da melatonina, como a TPH ou a HIOMT. A TPH é a

enzima passo-limitante para a síntese de serotonina que ocorre durante todo o dia e que é o substrato da enzima AANAT. A enzima HIOMT transforma N-acetilserotonina em melatonina, sendo a última enzima da via de síntese da melatonina (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

Scheidweiler et al (2003) demonstraram que a AEME induz uma rápida hipotensão que é competitivamente antagonizada pela atropina, apoiando a hipótese de que a AEME pode agir como um agonista muscarínico. Da mesma forma, a AEME produz efeitos semelhantes a outro agonista muscarínico, a metacolina, quando injetada i.v. em ovelhas, que causa uma diminuição da pressão arterial média, e que pode ser antagonizada com a atropina. Esta resposta hipotensiva pode ser devida à estimulação de receptores M_3 no endotélio vascular, o que poderia estimular a síntase do óxido nítrico (NOS) para produzir o óxido nítrico, e assim, relaxar o músculo liso subjacente. De fato, foi relatado por Yang et al (2002), que a AEME aumenta a produção de NO em cultura neonatal de cardiomiócitos de ratos. Este aumento foi abolido pela adição do antagonista de receptor muscarínico, demonstrando uma provável estimulação dos receptores muscarínicos. É possível que esta estimulação de NOS leve à produção de espécies reativas de oxigênio que desempenham um papel na toxicidade cardiovascular resultante do uso de “crack”. A AEME poderia também estar estimulando os receptores M_2 , diminuindo desta forma a força contrátil cardíaca, através da inibição da adenilato ciclase e estimulação da guanilato ciclase, produzindo assim uma queda da pressão arterial (SCHEIDWEILER, 2003). *In vitro*, a AEME age como um relaxante do músculo liso das vias aéreas (HASSAN, WOOD, 1995). Em contrações induzidas pela ACh, carbacol e histamina em anéis isolados de traquéias de cobaias, a AEME exibe um aparente antagonismo não-competitivo da contração. O principal subtipo de receptor muscarínico na traquéia é o M_3 (CHEN et al., 1995). Outro dado que reforça a ação da AEME em receptores muscarínicos é a sua semelhança estrutural com a de um agonista colinérgico, a arecolina, substância extraída da árvore Areca (JACOB et al., 1990).

Tendo em vista esses dados sobre a AEME, de uma provável ação colinérgica muscarínica e sabendo-se que a glândula pineal de ratos possui receptores colinérgicos tanto nicotínicos quanto muscarínicos, investigou-se as possíveis ações da AEME sobre o sistema colinérgico, tanto muscarínico quanto nicotínico, utilizando os antagonistas atropina (muscarínico) e TMPH (nicotínico para o subtipo $\alpha_3\beta_4$).

O receptor muscarínico descrito na glândula pineal é o receptor do subtipo M_1 , que está ligado à proteína Gq e geração de IP_3 , com aumento do cálcio intracelular (LAITINEN; TORDA; SAAVEDRA, 1989 a, b; PHANSUWAN-PUJITO; LARSEN; MØLLER, 1994). O

receptor do subtipo M_1 é também o mais abundante no sistema nervoso central, localizando-se na pré-sinapse, sendo bastante expresso no córtex e hipocampo, em particular (LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008). Verificou-se que a síntese da melatonina em cultura, estimulada por noradrenalina na presença de $1\mu M$ de AEME associadamente a 1, 10 ou $50\mu M$ de atropina apresentou valores semelhantes ao grupo estimulado somente com noradrenalina (grupo controle), mostrando desta forma que a atropina reverteu o efeito da AEME. Assim, a resposta das glândulas pineais à AEME de redução da síntese da melatonina resulta de uma ação colinérgica muscarínica. Como se utilizaram as glândulas pineais mantidas em cultura por 48 horas, este efeito deve ser mediado por receptores muscarínicos pós-sinápticos presentes nos pinealócitos, uma vez que no período de 48 horas em cultura os terminais nervosos já estão completamente degenerados. Esse dado, além de mostrar o efeito colinérgico muscarínico da AEME, aponta para um papel inibitório dos receptores muscarínicos sobre a síntese de melatonina da glândula pineal de ratos. Esses dados confirmam resultados obtidos por Dati (2011) (comunicação pessoal) de estudo dos mecanismos de ação da AEME em neurônios hipocámpais em cultura. A AEME induziu morte celular nessas células (em concentrações mais elevadas do que as que foram usadas no presente trabalho) que é antagonizada pela atropina, mostrando o mesmo efeito muscarínico desta droga. Além disso, ocorre também um aumento de IP_3 , apontando para uma ação em receptores muscarínicos ligados à fosfolipase C, como é o caso dos subtipos M_1 , M_3 ou M_5 .

