

ANA CAROLINA FRANCO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CAUSADAS PELO
CÂNCER SOBRE A PRODUÇÃO DE MELATONINA NA
GLÂNDULA PINEAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marília Cerqueira
Leite Seelaender

Co-orientador: Prof. Dr. José Cipolla-Netto.

SÃO PAULO

2007

RESUMO

Ferreira ACF. Avaliação das alterações causadas pelo câncer sobre a produção de melatonina na glândula pineal [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

O objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos que alteram a produção de melatonina na glândula pineal durante o processo de caquexia associada ao câncer e o papel de citocinas neste contexto. O modelo tumoral utilizado foi o Tumor de Walker 256, modelo experimental de caquexia bastante utilizado. Dentre as técnicas utilizadas para analisar o metabolismo da pineal, no que se refere à produção de melatonina, pode-se destacar as análises de atividade enzimática das principais enzimas que participam da via de síntese desse hormônio, assim como as análises de expressão gênica dessas enzimas através de RT-PCR. Também foi utilizada a técnica de cromatografia (HPLC) para avaliar a concentração de melatonina e seus precursores na pineal. Para o estudo *in vitro*, foram preparadas culturas de glândulas pineal, onde estas eram estimuladas com noradrenalina (NOR) associada ou não à pré-incubação com diferentes citocinas (TNF- α , IL-6 e IFN- γ). Dentre os resultados pode-se destacar o aumento de 2,38 vezes na produção de melatonina no grupo inoculado com tumor (GT) no ZT (“Zeitgeber Time”) 14 em relação ao grupo controle (GC). Neste mesmo grupo a atividade da enzima AA-NAT foi 2 vezes maior e sua expressão gênica apresentou aumento de aproximadamente 110%. Porém, quando as glândulas foram isoladas e colocadas em cultura, a glândula do GT produziu 33,4% menos melatonina. Esses resultados indicam uma hiperestimulação da via de sinalização intracelular, disparada pela NOR, que promove o aumento da síntese de melatonina no início da noite, nos animais inoculados com o tumor. Além disso, sugerem que fatores na circulação do rato portador do tumor estão envolvidos nesta regulação. Dentre os produtos alterados na circulação do GT, as citocinas pró-inflamatórias merecem uma atenção especial. O TNF- α foi capaz de modular a síntese de melatonina em cultura de pineal, porém, sua ação se mostrou complexa e tempo-dependente da estimulação noradrenérgica. Um efeito estimulatório foi predominante 2 h após o início da estimulação com NOR (aumento de 107,33%), já 4 h após estímulo prevaleceu um efeito inibitório (redução de 41%). Dessa forma, o TNF- α é um forte candidato a participar da modulação promovida pelo estabelecimento da síndrome da caquexia sobre a produção de melatonina *in vivo*. Porém, sozinho, não reproduz totalmente o fenômeno encontrado *in vivo*, indicando,

como esperado, a ação de diversos fatores nessa modulação. Como a melatonina é um hormônio que transmite informações circadianas e sazonais para todo o organismo, sincronizando os processos fisiológicos e metabólicos com as variações anuais e diárias do fotoperíodo, incluindo o metabolismo energético, é possível assumir que mudanças no perfil de secreção desse hormônio podem colaborar para uma perda da homeostase que facilitaria a instalação de síndromes metabólicas como a caquexia.

Palavras-chave: Melatonina, glândula pineal, caquexia, tumor de Walker 256, TNF- α , arilalquilamina N-acetiltransferase, noradrenalina.

ABSTRACT

Ferreira ACF. Evaluation of alterations caused by cancer on melatonin production in the pineal gland [thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

