

TABATA MARIZ BOHLEN

PARTICIPAÇÃO DA MELATONINA NA REPRODUÇÃO EM UM  
MODELO ANIMAL NÃO SAZONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Dra. Renata Frazão

Versão original

São Paulo  
2015

## RESUMO

Bohlen TM. Participação da melatonina na reprodução em um modelo animal não sazonal. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Diversas evidências sugerem que pistas ambientais em associação com os níveis circulantes de estrógeno são responsáveis pela sincronização do ciclo ovulatório, entretanto, como estas informações são integradas é fato desconhecido. No controle neuroendócrino do ciclo ovulatório de roedores o pico de secreção do hormônio luteinizante (LH) é um evento que ocorre em horário específico do dia, quando os níveis circulantes de estrógeno estão elevados e os níveis de melatonina estão diminuídos. Em roedores sazonais o aumento da síntese de melatonina durante o inverno é responsável pela inibição das funções reprodutivas fato que é acompanhado pela diminuição da expressão do gene *Kiss1*, essencial para o controle neuroendócrino da reprodução. Parte dos neurônios que expressam este gene estão distribuídos no núcleo anteroventral periventricular (AVPV), núcleo periventricular anterior (PeN) e núcleo arqueado (ARC), sendo estes neurônios responsáveis por mecanismos de retroalimentação positivos (AVPV e PeN) e negativos (Arc) que regulam a atividade dos neurônios que secretam o hormônio liberador de gonadotrofinas e, portanto, o ciclo ovulatório. As bases neurais que regulam o ciclo ovulatório participam de mecanismos complexos que não estão completamente definidos até o presente momento. Para realização deste projeto, foi utilizado um modelo de camundongo geneticamente modificado no qual a proteína fluorescente "renilla humanizado" verde (hrGFP) é expressa sob o controle transcricional do gene *Kiss*. Fêmeas e machos foram divididos em dois grupos experimentais: 1) animais mantidos em condições de foto período reduzido (SD) com 6h de luz e 18h de escuro; 2) animais tratados com melatonina (1µg/g) e grupo veículo. Os animais foram acompanhados a partir do 21º dia de vida até a idade adulta (70- 80 dias de vida). Parâmetros como peso corporal, idade da abertura vaginal, idade da 1ª cornificação e idade do início da ciclicidade, foram acompanhados. Quando adultos, os animais foram separados em três subgrupos: subgrupo 1, animais em que foram avaliados a quantidade de neurônios que expressaram a proteína fluorescente hrGFP; 2: animais em que foram avaliados a expressão do RNAm de alguns genes no hipotálamo, e 3: os animais foram submetidos à avaliação da fertilidade. Concluimos que condições de dias curtos (que possivelmente aumentam o período de circulação de melatonina) alteram parâmetros de

amadurecimento sexual em fêmeas e, assim como o tratamento com melatonina, afetam o tamanho das gônadas de camundongos machos, mas que esses efeitos não alteram o número de neurônios que expressam o gene *Kiss1* e não são suficientes para inibir a reprodução das fêmeas.

**Palavras-chave:** Melatonina. Reprodução animal. *Kiss1*. Estrógeno. Fotoperíodo. Puberdade.

## ABSTRACT

Bohlen TM. Melatonin participation on reproduction in a non-seasonal animal model. [Master thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Much evidence suggests that environmental cues in combination with circulating levels of estrogen are responsible for synchronization of the ovulatory cycle, but, how this information is integrated is an unknown fact. In the neuroendocrine control of the ovulatory cycle of rodents, peak secretion of luteinizing hormone (LH) is an event that occurs in specific time of the day, when the circulating estrogen levels are high and melatonin levels are decreased. In seasonal rodents, during the winter the melatonin synthesis is increased and is responsible for the inhibition of reproductive functions, fact that is accompanied by decreased expression of *Kiss1* gene, essential for the neuroendocrine control of reproduction. Part of neurons expressing this gene are distributed in the periventricular anteroventral nucleus (AVPV), anterior periventricular nucleus (PeN) and arcuate nucleus (ARC), and these neurons responsible for positive feedback mechanisms (AVPV and PeN) and negative (Arc) that regulate the activity of neurons that secrete gonadotropin-releasing hormone, and therefore the ovulatory cycle. Neural bases governing the ovulatory cycle participate in complex mechanisms that are not fully defined until now. To carry out this project, we used a mouse model genetically modified in which the fluorescent protein "humanized renilla" green (hrGFP) is expressed under the transcriptional control of gene *Kiss*. Males and females were divided into two groups: 1) animals kept in short period photo conditions (SD) with 6 hours of light and 18 hours of dark; 2) animals treated with melatonin (1 µg / g) and vehicle group. The animals were followed from the 21st day of life to adulthood (70- 80 days of life). Parameters such as body weight, age of the vaginal opening, age of the 1st cornification and age of onset of cyclicity, were followed. As adults, the animals were divided into three subgroups: subgroup 1, animals which was evaluated the number of neurons expressing the fluorescent protein hrGFP; 2: animals which was evaluated the mRNA expression of some genes in the hypothalamus, and 3: animals which was evaluated fertility. We conclude that short-day conditions (which possibly increases the period of circulation of melatonin) alter sexual maturation parameters in females and, as well as melatonin treatment, affect the size of the gonads of male mice, but these effects do not change the number of neurons expressing the *Kiss1* gene and are not sufficient to inhibit

the female reproduction.