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) na glândula pineal de ratos possuem um efeito inibitório sobre a síntese da melatonina. A ação colinérgica dos nAChRs em pinealócitos isolados de ratos induz a despolarização da membrana dos pinealócitos ativando os canais para cálcio do tipo L (LETZ et al., 1997). Este processo resulta na liberação do glutamato que está estocado nas microvesículas presentes nos pinealócitos, e este glutamato, quando liberado, pode atuar em receptores presentes tanto no próprio pinealócito responsável por sua liberação, ou em pinealócitos vizinhos, caracterizando assim, as ações parácrinas e autócrinas do glutamato na glândula pineal (YAMADA et al, 1996; YAMADA et al 1998). O glutamato inibe a síntese de melatonina inibindo a atividade das enzimas AANAT e HIOMT (GOVITRAPONG; EBADI, 1988; ISHIO et al., 1999).

Os efeitos da AEME sobre a síntese de melatonina parecem não envolver esses receptores nicotínicos, pois o antagonista seletivo de receptores nicotínicos subtipo $\alpha_3\beta_4$ (TMPH), que é o único presente na glândula pineal de ratos descrito na literatura, não antagonizou o efeito da AEME. Apesar de a grande maioria dos receptores de ACh expressos

nos pinealócitos de ratos serem os nAChRs (SCHOMERUS; LAEDTKE; KORF, 1995), estes não participam nos efeitos da AEME de induzir a redução da síntese de melatonina.

Yamada et al (1998) demonstraram que a inibição da síntese de melatonina pelo glutamato é mediada pela ativação do receptor metabotrópico do grupo II, mGluR3, presente nos pinealócitos. Já Yatsushiro et al. (2000) demonstraram que é o receptor ionotrópico do tipo AMPA dos pinealócitos, que é o responsável pelo aumento da concentração intracelular de cálcio na célula, potencializa o sinal colinérgico na glândula pineal, sugerindo ser o AMPA o responsável pela inibição da síntese de melatonina pelo glutamato. Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram que o AMPA possui um papel importante no efeito inibitório do glutamato sobre a síntese de melatonina (VILELLA, 2007), assim como o receptor NMDA (dados não publicados).

Para avaliar os efeitos da AEME sobre os receptores glutamatérgicos, utilizaram-se os antagonistas para receptores de glutamato dos subtipos NMDA e AMPA (MK-801 e NBQX, respectivamente). Esses antagonistas não reverteram o efeito da AEME de inibição da síntese de melatonina, descartando uma possível ação da AEME sobre estes receptores de glutamato presentes na glândula pineal de ratos. Este dado reforça os resultados de ausência de ação da AEME sobre o sistema colinérgico nicotínico, uma vez que ambos os sistemas estão interligados, sendo o estímulo nicotínico o indutor da liberação de glutamato.

Visando entender melhor os efeitos da AEME sobre a síntese de melatonina, investigou-se seus efeitos *in vivo*, sobre o perfil noturno da síntese de melatonina, em ratos injetados durante 10 dias consecutivos. A injeção por 10 dias teve como objetivo reproduzir os possíveis efeitos observados em consumidores do “crack”. Os estudos *in vivo* mostraram uma diminuição significativa da melatonina no ZT 22 e redução no ZT 17, mas neste último não estatisticamente significativa. Assim, também *in vivo* o AEME reduziu a síntese de melatonina na glândula pineal de ratos, confirmando estudos *in vitro*.

Para inferir sobre os segundos mensageiros envolvidos nas ações da AEME sobre a síntese de melatonina, investigou-se o AMPc e o cálcio intracelulares. Estes dois segundos mensageiros são fundamentais para a ativação da enzima AANAT. A ativação de receptores β -adrenérgicos, ligados à proteína G e à enzima adenilato ciclase, leva ao aumento do AMPc intracelular. Este por sua vez, ativa a quinase A, que fosforila o fator de transcrição CREB, levando à transcrição e tradução gênicas da enzima AANAT. Já, a ativação do receptor α -adrenérgico está ligada à fosfolipase C, com a geração de IP₃ e aumento do cálcio intracelular (AFECHÉ et al, 2008).

Verificou-se que a AEME não interferiu com a via do AMPc. Como mencionado acima, o AMPc é o segundo mensageiro mais importante para deflagrar a transcrição e manter a atividade da enzima AANAT (AFECHÉ et al, 2008). Mas, ele também tem um papel na ativação da enzima TPH (BOADLE-BIBER, 1980; EHRET; PEVET; MAITRE, 1991; HUANG et al., 2008; SHEIN; WURTMAN, 1971), a qual poderia sofrer influência da AEME.