The purpose of this work was to investigate the mechanisms that lead to changes in melatonin synthesis in the pineal gland during cancer-related cachexia and the involvement of cytokines in this context. The tumoral model used was Walker 256 tumor, a well known cachexia-inducing tumor. The main techniques used to analyze pineal gland metabolism, related to melatonin synthesis, were the assessment of the activity of enzymes that participate in melatonin production, as well as, the gene expression of those proteins by RT-PCR. Chromatography (HPLC) was also utilized to evaluate melatonin and its precursor's levels in the pineal gland. For the *in vitro* study, pineal gland cultures were performed and glands were stimulated with noradrenalin (NOR) associated or not to cytokine pre-incubation (TNF- α , IL-6 e IFN- γ). An increase of 2.38 fold in melatonin synthesis was found in the tumor-bearing rats group (GT) at ZT ("Zeitgeber Time") 14, comparing with the control group (GC). In the same group arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) activity was 2 times higher and its expression increased by around 110%. However, when glands were isolated and cultivated, melatonin synthesis was 33.4% lower. These results indicate a hyper-stimulation of the intracellular signalization pathway, triggered by NOR, promoting melatonin synthesis increase at the beginning of the night in tumor-bearing rats. Besides, they suggest that factors from tumor-bearing rat's circulation are involved in this regulation. Among the altered factors from GT circulation, pro-inflammatory cytokines deserve a special attention. TNF- α was capable to modulate melatonin synthesis in pineal gland culture; however, its action appeared to be complex and time-dependent on noradrenergic stimulation of the pineal gland. A stimulatory effect was predominant 2 hours after NOR *in vitro* stimulation (increase of 107.33%), but 4 hours after, an inhibitory effect prevailed (reduction of 41%). Therefore, TNF- α is a strong candidate to participate in cachexia-related modulation of melatonin production. However, TNF- α alone does not reproduce completely the phenomenon found *in vivo*, indicating, as expected, the action of multiple factors in this modulation. Melatonin transmits circadian and seasonal information to all organs and cells, synchronizing physiological processes and

metabolism, including energy metabolism. Therefore, it seems quite reasonable to assume that changes in its secretion profile would lead to a loss of metabolic control that facilitates the installation of metabolic syndromes-related changes.

Key words: melatonin, pineal gland, cachexia, Walker 256 tumor, TNF- α , arylalkylamine-N-acetyltransferase and noradrenalin

1. INTRODUÇÃO

1.1 A GLÂNDULA PINEAL

As diferentes concepções filosóficas e científicas que predominaram no decorrer da história da ciência determinaram o estudo da glândula pineal ao longo do tempo, enfatizando uma ou outra de suas características funcionais. A primeira descrição e as primeiras especulações sobre a função da glândula pineal são encontradas nos “Voluminous Writings” de Galeno (aproximadamente 130-210 d.C.). No século XVII, René Descartes (1596-1650) discutiu a glândula pineal e deu-lhe a atribuição cartesiana de “sede da alma”, tendo um papel fisiológico importante no controle dos movimentos corpóreos.

Pouco progresso foi feito no estudo científico da pineal até a segunda metade do século XIX quando ela ressurgiu na história científica contemporânea a partir do livro de Kitay & Altschule de 1954, que através de uma revisão extensa da literatura recoloca a glândula pineal como objeto de estudo das Ciências Biológicas e das Ciências Médicas. O marco seguinte ocorreu, sem dúvida, em 1958 e 1959, com o isolamento e caracterização da melatonina como um hormônio da glândula pineal. A partir daí, inúmeros estudos foram desenvolvidos para esclarecer o papel funcional da pineal e de seus produtos de secreção, especialmente da melatonina.

Estes estudos mostraram que a glândula pineal, em particular seu principal hormônio, a melatonina, pode agir sobre praticamente qualquer sistema fisiológico e faz parte do plano geral de organização de todos os vertebrados. De mesma origem embriológica que os olhos laterais, o órgão pineal de peixes, anfíbios, répteis e algumas aves é diretamente fotossensível, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina de mamíferos. Nestas mesmas classes, além de sua característica endócrina, a glândula pineal mantém conexões, tanto aferentes quanto eferentes, com o sistema nervoso central (SNC) através do pedúnculo pineal. Em mamíferos, no entanto, apesar de manter seu caráter endócrino, os pinealócitos perdem sua capacidade fotorreceptiva e a pineal passa a estar sob o controle do SNC principalmente através do simpático cervical. E as influências do ciclo de iluminação ambiental passam a se dar de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas que se projetam para os neurônios pré-ganglionares através da inervação simpática periférica, atingindo a glândula pineal.