**Keywords:** Melatonin. Animal reproduction. *Kiss1*. Estrogen. Photoperiod. Puberty.

## Introdução

A glândula pineal em mamíferos sintetiza e libera a melatonina. A produção desse hormônio ocorre sob influência do sistema de temporização circadiana, um conjunto de estruturas neurais que fornecem uma organização temporal de processos fisiológicos e de comportamento, participando da regulação neural da glândula pineal e resultando no ritmo circadiano de produção de melatonina. Esse sistema possui três componentes principais: 1) vias de entrada que definem o período e fase exata do marca-passo, 2) um marca-passo que gera o sinal circadiano e 3) vias de saída que ligam o marca-passo aos sistemas efetores da expressão da função circadiana (Moore, 1996).

A via de entrada principal são células fotorreceptoras encontradas na retina que expressam melanopsinas como fotopigmento. Essas células fazem parte de um conjunto que utiliza o glutamato e a PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating peptide*) como neurotransmissores para enviar o estímulo fótico através do trato retino-hipotalâmico, percorrendo-o e atingindo o núcleo supraquiasmático (NSQ), região considerada como principal marca-passo no sistema nervoso central de mamíferos e que utiliza a vasopressina como principal neurotransmissor. As vias de saída que direcionam o ritmo circadiano produzido pelo NSQ para glândula pineal é composto por: 1) projeções GABAérgicas e glutamatérgicas que do NSQ se projetam para o núcleo paraventricular; 2) conexões monossinápticas à coluna intermédio-lateral na coluna espinal torácica, região da qual fibras nervosas simpáticas pré-ganglionares que se projetam para o gânglio cervical superior; 3) fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares, que tem como neurotransmissor a noradrenalina, para a glândula pineal (Fu et al., 2005; Hannibal et al., 2002; Hirota, Fukada, 2004; Korf, von Gall, 2006; Moore, 1996). Portanto, a produção da melatonina acontece diariamente de forma rítmica, controlada pelo NSQ (Klein, Moore, 1979), e por efeito da noradrenalina (Axelrod et al., 1969; Drijfhout et al., 1996; Klein, Moore, 1979). Para a síntese deste hormônio ocorre acetilação da molécula de serotonina pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), produzindo a N-acetilserotonina que é metilada pela hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) para que então seja gerada a melatonina (Figura 1) (Axelrod, Weissbach, 1960; Klein et al., 1997). Este hormônio apresenta diversas funções, como participar da organização temporal dos ritmos biológicos circadianos, regulação dos ciclos de atividade-reposo e ciclo sono-vigília, regulação do sistema imunológico e reprodução, dentre outras funções (Arendt et al., 2008; Glass, Knotts, 1987; Lavie, 1997; Maestroni et al., 1986; Malpaux et al., 2001;

Reiter 1980; Tamarkin et al., 1985).

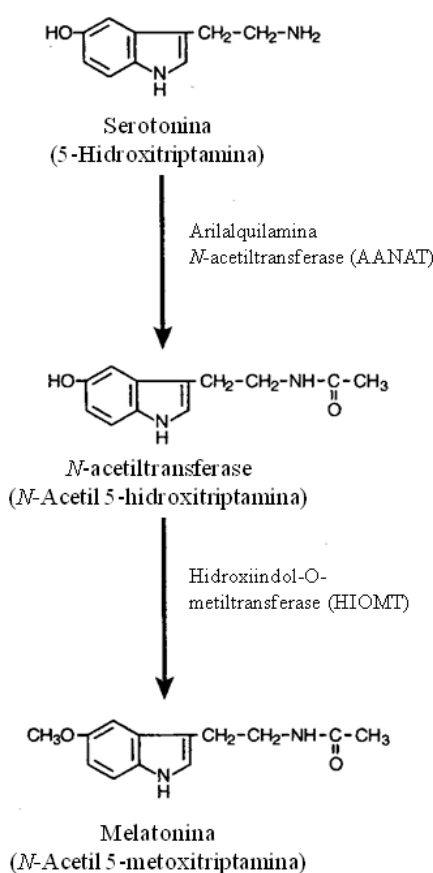
Fotoperíodo é como é chamada a parte do dia em que existe luz, e varia de acordo com as estações do ano. A variação do fotoperíodo afeta o ciclo reprodutivo de algumas espécies, conhecidas como espécies sazonais. Esses animais apresentam, em cada espécie, uma fase do ano em que a atividade ovariana é interrompida (chamada anestro). Os efeitos causados pelo fotoperíodo podem ser alterados se os animais forem mantidos em condições artificiais e que simulem a parte do ano em que esses animais se encontram em fase reprodutiva (Cunningham, Klein, 2008).