Com relação ao cálcio intracelular, observou-se um aumento induzido pela AEME. O uso de noradrenalina como controle positivo na análise do cálcio mostrou a integridade das células analisadas. Como discutido acima, o cálcio pela via α -adrenérgica, pode ser um ativador da enzima AANAT (AFECHÉ et al, 2008). Mas, pode ser também um segundo mensageiro vinculado a alguns subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (M_1 , M_3 , M_5), os quais são inibitórios da síntese de melatonina. A complexidade de sinalização pelo cálcio citosólico deve-se à compartimentalização deste dentro da célula. A organização espacial do cálcio dentro da célula em microdomínios permite a regulação de processos celulares específicos nas diferentes regiões celulares (BERRIDGE, 2006). Essa enorme possibilidade de regionalização do cálcio, consequência dos diferentes mecanismos de aumento do cálcio intracelular, é responsável pela diferença dos mecanismos de atuação deste segundo mensageiro e das diferentes cascatas de sinalização que este íon pode causar dentro da célula.

As ações inibitórias da AEME sobre a síntese de melatonina parecem, então, ser mediadas por receptores colinérgicos muscarínicos, provavelmente do subtipo M_1 , como descrito na literatura e que está ligado ao aumento do IP_3 e do cálcio intracelular (PHANSUWAN-PUJITO; MØLLER; GOVITRAPONG, 1999).

Drogas de abuso interferem com a síntese de melatonina. Em estudo recente, foi demonstrado que o álcool diminui a síntese da melatonina, através da redução da atividade da AANAT e da expressão das enzimas AANAT e TPH (PERES et al, 2011). Estudos com explantes de glândulas pineais de ratos mostraram que a cocaína aumenta a síntese da melatonina e a atividade da enzima AANAT. O mesmo efeito da cocaína não pode ser observado em cultura de glândulas mantidas por 48 horas, em que os terminais pré-sinápticos degeneram, mostrando que o efeito da cocaína é dependente da integridade dos terminais sinápticos (OXENKRUG et al., 1990).

As drogas de abuso podem também levar a modificações da expressão dos genes do relógio no cérebro. A cocaína altera a expressão dos genes relógio (Per-1, Per-3, Clock, Bmal1, Cry 1 e 2) no estriato e no hipocampo (UZ et al., 2005).

Os efeitos de sensibilização a drogas de abuso envolvem uma participação importante da glândula pineal e da melatonina. Foi mostrado que a sensibilização à cocaína ocorre predominantemente no período claro, quando a melatonina está ausente. Além disso, essa ritmicidade de sensibilização deixa de existir em animais pinealectomizados (KURTUNCU et al., 2004). Neste efeito de sensibilização, os receptores para melatonina do tipo MT₁ parecem ser fundamentais, pois camundongos knockout para esses receptores apresentam a sensibilização à cocaína tanto durante o dia como a noite, o que não ocorre em animais knockout para os receptores MT₂ (MANEV; UZ, 2006).

Este trabalho pretendeu contribuir para o esclarecimento das ações da AEME, um componente de uma droga de abuso, o “crack”, sobre a função da glândula pineal de síntese do hormônio melatonina e abre caminhos para o estudo das alterações patológicas com origem nas modificações do padrão de síntese noturna deste hormônio.

A metilecgonidina vem se juntar às drogas de abuso que alteram o padrão de síntese da melatonina, mostrando um dos efeitos possíveis deste componente do “crack”. Seria bastante interessante estudar os efeitos da associação entre a AEME e a cocaína, uma vez que dados da literatura e deste trabalho mostram que as duas drogas têm efeitos diferentes sobre a síntese de melatonina.

6 CONCLUSÕES

Observando-se e discutindo-se os resultados obtidos neste trabalho, pode-se chegar às seguintes conclusões:

- AEME diminui a síntese de melatonina em cultura de glândulas pineais de ratos, em ambas as concentrações utilizadas (1 e 100 μ M), tanto na incubação aguda de AEME como na incubação crônica.
- As concentrações utilizadas da AEME foram subletais, não causando morte celular, quando analisadas a viabilidade celular e fragmentação do DNA.
- A atividade da principal enzima da via de síntese de melatonina, a AANAT, não foi alterada pela AEME em nenhuma das concentrações utilizadas.
- O antagonista para o receptor nicotínico do subtipo $\alpha_3\beta_4$, TMPH, não reverteu o efeito da AEME, indicando que esta não atua através de receptores nicotínicos.
- Os antagonistas glutamatérgicos tanto para receptores AMPA como para receptores NMDA, não reverteram o efeito da AEME, indicando que as ações da AEME não são mediadas por esses receptores.
- O antagonista muscarínico atropina reverteu o efeito da AEME de redução da síntese de melatonina, indicando que o efeito da AEME é mediado pelo sistema colinérgico muscarínico.
- O AMPc não foi alterado em nenhuma das concentrações utilizadas de AEME, mostrando que essa via de segundos mensageiros não está envolvida no efeito desta droga.