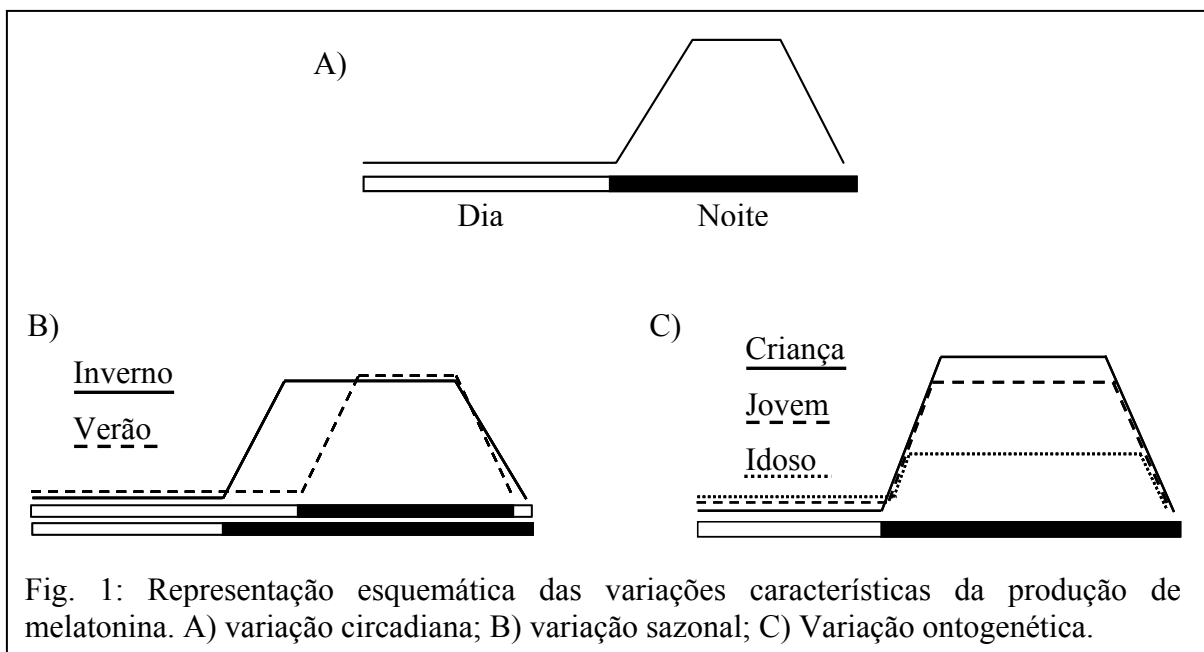
De forma direta ou indireta, a produção hormonal da glândula pineal é controlada pelo ciclo de iluminação ambiental característico do dia e da noite em todos os vertebrados. Esse

controle é tal que, na enorme maioria das espécies estudadas (seja de atividade diurna, noturna ou crepuscular), a produção de melatonina é exclusivamente noturna e a magnitude e duração de sua concentração no extracelular está na estrita dependência da duração do período de escuro (escotoperíodo) da alternância dia-noite (Fig. 1A). Dessa forma, a melatonina circulante tem, também, seu perfil plasmático variável de acordo com as noites mais longas ou mais curtas típicas das diversas estações do ano (Fig. 1B).

Essa característica do perfil de produção de melatonina permite à pineal exercer seu principal papel fisiológico: sinalizar para o meio interno, pela presença e ausência diária da melatonina na circulação e nos diversos líquidos corpóreos, se é noite ou dia no meio externo e, através da duração do seu perfil secretório noturno, qual é a estação do ano. Esse fato, associado à possibilidade de, em algumas espécies, outros fatores cíclicos ambientais, como a temperatura e a disponibilidade de alimentos, poderem modular o ciclo de produção de melatonina pela glândula pineal, faz dela a principal estrutura reguladora dos processos fisiológicos necessários à adaptação dos animais aos aspectos temporais cíclicos de seu nicho ecológico: dia ou noite, primavera, verão, outono ou inverno.