Em roedores sazonais a reprodução é inibida no inverno (Goldman, 2001; Pévet, 1988), quando ocorre interrupção do ciclo estral de fêmeas (Sorrentino, Reiter, 1970) e regressão gonadal em machos (Goldman, 2001). Em roedores não sazonais, relatos demonstram que animais submetidos a períodos de escuro prolongado ou a suplementação de melatonina apresentam déficits do sistema reprodutivo como, por exemplo, regressão gonadal (Kasahara et al., 2010). Fêmeas (roedores) submetidas a ciclo de luz constante ou a remoção da glandula pineal (que impede a resposta ao fotoperíodo) apresentam masculinização (desenvolvimento de características masculinas) e o ciclo estral deixa de existir, colocando as fêmeas em situação de anestro, sendo que, o tratamento destes animais com melatonina reverte este quadro na maioria dos casos (Dair et al., 2008; Pévet, 1988; Prata Lima et al., 2004; Revel et al., 2007; Woodfill et al., 1994).

Sabe-se ainda que a remoção da glândula pineal, além de induzir uma drástica redução na concentração de melatonina circulante, induz ainda a diminuição dos níveis circulantes de progesterona, aumento dos níveis circulantes de estrógeno e aumento uterino em ratos Wistar (Dair et al., 2008). Em cultura de células granulosa-luteínicas humanas, a melatonina estimula a expressão do RNA mensageiro (RNAm) do receptor de hormônio luteinizante (LH) (Woo et al., 2001), e em cultura de linhagem de células GT1-7 que expressam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), a melatonina diminui a expressão do RNAm do GnRH (Roy et al., 2001).

Curiosamente, em humanos os níveis circulantes da melatonina estão diminuídos em pacientes que apresentam puberdade precoce (Waldhauser et al., 1991), e elevados em mulheres que apresentam amenorreia hipotalâmica funcional, induzido por estresse ou por exercícios físicos (Berga et al., 1988; Bergiannaki et al., 1995; Laughlin et al., 1991). Mulheres que trabalham em turnos noturnos ou que possuem escalas irregulares de trabalho apresentam ciclo menstrual alterado (tanto aumento quanto diminuição de duração), aumento de dor menstrual e alterações de fluxo menstrual (Chung et al., 2005;

Labyak et al., 2002). Esses sintomas são acompanhados por mudanças nos padrões de secreção de hormônios ovarianos e hipofisários, tais como um aumento na duração da fase folicular e mudança nas concentrações de hormônio folículo-estimulante (FSH) (Chung et al., 2005; Knutsson, 2003; Lohstroh et al., 2003; Scott, 2000). Além de variações hormonais, mulheres que apresentam jornadas de trabalho invertidas ou irregulares demonstram ter maior risco de darem à luz a bebês prematuros e/ou com baixo peso, de sofrerem abortos espontâneos e maior dificuldade para engravidar (Bisanti et al., 1996; Knutsson, 2003).



**Figura 1- Via metabólica da síntese de melatonina.** A molécula de serotonina é acetilada pela enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AA-NAT), transformando-a em *N*-acetilserotonina, que por sua vez sofre uma metilação pela enzima hidroxiindol-*O*-metiltransferase (HIOMT), produzindo a melatonina. (Adaptado de Klein et al., 1997).

As funções da melatonina dependerão em parte dos receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Dois tipos de receptores de membrana de melatonina foram caracterizados em mamíferos, o MT1 e o MT2, que são expressos em diferentes tecidos por todo o corpo, incluindo o sistema nervoso central (SNC). O MT1 é um receptor



acoplado à proteína  $G_{i/o}$ , com uma parte sensível à proteína toxina pertussis, que intermedeia a inibição de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) nas expressões dos sistemas recombinantes. MT2 é um receptor acoplado à proteína  $G_{i/o}$  capaz de inibir a produção de AMPc e de monofosfato de guanosina cíclico em sistemas recombinantes e estimula a atividade da proteína quinase C no sistema nervoso (Dubocovich, Markowska, 2005; Dubocovich et al., 1997; Reppert et al., 1994, 1995).

A forma funcional do MT1 é a mais disseminada, e foi descrito no NSQ (Dubocovich, Markowska, 2005; Liu et al., 1997), cerebelo (Al-Ghoul et al., 1998; Mazzucchelli et al., 1996), retina (Fujieda et al., 1999), hipocampo (Savaskan et al., 2002), hipófise (von Gall et al., 2002; Yasuo et al., 2009) e vias dopaminérgicas centrais (Uz et al., 2005); já o MT2 é expresso na retina (Reppert et al., 1995), NSQ (Dubocovich et al., 1998; Hunt et al., 2001; Liu et al., 1997) e hipocampo (Wang et al., 2005). Ambos receptores também são encontrados em tecidos periféricos (Doolen et al., 1998; Drazen, Nelson, 2001; Frungieri et al., 2005; Krause et al., 1995; Peschke et al., 2000; Sharkey, Olcese, 2007).