- O conteúdo de cálcio intracelular foi aumentado pela presença da AEME, o que reforça a presença de receptores muscarínicos ligados ao aumento do cálcio intracelular na glândula pineal de ratos, como o M₁, descrito na literatura.
- *In vivo*, houve uma diminuição da melatonina no final do período escuro, confirmando a redução observada nos experimentos *in vitro*.

REFERÊNCIAS*

- AFECHÉ, S. C.; AMARAL, F. G.; VILLELA, D. C. M.; ABRAHÃO M. V.; PERES, R.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin and the pineal gland. In New research on Neurosecretory Systems. Nova York: E. Romano, S. De Luca 2008, p.151-177.
- AKHISAROGLU, M.; AHMED, R.; KURTUNCU, M.; MANEV, H.; UZ, T. Diurnal rhythms in cocaine sensitization and in Period 1 levels are common across rodent species. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.79, p.37-42, 2004.
- ANHOLT, R. R. H. Signal integration in the nervous system: adenylate cyclases as molecular coincidence detectors. **Trends Neurosci**, v.17, p.37-41, 1994.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **J. Reprod. Fertil.**, v.3, p.13-22, 1998.
- BALER, R.; KLEIN, D. C. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.27319-27325, 1995.
- BERRIDGE, M. J. Calcium microdomains: organization and function. **Cell Calcium**. 2006 v.40, p.405-412. Epub 2006 Oct 9. Review
- BOADLE-BIBER, M. C. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubated with N⁶,O²-dibutyryl adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. **Biochem. Pharmacol.**, v.29, p.669-672, 1980.
- CALVO, J.; BOYA, J.; GARCIA-MAURÍÑO, E. Ultrastructure of the pineal gland in the adult dog. **J Pineal Res**. v.5, p.479-87, 1988.
- CHEN, L. C.; GRAEFE, J. F.; SHOJAIE, J.; WILLETTS, J.; WOOD, R.W. Pulmonary effects of the cocaine pyrolysis product, methylecgonidine, in guinea pigs. **Life Sci.**, v.56, n. 1 p.7-12, 1995.
- CIPOLLA-NETO, J.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; AFECHÉ, S. C.; SCIALFA, J. H. & PERAÇOLI, A. M.. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. **Brain Res.**, v.691, p.133-141, 1995.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECHÉ, S.C. **Glândula pineal**. In: AIRES, M. M. (coord.). Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 3 ed p. 980-990, 2008
- COURT, J.; MARTIN-RUIZ, C.; GRAHAM, A.; PERRY, E. Nicotine receptors in human brain. Topography and pathology. **J. Chem. Neuroant.**, v.20, p.281-98, 2000.

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

DEGUCHI, T.; AXELROD, J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. **Anal. Biochem.**, v.50, p.176-179, 1972.

DRIJFHOUT, W. J.; GROL, C. J.; WESTERINK, H. C. Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. **Eur. J. Pharmacol.**, v.308, p.117-124, 1996.

EGLIN, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. **Auton. Autacoid Pharmacol.**, v.26, p.219-33, 2006.

EHRET, M.; CASH, C. D.; HAMON, M.; MAITRE, M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. **J. Neurochem.**, v.52, p.1886-1891, 1989.

EHRET, M.; PEVET, P. MAITRE, M. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. **J. Neurochem.**, v.57, p.1516-1521, 1991.

ERLICH, S. S.; APUZZO, J. The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. **J. Neurosurgery**, v.63, p.321-341, 1985.

ERZOUKI, H. K., ALLEN, A. C., NEWMAN, A. H., GOLDBERG, S. R., SCHINDLER, C. W. Effects of cocaine, cocaine metabolites and cocaine pyrolysis products on the hindbrain cardiac and respiratory centers of the rabbit. **Life Sci.**, v.57, p.1861-1868, 1995.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on hydrolytic and oxidative metabolic pathways of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) using microsomal preparations from rat organs. **Chem. Res. Toxicol.**, v.15, p.1543-1548, 2002.