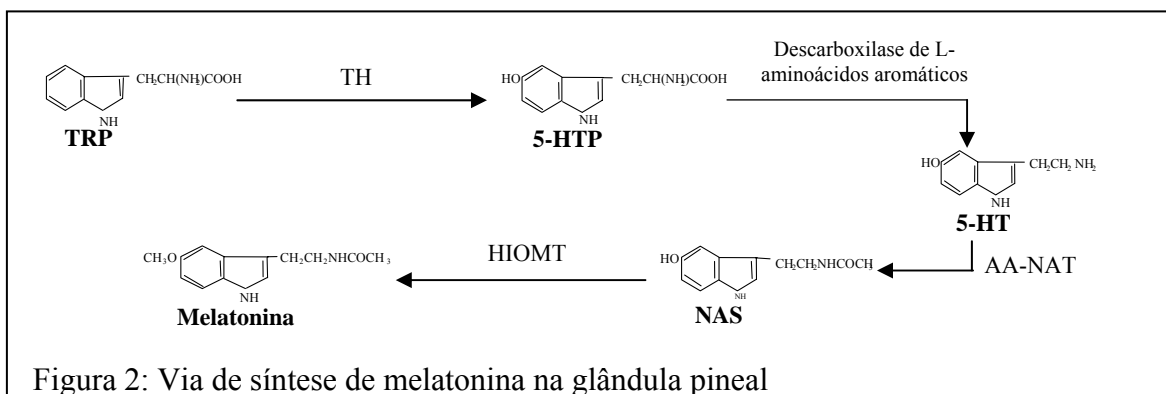
Outra característica importante a ser considerada é a variação característica do perfil plasmático diário da melatonina ao longo do desenvolvimento ontogenético dos mamíferos: a sua produção e secreção são máximas na infância, apresentam uma pequena redução na puberdade, estabilizam-se na fase de adulto jovem, reduzindo consideravelmente em animais idosos (Fig. 1C). Essa característica de produção e secreção da melatonina pela pineal fazem dela, adicionalmente, um importante marcador temporal ontogenético, promovendo processos adaptativos desde a infância até a velhice.

Em função desse papel de temporizador do meio interno (diário, sazonal e ontogenético), não é de se estranhar, assim, que a glândula pineal, através principalmente da secreção da melatonina, esteja envolvida na regulação das mais diversas funções fundamentais para a sobrevivência do indivíduo e da espécie: regulação endócrina em geral, metabólica, reprodutiva, do ciclo atividade-reposo, do sistema imunológico, cardiovascular, entre outras.