Foi descrito que, na retina, os receptores de melatonina MT1 e MT2 formam heterodímeros e que a ausência de um dos receptores inviabiliza o efeito da melatonina neste tecido (Baba et al., 2013). No NSQ, a ativação do MT1 causa a inibição de disparos neuronais e da fosforilação do elemento de resposta de ligação do fator de transcrição do AMPc (CREB) por estímulos da PACAP e faz com que o receptor MT2 altere a fase no NSQ causando mudanças de fase dos ritmos de disparo neuronal (Dubocovich et al., 2003, 2005; Hunt et al., 2001; Jin et al., 2003; Liu et al., 1997; Pfeffer et al., 2012; Tosini et al., 2014; von Gall, Weaver, et al., 2000). Na hipófise, a ativação dos receptores de melatonina inibem a secreção de prolactina e regulam a expressão do gene *Per1* e a informação do fotoperíodo na adenohipófise (von Gall et al., 2002; Yasuo et al., 2009).

### 1.1 Controle neuronal da reprodução

Como mencionado, o hormônio melatonina está intimamente relacionado com o controle reprodutivo de animais de reprodução sazonal. Porém existem um conjunto de fatores, que agem concomitantemente, para controlar a reprodução dos animais.

Atualmente sabe-se que o efeito da melatonina sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que coordena o ciclo ovulatório, deve-se pela ativação dos receptores de melatonina em neurônios GnRH (linhagem de células GT1-7), no testículo de animais

sazonais (Syrian hamster) e ovários de ratos (Sprague-Dawley) (Frungeri et al., 2005; Roy et al., 2001; Soares et al., 2003; Vanecek, 1998).

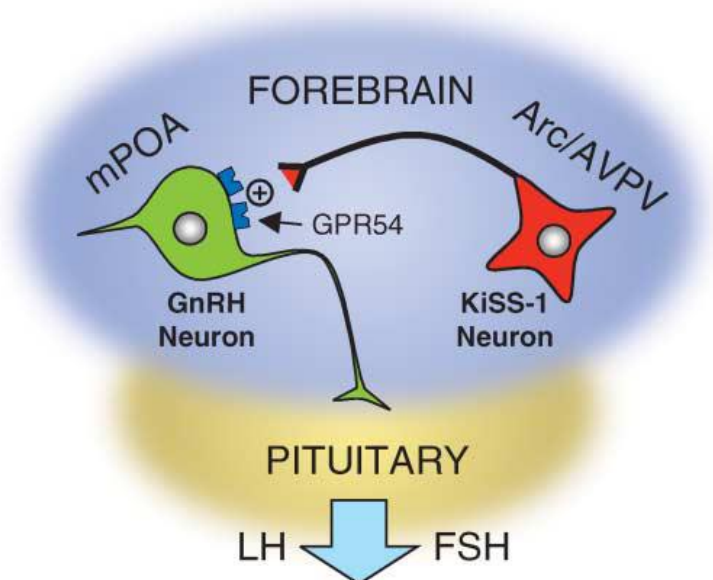
No SNC, existem três regiões no hipotálamo que se destacam pela sua importância na regulação do ciclo ovulatório e reprodução pela presença de neurônios que expressam o gene *Kiss1*: o núcleo periventricular anteroventral (AVPV), o núcleo periventricular anterior (PeN) e o núcleo arqueado (Arc) (Smith, Cunningham, et al., 2005; Smith, Popa, et al., 2006). A kisspeptina, sintetizada por estes neurônios, se liga à um tipo de receptor de membrana da família dos receptores acoplados à proteína-G (GPR54) (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001) que é expresso em diversas áreas, incluindo hipotálamo e amígdala (Irwig et al., 2004; Lee et al., 1999; Messenger et al., 2005). Em 2003, três estudos independentes demonstraram a importância da kisspeptina em relação ao sistema reprodutivo com base em estudos clínicos (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003; Seminara et al., 2003). Pacientes com mutações no gene que codifica o GPR54 apresentam déficits do sistema reprodutivo, como o hipogonadismo hipogonadotrófico, a ausência de puberdade e infertilidade (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). O mesmo fenótipo foi reproduzido em animais experimentais (camundongos) que não expressam os genes que codificam o *GPR54* ou o gene *Kiss1* (Colledge, 2009; Funes et al., 2003).

Os núcleos AVPV e PeN são dimórficos sendo que, o número de corpos de neurônios que expressam o gene *Kiss1* é cerca de 10 vezes maior em fêmeas, fato que não é observado em relação ao Arc (Clarkson, Herbison, 2006; Han et al., 2005). Ao contrário dos neurônios GnRH, que não os possuem receptores de estrógeno do tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (Hrabovszky et al., 2000), os neurônios que expressam o gene *Kiss1* expressam esses receptores, sendo assim influenciados pelos níveis de estrógenos circulantes (Smith, Cunningham, et al., 2005).

Sabe-se que o AVPV e o Arc mandam projeções para a área pré-óptica medial, onde estão dispostos os neurônios GnRH (Simonian et al., 1999). Além disso, os neurônios GnRH expressam os receptores GPR54 (Irwig et al., 2004; Messenger et al., 2005), sendo portanto, os neurônios que expressam o gene *Kiss1* um dos responsáveis pela modulação da atividade dos neurônios GnRH.