FERRAGUTI, F.; SHIGEMOTO, R. Metabotropic glutamate receptors. **Cell Tissue Res.**, v.326, p.483-504, 2006.

GANGULY, S.; GASTEL, J. A.; WELLER, J. L.; SCHWARTZ, C.; JAFFE, H.; NAMBOODIRI, M. A. A.; Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/ 14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.8083-8088, 2001.

GARCIA, R. C. T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo.** Dissertação. (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicologia). 2009. 140p Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2009.

GOMPERTS, B. D.; KRAMER, I. M.; TATHAM, P. E. R. **Signal transduction.** San Diego-CA, USA: Academic Press 2002, p.145-187.

- GOVITRAPONG, A. P.; EBADI, M.; The inhibition of pineal arylalkylamine N-acetyltransferase by glutamic acid and its analogues. **Neurochem. Int.**, v. 13, p.223-230,1988.
- HARRISON, N.; ZATZ, M. Voltage-dependent calcium channels regulate melatonin output from cultured chick pineal cells. **J. Neuros.** v. 9, p.2462-2467,1989.
- HASSAN A, N. EL-FAWAL.; WOOD, R. W. Airway Smooth Muscle Relaxant Effects of the Cocaine Pyrolysis Product, Methylecgonidine, **J. Pharmacol. Exp. Therapeut**, v. 272, p. 991-996, 1995.
- HASSAN, T. B.; PICKETT, J. A.; DURHAM, S.; BARKER, P. Diagnostic indicators in the early recognition of severe cocaine intoxication. **J. Accid Emerg. Med.**,v.13, p.263, 1996.
- HERNANDEZ, S. C.; VICINI, S.; XIAO, Y, MARTHA I. GARCIA, D.; YASUDA, R. P.; WOLFE, B. B.; KELLAR, J. K.The nicotinic receptor in the rat pineal gland is $\alpha 3 \beta 4$ subtype. **J. Mol. Pharmacol.**, v.66, p.979-983, 2004.
- HUANG, L.; WOOLF, J. H.; ISHIGURO, Y.; MORGAN, J. P. Effect of cocaine and methylecgonidine on intracellular Ca^{2+} and myocardial contraction in cardiac myocytes. **Am. J. Physiol.**, v.273, p.893-901,1997.
- HUANG, Z.; LIU, T.; CHATTORAJ, A.; AHMED, S.; WANG, M. M.; DENG, J.; XING SUN, X.; BORJIGIN, J. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. **J. Pineal Res.**, v.45, p.506–514, 2008.
- ISHIO, S.; YAMADA, H.; CRAFT, C. M.; MORIYAMA, Y. Hydroxyindol-O-methyltransferase is another target for L-glutamate-evoked inhibition of melatonin syntesis in rat pinealcytes. **Brain Research**, 1999, v.850, p.73-78.
- JACOB, P., LEWIS, E. R., ELIAS-BAKER, B. A., JONES, R. T. A pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine), is in the urine of cocaine smokers. **J. Anal. Toxicol.**,v.14 p.353-357, 1990.
- KLEIN, D. C.; GANGULY, S.; COON, S. Q.; GAILDRAT, P.; MORIN, M.; WELLER, J. L.; OBSIL, T. 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? **J. Neuroendocrinol.**, v.15, p.370-377, 2003.
- KLEIN, D. C.; ROSEBOOM, P. H.; COON, S. L. New ligth is shining on the melatonin rhythm enzyme. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.7, p.106-112, 1996.
- KÖHR, G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. **Cell Tissue Res.** v.326, p.439-446, 2006.
- KORF, H. W. Innervation of the pineal gland. In *The Autonomic Nervous System*, ed. **BURNSTOCK, G.**, vol. 10, Autonomic-Endocrine Interactions, ed. UNSICHER, K., pp. 129-180. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996.
- KURTUNCU, M.; ARSLAN, A. D.; AKHISAROGLU, M.; MANEV, H.; UZ, T. Involvement of the pineal gland on diurnal cocaine reward in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.489, p.203-205, 2004.

LAITINEN, J. T.; TORDA, T.; SAAVEDRA, J. M. Cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in the rat pineal gland. **Eur. J. Pharmacol.**, v.161, p.237-240, 1989a.

LAITINEN, J. T.; TORDA, T.; SAAVEDRA, J. M. Pineal muscarinic phosphoinositide response: pertussis toxin resistant signaling with very low receptor number. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.164, p.645-652, 1989b.

LAITINEN, J. T.; VAKKURI, O.; SAAVEDRA, J. M. Pineal muscarinic phosphoinositide responses: age-associated sensitization, agonist-induced desensitization and increase in melatonin release from cultured pineal glands. **Neuroendocrinology**, 55: 492-499, 1992.