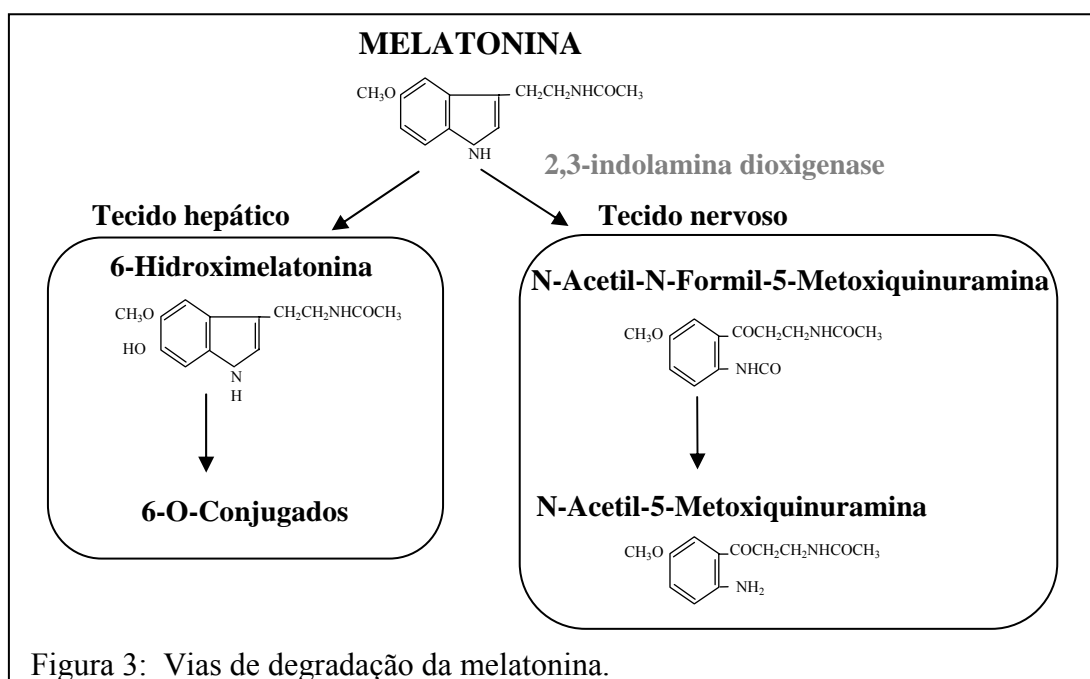


1.2 A MELATONINA

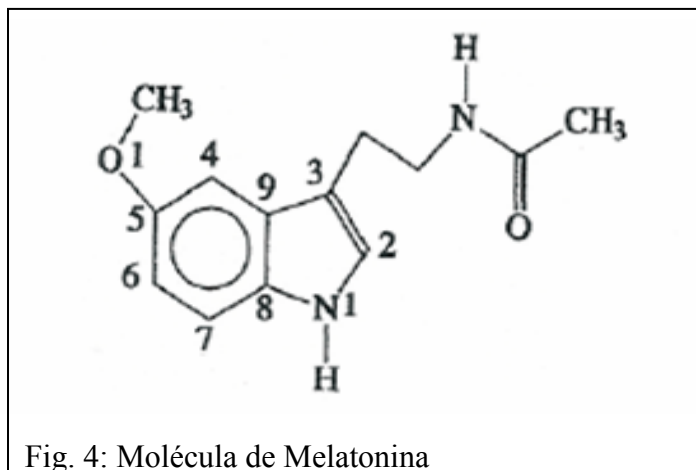
A melatonina (*N*-acetil 5-metoxitriptamina) é uma indolamina de peso molecular 232,3. A cadeia bioquímica de sua síntese inicia-se com a transformação de triptofano (TRP) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH, E.C.1.14.16.4). O 5-HTP, sob ação da descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (E.C.4.1.1.28), é transformado então em serotonina (5-HT). A 5-HT, por sua vez, é convertida em *N*-acetilserotonina (NAS) pela ação da arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AA-NAT, EC 2.3.1.87). A NAS tem o grupamento hidroxila transformado em metoxi pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT, E.C.2.1.1.4) dando origem à melatonina (Sugden, 1989) (Fig. 2).



A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos e sua metabolização periférica se dá essencialmente pela transformação hepática (aproximadamente 90% da melatonina circulante) em 6-hidroximelatonina, que, após conjugação com sulfatos (a maior parte) ou com glucoronídeos, é excretada na urina (Brown et al., 1991; Kopin et al., 1961; Kveder, Mc Isaac, 1961). O metabólito urinário, 6-sulfatoximelatonina, é um importante elemento usado em estudos clínicos não invasivos (Hirata et al., 1974). No SNC e na própria glândula pineal, a melatonina pode ser transformada em quinuraminas sob a ação da 2,3 indolamina dioxigenase (Hirata et al., 1974) (fig. 3).



A molécula da melatonina possui uma característica química de anfifilicidade devido à presença de grupamentos metoxi, no carbono 5, e do grupamento acil, ligado ao nitrogênio do grupo amina (fig.4). Isto é, a melatonina tem a propriedade de difundir-se, com igual capacidade tanto em meios hidrofílicos quanto lipofílicos.



Dessa forma, a melatonina, uma vez produzida na glândula pineal, é imediatamente secretada e liberada nos espaços perivasculares da glândula, difundindo-se daí para a circulação. Em ratos, a melatonina líquórica parece vir tanto através da circulação sanguínea quanto por secreção direta da glândula no recesso pineal. O seu transporte plasmático se dá principalmente ligado a proteínas, em especial a albumina. Assim, a mensagem hormonal transmitida pela glândula pineal é distribuída rapidamente pela circulação sistêmica a todas as estruturas centrais e periféricas e a melatonina pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo.

O pico noturno da concentração plasmática é, no rato, de aproximadamente 100 pg/ml ($0,43 \times 10^{-9}$ M). No entanto, deve-se ter cuidado ao considerar esta como a única dose “fisiológica”, uma vez que em certos tecidos e compartimentos a melatonina pode ser encontrada em concentrações mais altas (até 1000 vezes maior), como no líquido, por exemplo.

Outra característica importante da molécula de melatonina é a alta capacidade de doar elétrons dos carbonos 2 e 3 do anel pirrólico (fig. 4). Isso confere à melatonina uma alta capacidade redutora ou anti-oxidante. Ela é considerada um dos mais poderosos agentes anti-oxidantes naturais.

A melatonina é uma molécula ubiqüamente encontrada nos seres vivos. Ela pode ser encontrada em seres procariotos e eucariotos (unicelulares e pluricelulares) e diferentes mecanismos de ação mediam a função dessa molécula. Assim, dependendo do local de sua produção e da organização do ser vivo considerado, ela pode agir intracrinamente, isto é, agir no interior da própria célula que a produz. Da mesma maneira, ela pode sair da célula que a produz e exercer ações autócrinas (na própria célula), parácrinas (em células vizinhas) e endócrinas (em células-alvo localizadas à distância). No processo evolutivo a melatonina,

inicialmente, tinha como mecanismo de ação apenas a interação molécula a molécula, exercendo importante papel anti-oxidante e de regulação enzimática e, posteriormente, passou a interagir com moléculas receptoras específicas, seja de membrana, seja nucleares.