Quando os níveis de estrógeno circulante se elevam, as kisspeptinas estimulam a liberação do GnRH que age na hipófise induzindo a liberação de LH e FSH. Os hormônios LH e FSH, por sua vez, atuam sobre as gônadas estimulando a ovulação, dessa forma, uma alça de retroalimentação positiva está formada (Smith, Cunningham, et al., 2005;

Smith, Dungan, et al., 2005). Estes elementos formam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (Figura 2) (Navarro Tena-Sempere, 2012; Smith, Popa, et al., 2006).



**Figura 2- Interações entre neurônios que secretam kisspeptinas e neurônios GnRH.** Neste modelo, neurônios que expressam o RNA mensageiro do gene *Kiss1*, no núcleo arqueado (Arc) e no núcleo periventricular anteroventral (AVPV), fazem contato sináptico com neurônios GnRH na área pré-óptica medial (mPOA). Após ativação do receptor GPR54, ao qual a kisspeptina se liga, os neurônios GnRH são estimulados a liberar GnRH na circulação portal, que por sua vez estimula a liberação de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), pela hipófise (Smith, Clifton, et al., 2006).

Dubois e colaboradores (Dubois et al., 2014) confirmaram que, em camundongos, a presença e ativação de  $E\alpha$  é necessária para que ocorra a estimulação e inibição de neurônios *Kiss1* nos núcleos AVPV e Arc (respectivamente), e que essa ativação dos  $E\alpha$  produz o feedback positivo, mas não o negativo, sobre a ativação dos neurônios GnRH e que gera o pico de LH. Outro estudo recente realizado em ratas mostrou que a diminuição da expressão de kisspeptina no núcleo Arc causa disfunções no ciclo estral, como aumento na duração dos ciclos e consequente diminuição do número de ciclos completos. Essas fêmeas passaram por injeção intranuclear, no núcleo Arc, com adeno-vírus associado (adeno-associated virus – AAV) tipo – 2, que foi associado à uma fita antisense de kisspeptina, causando a diminuição da expressão de kisspeptina (Beale et al., 2014).

Em um projeto realizado por Kim e colaboradores (Kim et al., 2013), foi demonstrado que a diferenciação sexual de neurônios *Kiss1* não necessita de sinalização de neurônios GnRH durante o desenvolvimento pubertal. Nesse projeto foi demonstrado

que fêmeas com ausência de sinalização de GnRH (e assim, sem sinalização de gonadotrofinas cadeia abaixo) ainda possuem mais neurônios *Kiss1* nos núcleos AVPV/PeN do que machos de mesma linhagem. Porém, essas fêmeas não apresentam níveis de expressão do gene *Kiss1* máximos como animais controle (entre 38% e 45% mais baixo que as fêmeas controle), mesmo quando realizado tratamento com estrógeno (nestes casos, níveis 33% mais baixo que as fêmeas controle). Em outro estudo, animais que não possuem o receptor GPR54 nos neurônios GnRH, ou que não produzem o peptídeo kisspeptina, não produzem o pico de LH induzido por estrógeno, e assim interferem na ovulação (Clarkson et al., 2008; Dror et al., 2013).

Diferentes estudos com animais de reprodução sazonal demonstraram que os níveis de melatonina circulante afetam os níveis de RNAm do gene *Kiss1* que esses animais apresentam, variando entre os núcleos AVPV e Arc, e também entre espécies (Syrian e Siberian hamsters) (Ansel et al., 2010; Revel et al., 2006; Simonneaux et al., 2009, 2013).

Um dos mais recentes, realizado com fêmeas de hamster turco (*Mesocricetus brandti*), uma linhagem de hamster cujo período reprodutivo ocorre em dias com apenas uma pequena faixa de variação de comprimento (entre 15 h e 17 h de luminosidade), demonstrou a resposta de neurônios *Kiss1* nas situações de dias curtos (SD-sham: 8L:16D), dias longos (LD-sham: 16L:8D – grupo controle) e a pinealectomia (LD-pinx; estes animais então foram colocados em condições de LD). Foi observado que animais mantidos em condições normais de acasalamento apresentaram mais resultados positivos envolvendo os neurônios *Kiss1* quando comparados com os grupos SD e LD-pinx, sugerindo que, nessa espécie, a sinalização de longa duração da melatonina e a retirada da melatonina agem nas mesmas regiões cerebrais (Piekarski et al., 2014).

Embora, a importância da melatonina no controle do ciclo reprodutivo seja compreendida em mamíferos sazonais, os mecanismos moleculares e celulares pelos quais este hormônio poderia modular a atividade do sistema reprodutor em animais não sazonais não estão esclarecidos. Como disfunções do sistema reprodutivo são associadas a modificações nos níveis circulantes de melatonina, inclusive em humanos, o presente projeto pretende investigar se os neurônios que expressam o gene *Kiss1* representam parte da via neural pela qual a melatonina pode modular o ciclo ovulatório e a reprodução em animais não sazonais.