LAITINEN, J. T.; LAITINEN, K. S. M.; KOKKOLA, T. Cholinergic signaling in the rat pineal gland. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 15: 177-191, 1995.

LANGMEAD, C. J.; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacol. Ther.**, 117: 232-243, 2008.

LEE, S. Y.; CHOI, B. -H.; HUR, E. -M.; LEE, J. -H.; LEE, S. -J.; LEE, C. O.; KIM, K. -T. Norepinephrine activates store-operated Ca^{2+} entry coupled to large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat pinealocytes. **Am. J. Physiol.**, 290: C1069-C1066, 2006.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. **J. Biol. Chem.**, v. 235, p.1992- 1997, 1960.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. **J Biol Chem**. 235:1992-7, 1960.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; HEINZELMAN, R. V. Structure of melatonin. **Chem Soc** 81:6084–6085, 1959.

LETZ, B.; SCHOMERUS, C.; MARONDE, E.; KORF, H. W.; KORBAMARCHER, C. Stimulation of a nicotinic Ach receptor causes depolarization and activation of L-type Ca^{2+} channels in rat pinealocytes. **J. Physiol.**, v. 499, p.329-340, 1997.

LETZ, B.; SCHOMERUS, C.; MARONDE, E.; KORF, H. W.; KORBAMARCHER, C. Stimulation of a nicotinic Ach receptor causes depolarization and activation of L-type Ca^{2+} channels in rat pinealocytes. **J Physiol**, 499: 329-340, 1997.

LUKE, J. Fluoride deposition in the aged human pineal gland. **Caries Res**, v.35, p.125-128, 2001.

MANEV, H.; UZ, T.; Clock genes: influencing and being influenciad by psychoactive drugs. **J Pharmacological Sciences.**, 27 pg187-189, 2006.

MANEV, H.; UZ, T.; Clock genes: influencing and being influenciad by psychoactive drugs. **J. Pharmacol. Sci.**, v.27, p187-189, 2006.

MARONDE E, STEHLE JH. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. **Trends Endocrinol Metab**. May-Jun;18(4) p.142-9, 2007.

MARONDE, E. ; STEHLE J. H. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.18, p.142-149, 2007.

MARONDE, E.; PFEFFER, M.; OLCESE, J.; MOLINA, C. A.; SCHLOTTER, F.; DEHGHANI, F.; KORF, H.- W.; STEHLE, J. H. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. **J. Neurosci.**, v.19, p.3326-3336, 1999.

MARONDE,E.; PFEFFER, M.; OLCESE,J.; MOLINA,C.A.; SCHLOTTER,F.; DEHGHANI,F.; KORF,H.-W.; STEHLE,J.H. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. **J. Neurosci.**, 19: 3326-3336, 1999.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: **Rev. Physio. Patho., J. Nutr.**; v.130, p.1007S-15S, 2000.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: **Review of Physiology and Pathology. J Nutr.**;130 p.1007S-15S,2000.

MESQUITA, L. S. M. **Ações da metilecgonidina sobre a síntese de melatonina na glândula pineal de ratos**. 2011. 72 f. Dissertação (mestrado em Fisiologia Humana) - **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

MØLLER M, KORF H -W.. Central innervation of the pineal organ of the Mongolian gerbil. A histochemical and lesion study. **Cell Tissue Res.**, v.230, p.259–272, 1983a

MØLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **Microsc. Res. Tech.**, v.21, p.188-204,1992.

MØLLER, M.; BAERES,F. M. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. **Cell Tissue Res.**, v.309, p.139–150, 2002. Review.

MØLLER, M.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; MORGAN, K. C.; BADIU, C. Localization and diurnal expression of mRNA encoding the beta1-adrenoceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization study. **Cell. Tissue Res.** v.288, p.279-284, 1997.

OXENKRUG, G. F.; DRAGOVIC, L. J.; MARKS, B. H.; YUWILER, A. Effect of cocaine on rat pineal melatonin synthesis in vivo and in vitro. **Psychiatry Res.**, v.34, p.185-191, 1990.

PARFITT, A.; WELLER, J. L.; KLEIN. D. C. Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. **Neuropharmacology**, v.15, p.353-358, 1976.

PARFITT, A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C.; SAKAI, K. K.; MARKS, B. H. 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. **Mol. Pharmacol.**, v.11, p.241-255, 1975

PAUL, B. D.; MCWHORTER, L. K. ; SMITH, M. L. Electron ionization mass fragmentometric detection of urinary ecgonidine, a hydrolytic product of methylecgonidine, as an indicator of smoking cocaine. **J. Mass. Spectrom.**, v.34, p.651-660, 1999.