Dentre suas ações intracelulares diretas pode-se ressaltar, além de seu papel anti-oxidante, sua ação na mobilização de mecanismos reparadores do DNA; regulatória direta da atividade de várias enzimas; intra-mitochondrial, regulando o metabolismo oxidativo, o transporte de elétrons; além de regular processos de apoptose celular.

Em seres mais complexos como os vertebrados, além da melatonina ter produção e ação localizadas em diversos tecidos (retina, células do trato gastrointestinal, células imunocompetentes, células da medula óssea, etc), através de ações autócrinas ou parácrinas, ela passa a ser produzida centralmente, numa glândula endócrina, a pineal, e passa a ter uma ação hormonal sistêmica, agindo, portanto, em células-alvo localizadas à distância e caracterizadas pela presença de receptores específicos.

1.3 RECEPTORES MELATONINÉRGICOS

Como dito acima, existem receptores específicos para a melatonina tanto de membrana quanto nucleares.

Nos mamíferos estão bem caracterizados três tipos de receptores de membrana, dois dos quais já clonados (Reppert et al., 1994, 1995). Os receptores de alta afinidade, MT_1 e MT_2 pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. Em particular, ligam-se à proteína G_i , que promove uma redução na produção do AMPc. No caso do MT_1 , além de ligar-se à G_i , o receptor tem afinidade pela proteína $G_{q/11}$, o que lhe confere a característica de, dependendo das circunstâncias, aumentar a produção de diacilglicerol e IP_3 , podendo aumentar a concentração intracelular de cálcio e a atividade da proteína quinase C (PKC). Por outro lado, está demonstrado em vários sistemas que a melatonina, mediada pelo receptor MT_1 , pode ativar correntes retificadoras de potássio, diminuindo a despolarização celular e resultando numa redução do influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Os mecanismos mobilizados pela G_i quando o receptor MT_2 é ativado também podem resultar numa redução do GMPc. Além disso, sabe-se que a mobilização de proteínas G_i implica, em muitos sistemas, como no caso dos receptores de melatonina, na mobilização de dois mecanismos de transdução intracelular: um dependente do componente α (inibição da adenilato ciclase) e outro dependente do componente $\beta\gamma$, resultando na ativação da fosfolipase C.

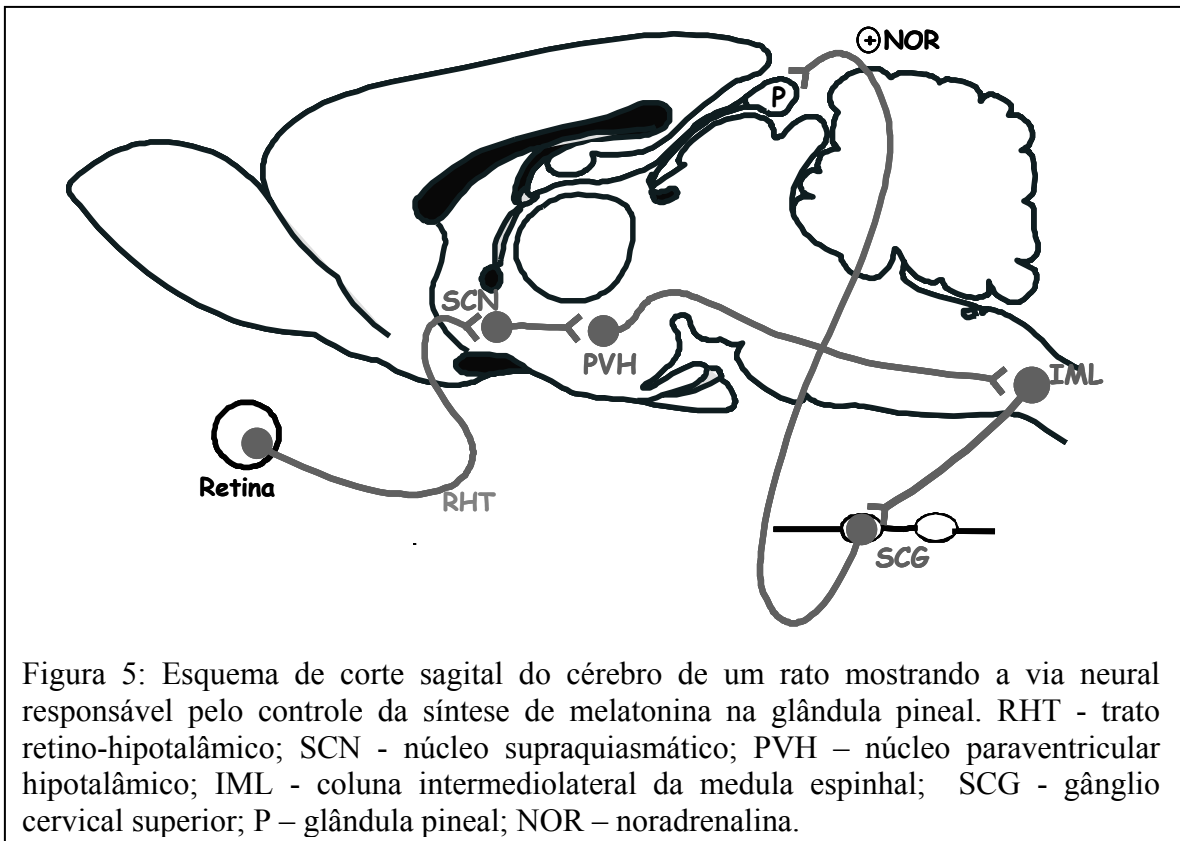
Os receptores de alta afinidade estão distribuídos por todo o organismo, desde o SNC, onde está presente em várias estruturas, até a periferia do organismo, em muitos órgãos e tecidos.