## **Conclusão**

Em síntese, este projeto demonstrou que quando camundongos são mantidos em fotoperíodo reduzido, ocorrem alterações nos parâmetros de amadurecimento sexual de fêmeas, redução gonadal em machos e, em ambos os sexos, ocorre redução de massa corpórea. O tratamento com melatonina, entretanto, não induziu alteração nos parâmetros relacionados ao desenvolvimento sexual de fêmeas, embora os machos tenham apresentado redução gonadal e redução da massa corpórea em uma faixa etária específica. Ambos os tratamentos não afetaram a quantidade e a densidade de neurônios que expressavam a proteína hrGFP tanto em fêmeas quanto em machos, e também não alteraram a expressão do RNAm do gene *Kiss1* no hipotálamo de fêmeas.

Concluimos, com base nos resultados acima e na avaliação de fertilidade, que nenhum dos tratamentos foi suficiente para inibir a reprodução das fêmeas deste modelo animal.

## REFERÊNCIAS\*

- Al-Ghoul, WM, Herman, MD, Dubocovich, ML. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport*. 1998;9(18):4063–8.
- Almeida, TA et al. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem*. 2004;11(15):2045-81.
- Ancel, C. et al. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology*. 2012; 153:1352–63.
- Ansel, L. et al. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms*. 2010;25(2):81–91
- Ansel, L. et al. Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GnRH release. *Reproduction*. 2011;142:417–25
- Arendt, J. et al. Some Effects of Melatonin and the Control of its Secretion in Humans. In *Ciba Found. Symp*. 2008;117:266–83.
- Axelrod, J, Shein, HM, Wurtman, RJ. Stimulation of C14-melatonin synthesis from C14-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1969;62(2):544–9.
- Axelrod, J, Weissbach, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131:1312.
- Baba, K. et al. Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci Signal*. 2013;6(296):ra89.
- Bartness, TJ, Wade, GN. Body weight, food intake and energy regulation in exercising and melatonin-treated Siberian hamsters. *Physiol. Behav*. 1985;35(5):805-8.
- Bartness, TJ, Wade, GN. Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci Biobehav Rev*. 1985b;9(4):599–612.
- Beale, KE et al. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology*. 2014;155(3):1091-8.
- Berga, SL, Mortola, JF, Yen, SS. Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66:242–4.
- Bergiannaki, JD et al.. Low and high melatonin excretors among healthy individuals. *J Pineal Res*. 1995;18:159–64.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals [2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Biosystems, P. User bulletin 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. *PE Biosystems, Foster City, Calif*, 1997. Available at:  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:User+Bulletin+#+2+ABI+P+RISM+7700+Sequence+Detection+System#0>.

Bisanti, L. et al. Shift work and subfecundity: a European multicenter study. European Study Group on Infertility and Subfecundity. *J Occup Environ Med*. 1996;38:3528.

Bosch, MA et al. 17Beta-estradiol regulation of the mRNA expression of T-type calcium channel subunits: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *J Comp Neurol*. 2009;512:347–58.

Christian, CA, Mobley, JL, Moenter, SM. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2005;102:15682–7.

Chung, FF, Yao, CC, Wan, GH.. The associations between menstrual function and life style/working conditions among nurses in Taiwan. *J Occup Health*. 2005;47:149–56.

Cipolla-Neto, J. et al.. Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. *J Pineal Res*. 2014;56(4):371–81.

Clarkson, J. et al. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J. Neurosci*. 2008;28(35):8691–7.

Clarkson, J, Herbison, AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006;147:5817–25.

Colledge, W.H. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides*. 2009;30:34–41.

Conti, A, Maestroni, GJ. HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. *J Pineal Res*. 1996;20:138–44

Cravo, RM. et al. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS One*. 2013;8(3):e58698

Cunningham, JG, Klein, BG. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. . 2008 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Elsevier Brasil.

Dair, EL. et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril*. 2008;89:1299–1305.

Dardente, H. et al. MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol*. 2003;15:778-86.

Doolen, S. et al. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J*

*Pharmacol.* 1998;345(1):67–9.

Drazen, DL, Nelson, RJ. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology*. 2001;74(3):178–84.

Drijfhout, WJ. et al. Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett*. 1996;202:185–8.

Dror, T, Franks, J, Kauffman, AS. Analysis of multiple positive feedback paradigms demonstrates a complete absence of LH surges and GnRH activation in mice lacking kisspeptin signaling. *Biol Reprod*. 2013;88(6):146.

Dubocovich, ML. et al. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J Pineal Res*. 2005;39:113–20.

Dubocovich, ML. et al. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997;355:365–75.

Dubocovich, ML. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*. 2003;8:d1093–108.

Dubocovich, ML. et al. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J*. 1998;12(12):1211–20.

Dubocovich, ML, Markowska, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27:101–10.