PERES, R; AMARAL, F. G; MADRIGRANO, T. C; SCIALFA, J. H; BORDINI, S; AFEICHE, S. C; CIPOLLA-NETO, J. Ethanol consumption and pineal melatonin daily profile in rats. **Addiction Bio.**, v.16, p.580-590, 2011.

PHANSUWAN-PUJITO, P.; MOLLER, M ; GOVITRAPONG, P. Cholinergic innervation and function in the mammalian pineal gland. **Microsc. Res. Tech.**, v.46, p.281-295 , 1999.

PHANSUWAN-PUJITO, P.; LARSEN P. J.; MØLLER, M. Expression of muscarinic receptors of subtype m1 in the rat pineal gland. In: Møller M, Pe´vet P, editors. **Adv. Pineal Res.**, v.8, p 207-213, 1994.

REITER, R. J. The mammalian pineal gland: structure and function. **J. Anat.**; v.162, p.287-313, 1981.

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

RICHTER, H.G.; TORRES-FARFÁN, C.; ROJAS-GARCÍA, P.P.; CAMPINO, C.; TORREALBA, F.; SERÓN-FERRÉ, M. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. **Biol Res.**, v.37, p.11-28, 2004.

ROSEBOOM, P. H. & KLEIN, D. C. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a β -adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. **Mol. Pharmacol.**, v.47, p.439-449, 1995.

SCHAAD, N. C.; VANECEK, J.; RODRIGUEZ, I. R.; KLEIN, D. C.; HOLTZCLAW, L.; RUSSELL, J. T. Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. **Mol. Pharmacol.**, v.47, p.923-933, 1995.

SCHEIDWEILER, K. B.; SHOJAIE, J.; PLESSINGER, M. A.; WOOD, R. W.; KWONG, T. C. Stability of methylecgonidine and ecgonidine in sheep plasma in vitro. **Clin. Chem.**, v. 46, p.1787-1795, 2000.

SCHEIDWEILER, K.B.; PLESSINGER, M. A.; SHOJAIE, J.; WOOD, R. W.; KWONG, T.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. **J. PET.**, v.307, p.1179-1187, 2003.

SCHOMERUS, C.; LAEDTKE, E.; KORF, H. W. Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. **Neurochem. Int.** v. 27, p.163-175, 1995.

SCHRÖDER, H.; BENDIG, A.; DAHL, D.; GRÖSCHEL-STEWART, U.; VOLLRATH, L. Neuronal markers in the rodent pineal gland an immunohistochemical investigation. **Histochemistry.**, v. 94, p. 309-314, 1990.

SHEARDOWN, M. J. The pharmacology of AMPA receptors and their antagonists. **Stroke**, v. 24, p. 146-7, 1993.

SHEIN, H. M.; WURTMAN, R. J. Stimulation of [^{14}C]tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyryl adenosine 3',5' monophosphate in rat pineal organ cultures. **Life Sci.**, v.10, p.935-940, 1971.

SHIMOMURA, E. T.; HODGE G. D.; AND PAUL B. D. Examination of Postmortem Fluids and Tissues for the Presence of Methylecgonidine, Ecgonidine, Cocaine, and Benzoylecgonine Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Clin. Chem.**, v.47, p. 1040–1047 2001.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptide, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.**, v.55, p. 25-395, 2003.

SIMONNEAUX, V.; RODEAU, J.- L.; CALGARI, C.; PÉVET, P. Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. **Eur. J. Neurosci.**, v.11, p.725-728, 1999.

SPESSERT, R.; RAPP, M.; JASTROW, H.; KARABUL, N.; BLUM, F.; VOLLRATH, L. A differential role of CREB phosphorylation in cAMP-inducible gene expression in the rat pineal. **Brain Res.**, v.864, p. 270-280, 2000.

SPRENGEL, R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Cell Tissue Res.** v.326, p. 447-55, 2006.

STANKOV, B.; CIMINO, M.; MARINI, P.; LUCINI, V.; FRASCHINI, F.; CLEMENTI, F. Identification and functional significance of nicotinic cholinergic receptors in the rat pineal gland. **Neurosci. Lett.**, v.156, p.131-4, 1993.

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

TAMOTSU, S.; SCHOMERUS, C.; STEHLE, J. H.; ROSEBOOM, P. H.; KORF, H. - W. Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. **Cell Tissue Res.**, v.282, p. 219-226, 1995.