Dubois, SL. et al. Positive, But Not Negative Feedback Actions of Estradiol in Adult Female Mice Require Estrogen Receptor  $\alpha$  in Kisspeptin Neurons. *Endocrinology*. 2014;156(3):1111–20.

Ebihara, S. et al. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science*. 1986;231:491–3.

Ebihara, S. et al. Pineal indole metabolism in the mouse. *Brain Res*. 1987;416:136–40.

Elliott, JA, Bartness, TJ, Goldman, BD. Effect of melatonin infusion duration and frequency on gonad, lipid, and body mass in pinealectomized male Siberian hamsters. *J Biol Rhythms*. 1989;4(4):439–55.

Flier, JS. AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? *Cell Metab*. 2006;3(2):83–5.

Frazão, R. et al. Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor  $\alpha$ . *J Neurosci*. 2013;33:2807–20.

Frungeri, MB. et al. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a



receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology*. 2005;146:1541–52.

Fu, Y. et al. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(29):10339–44.

Fujieda, H. et al. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: Evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience*. 1999;93(2):793–99.

Funes, S. et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:1357–63.

von Gall, C, Weaver, DR. et al. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. *Neuroreport*. 2000;11:1803–07.

von Gall, C. et al. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci*. 2002;5(3):234–8.

von Gall, C, Lewy, A. et al. Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci*. 2000;12:964–72.

Glass, JD, Knotts, LK. A brain site for the antigonadal action of melatonin in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*): involvement of the immunoreactive GnRH neuronal system. *Neuroendocrinology*. 1987;46:48–55.

Goldman, BD. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*. 2001;16:283–301.

Han, SK. et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005;25:11349–56.

Hannibal, J. et al. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci*. 2002;22(1):RC191.

Hanon, EA. et al. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol*. 2008;18:1147–52.

Higuchi, R. et al. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)*. 2008;10(4):413–17.

Hirota, T, Fukada, Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci*. 2004;21(4):359–68.

Hrabovszky, E. et al. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology*. 2000;141(9):3506–9.

Hunt, AE. et al. Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase

advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C110–8.

Ikeno, T, Weil, ZM, Nelson, RJ. Dim light at night disrupts the short-day response in Siberian hamsters. *Gen Comp Endocrinol*. 2014;197:56–64.

Ilnytska, O, Argyropoulos, G. The role of the Agouti-related protein in energy balance regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(17):2721–31.

Irwig, MS. et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 2004;80:264–72.

Jin, X. et al. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol*. 2003;23:1054–60.

Kampf-Lassin, A, Prendergast, BJ. Acute downregulation of Type II and Type III iodothyronine deiodinases by photoperiod in peripubertal male and female Siberian hamsters. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;193:72–8.

Kasahara, T. et al. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*. 2010;107:6412–17.

Kim, J. et al. Developmental GnRH signaling is not required for sexual differentiation of kisspeptin neurons but is needed for maximal Kiss1 gene expression in adult females. *Endocrinology*. 2013;154(9):3273–83.

Klein, DC. et al. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res*. 1997;52:307–8.

Klein, DC, Moore, RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 1979;174:245–62.

Klosen, P. et al. The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:1647–57.

Klosen, P. et al. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J*. 2013;27:2677–86.

Knutsson, A. Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)*. 2003;53:103–8.

Korf, HW, von Gall, C. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252:57–68.

Kotani, M. et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 2001;276:34631–6.

Krause, DN, Barrios, VE, Duckles, SP. Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur J Pharmacol*. 1995;276(3):207–13.

- Kubista, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95–125.
- Labyak, S. et al. Effects of shiftwork on sleep and menstrual function in nurses. *Health Care Women Int.* 2002;23:703–14.
- Laughlin, GA, Loucks, AB, Yen, SS. Marked augmentation of nocturnal melatonin secretion in amenorrheic athletes, but not in cycling athletes: unaltered by opioidergic or dopaminergic blockade. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:1321–6.
- Lavie, P. Melatonin: role in gating nocturnal rise in sleep propensity. *J Biol Rhythms.* 1997;12:657–65.
- Lee, DK. et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 1999;446:103–7.
- Liu, C. et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* 1997;19:91–102.
- Livak, KJ, Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2001;25(4):402–8.
- Lohstroh, PN. et al. Bone resorption is affected by follicular phase length in female rotating shift workers. *Environ Health Perspect.* 2003;111:618–22.
- Maestroni, GJ, Conti, A, Pierpaoli, W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol.* 1986;13:19–30.
- Malpaux, B. et al. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001;16:336–47.
- Mazzucchelli, C. et al. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;39(1-2):117–26.
- Messenger, S. et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:1761–6.
- Moore, RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res.* 1996;73:125–30.
- Nakao, N. et al. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature.* 2008;452:317–22.
- Navarro, VM. et al. Role of Neurokinin B in the Control of Female Puberty and Its Modulation by Metabolic Status. *J Neurosci.* 2012;32(7):2388–97.
- Navarro, VM, Tena-Sempere, M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8:40–53.

Negrão, AB, Licinio, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2000;44:205–14.