TARASCHENKO, O. D.; PANCHAL, V.; MAISONNEUVE, I. M.; GLICK, S. D. Is antagonism of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptors a strategy to reduce morphine dependence?. **Eur. J. Pharmacol.**, v.513, p. 207-18, 2005.

TAYLOR, R. L.; ALBUQUERQUE, M. L. C.; BURT, D. R. Muscarinic receptors in pineal. **Life Sci.**, v.26, p.2195-2200, 1980.

TOENNES, S. W.; FANDIÑO, A. S.; HESSE, F. J.; KAUERT, G. F. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.792, p.345-351, 2003.

- TZAVARA, E. T.; POUILLE, Y.; DEFER, N.; HANOUNE, J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.11208-11212, 1996.
- UZ, T.; AHMED, R.; AKHISAROGLU, M.; KURTUNCU, M.; IMBESI, M.; DIRIM ARSLAN, A.; MANEV, H. Effect of fluoxetine and cocaine on the expression of clock genes in the mouse hippocampus and striatum. **Neuroscience**, v.134, p.1309- 1316, 2005.
- VILELLA, D. C. **Síntese de melatonina na glândula pineal de ratos: modulação pelo glutamato**. Dissertação.(Mestrado em Fisiologia Humana). 2007. 98f. : Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2007.
- VOLLRATH, L. Mammalian pinealocytes: ultrastructural aspects and innervation. **Ciba Found Symp.**, v.117, p.9-22. 1985.
- WADA, E.; WADA, K.; BOULTER, J.; DENERIS, E.; HEINEMANN, S.; PATRICK, J.; SWANSON, L.W. Distribution of alpha2, alpha3, alpha4, and beta2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 284, p.314 –335, 1989.
- WESSLER, I.; REINHEIMER, T.; BITTINGER, F.; KIRKPATRICK, C. J.; SCHENDA, J.; VOLLRATH, L. Day-night rhythm of acetylcholine in the rat pineal gland. **Neurosci. Lett.**, v.224, p.173-176, 1997.
- WOOD, R. W.; SHOJAIE, J.; FANG, C. P.; GRAEFE, J. F. Methylecgonidine coats the crack particle. **Pharmacol Biochem Behav.** v.53, p.57-66, 1996.
- WOOD, S. A.; RASMUSSEN, J. P.; HOLLAND, P. T.; CAMPBELL, R.; CROWER, A. L. M. First report of the cyanotoxin Anatoxin-A from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria), **J. Phyco.**, v.43, p. 356-365, 2007.
- WOOLF, J. H.; HUANG, L.; ISHIGURO, Y.; MORGAN, J. P. Negative inotropic effect of methylecgonidine, a major product of cocaine base pyrolysis, on ferret and human myocardium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.30, p.352-9, 1997.
- XIE, D. P.; CHEN, L. B.; LIU, C. Y.; ZHANG, C. L.; LIU, K. J.; WANG, P. S. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M₃ receptor in rabbits. **Chin. J. Physiol.**, v. 47, p.89-94, 2004.
- YAMADA, H.; OGURA, A.; KOIZUMI, S.; YAMAGUSHI, A.; MORIYAMA, Y. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. **J. Neurosci.**, v.18, p. 4946-4952, 1998.
- YAMADA, H.; YAMAMOTO, A.; TAKAHASHI, M.; MICHIBATA, H.; KUMON, H.; MORIYAMA, Y. The L-type Ca²⁺ channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. **J. Pineal Res.** v.21, p.165-74, 1996.

YANG, Y.; KE, Q.; CAI, J.; XIAO, Y. F.; MORGAN, J. P. Evidence for cocaine and methylecgonidine stimulation of M2 muscarinic receptors in cultured human embryonic lung cells. **Br. J. Pharmacol.**, v.132, p.451-460, 2001.

YANG, Y.; LIAO, H.; KE, Q.; CAI, J.; XIAO, Y. F.; MORGAN, J. P. Enhancement of nitric oxide production by methylecgonidine in cultured neonatal rat cardiomyocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v.135, p. 188-196, 2002.

YATSUSHIRO, S.; YAMADA, H. ; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, A.; MORIYAMA, Y. Ionotropic glutamate receptors trigger microvesicle-mediated exocytosis of l-glutamate in rat pinealocytes. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 288-297, 2000.

ZHANG, C.; LOMENZO, S. A.; BALLAY, C. J.; TRUDELL, M. L. An improved synthesis of (+)-2-tropinone. **J. Org. Chem.**, v.62, p.7888-7889, 1997.

ZHAO, Z. Y ; TOUITOU, Y. Pineal perfusion with calcium channel blockers inhibits differently daytime and nighttime melatonin production in rato. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.101, p. 89-196, 1994.