Ohtaki, T. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2001;411:613–17.

de Oliveira, AC. et al. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology.* 2012;153:2178–88.

Paxinos, G, Franklin, KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* 2007; 3rd ed., Amsterdam : Elsevier.

Peschke, E. et al. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res.* 2000;28(3):156–64.

Pévet, P. The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev.* 1988;28:443–58.

Pfeffer, M. et al. The Endogenous Melatonin (MT) Signal Facilitates Reentrainment of the Circadian System to Light-Induced Phase Advances by Acting Upon MT2 Receptors. *Chronobiol Int.* 2012;29(4):415–29.

Piekarski, DJ. et al. Effects of Pinealectomy and Short Day Lengths on Reproduction and Neuronal RFRP-3, Kisspeptin, and GnRH in Female Turkish Hamsters. *J Biol Rhythms.* 2014;29(3):181–91.

Prata Lima, MF, Baracat, EC, Simões, MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:987–95.

Prunet-Marcassus, B. et al. Melatonin Reduces Body Weight Gain in Sprague Dawley Rats with Diet-Induced Obesity. *Endocrinology.* 2003;144(12):5347–52.

Puchalski, SS, Green, JN, Rasmussen, DD. Melatonin effects on metabolism independent of gonad function. *Endocrine.* 2003;21(2):169–73.

Puchalski, W, Kliman, R, Lynch, GR. Differential effects of short day pretreatment on melatonin-induced adjustments in Djungarian hamsters. *Life Sci.* 1988;43(12):1005–12.

Rao, X. et al. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013;3(3):71–85.

Raskind, MA. et al. Olanzapine-induced weight gain and increased visceral adiposity is blocked by melatonin replacement therapy in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32(2):284–88.

Reiter, RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev.* 1980;1:109–31.

- Reppert, SM. et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92(19):8734–8.
- Reppert, SM, Weaver, DR, Ebisawa, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 1994;13:1177–85.
- Revel, FG. et al. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol.* 2006;16:1730–5.
- Revel, FG. et al. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8:57–65.
- Roper, RJ. et al. Interacting quantitative trait loci control phenotypic variation in murine estradiol-regulated responses. *Endocrinology.* 1999;140:556–61.
- Roseboom, PH. et al. Natural melatonin “knockdown” in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;63:189–97.
- de Roux, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:10972–6.
- Roy, D. et al. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology.* 2001;142:4711–20.
- Ruiz-Pino, F. et al. Effects and Interactions of Tachykinins and Dynorphin on FSH and LH Secretion in Developing and Adult Rats. *Endocrinology.* 2014;156(2):576–88.
- Savaskan, E. et al. Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer’s disease patients. *J Pineal Res.* 2002;32:59–62.
- Schmittgen, TD. et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 2000;285(2):194–204.
- Schwartz, MW. et al. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000;404(6778):661–71.
- Scott, AJ. Shift work and health. *Prim Care.* 2000;27:1057–79.
- Seminara, SB. et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349:1614–27.
- Sharkey, J, Olcese, J. Transcriptional inhibition of oxytocin receptor expression in human myometrial cells by melatonin involves protein kinase C signaling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):4015–9.
- Shutter, JR. et al. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev.* 1997;11(5):593–602.

- Simonian, SX, Spratt, DP, Herbison, AE. Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol*. 1999;411:346–58.
- Simonneaux, V. et al. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides*. 2009;30:146–53.
- Simonneaux, V. et al. Kisspeptins and RFRP-3 act in concert to synchronize rodent reproduction with seasons. *Front Neurosci*. 2013;7:22.
- Smith, JT, Dungan, HM. et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005;146:2976–84.
- Smith, JT, Popa, SM. et al. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2006;26:6687–94.
- Smith, JT, Cunningham, MJ. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005;146:3686–92.
- Smith, JT, Clifton, DK, Steiner, RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*. 2006;131(4):623–30.
- Soares, JM. et al. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:694–702.
- Sorrentino, S, Reiter, RJ. Pineal-induced alteration of estrous cycles in blinded hamsters. *Gen Comp Endocrinol*. 1970;15:39–42.
- Tamarkin, L, Baird, CJ, Almeida, OF. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*. 1985;227:714–20.
- Tan, DX. et al. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev*. 2011;12(3):167–88.
- Tosini, G. et al. Understanding melatonin receptor pharmacology: Latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *Bioessays*. 2014;36(8):778–87.
- Tusset, C. et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(9):646–52.
- Uz, T. et al. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;136:45–53.
- Vanecek, J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 1998;78:687–721.
- Vivien-Roels, B. et al. Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. *J Biol Rhythms*. 1998;13:403–9.
- Waldhauser, F. et al. Serum melatonin in central precocious puberty is lower than in age-matched prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73:793–6.

Wang, LM. et al. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci.* 2005;22:2231–7.

Winer, J. et al. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 1999;270(1):41–9.

Woo, MM. et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4789–97.

Woodfill, CJ. et al. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol Reprod.* 1994;50:965–76.

Yasuo, S. et al. Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci.* 2009;29:2885–9.