O terceiro tipo de receptor de membrana para melatonina existente 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 (Nosjean et al., 2000).

O receptor nuclear conhecido para a melatonina é um dos receptores órfãos da família dos receptores de ácido retinóico do tipo RZR/ROR α . Alguns dos efeitos atribuídos a essa interação são a expressão da enzima lipo-oxigenase e de enzimas anti-oxidantes, e a síntese de interleucina 2 (IL-2) e de seu receptor (revisão em Smirnov, 2001).

1.4 VIAS E MECANISMOS DE SÍNTESE DE MELATONINA PELA GLÂNDULA PINEAL

A via neural que regula a síntese de melatonina em mamíferos (fig. 5) inicia-se no núcleo supraquiasmático (SCN) e envolve o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVH), a coluna intermediolateral da medula espinhal (IML) e o gânglio cervical superior (SCG) (Moore, Klein, 1974; Klein, Moore, 1979; Moore, 1996; Larsen, 1999; Teclemariam-Mesbah et al., 1999). O SCN recebe a informação de luminosidade através do trato retino-hipotalâmico (RHP), que o liga à retina. Então, durante o dia, quando a luminosidade incide na retina, o RHP estimula o SCN, que por sua vez inibe o PVH, bloqueando toda a via subsequente. Já durante a noite, com a ausência de luz, não ocorre estimulação do SCN, que então interrompe a inibição sobre o PVH e este pode assim estimular a IML. Em seguida ocorre a estimulação do SCG, que através do nervo conário promove a liberação de noradrenalina (NOR) nos terminais simpáticos da glândula pineal. Sendo NOR o estimulador fisiológico da produção de melatonina, essa via neural garante a característica de produção exclusivamente noturna deste hormônio (revisão em Simonneaux, Ribelayga, 2003).



A noradrenalina liberada nas proximidades dos pinealócitos no período noturno liga-se a receptores α e β -adrenérgicos presentes na membrana dessas células (fig. 5). A partir da interação com os receptores β (subtipo β_1) há indução do aumento do AMPc intracelular através da ativação de uma proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilato ciclase. A ativação dos receptores α (sub-tipo α_{1B}) ativa uma proteína Gq ligada à estimulação da fosfolipase C, gerando 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 citoplasmático. O aumento do cálcio induzido por noradrenalina caracteriza-se por um pico seguido de um platô. A rápida elevação do cálcio deve-se à liberação do retículo (Schaad et al., 1995) e o platô que se segue parece dever-se à entrada de cálcio pelos canais da membrana plasmática responsáveis pela reposição dos estoques intracelulares (os “SOCs”) (Gomperts et al., 2002).

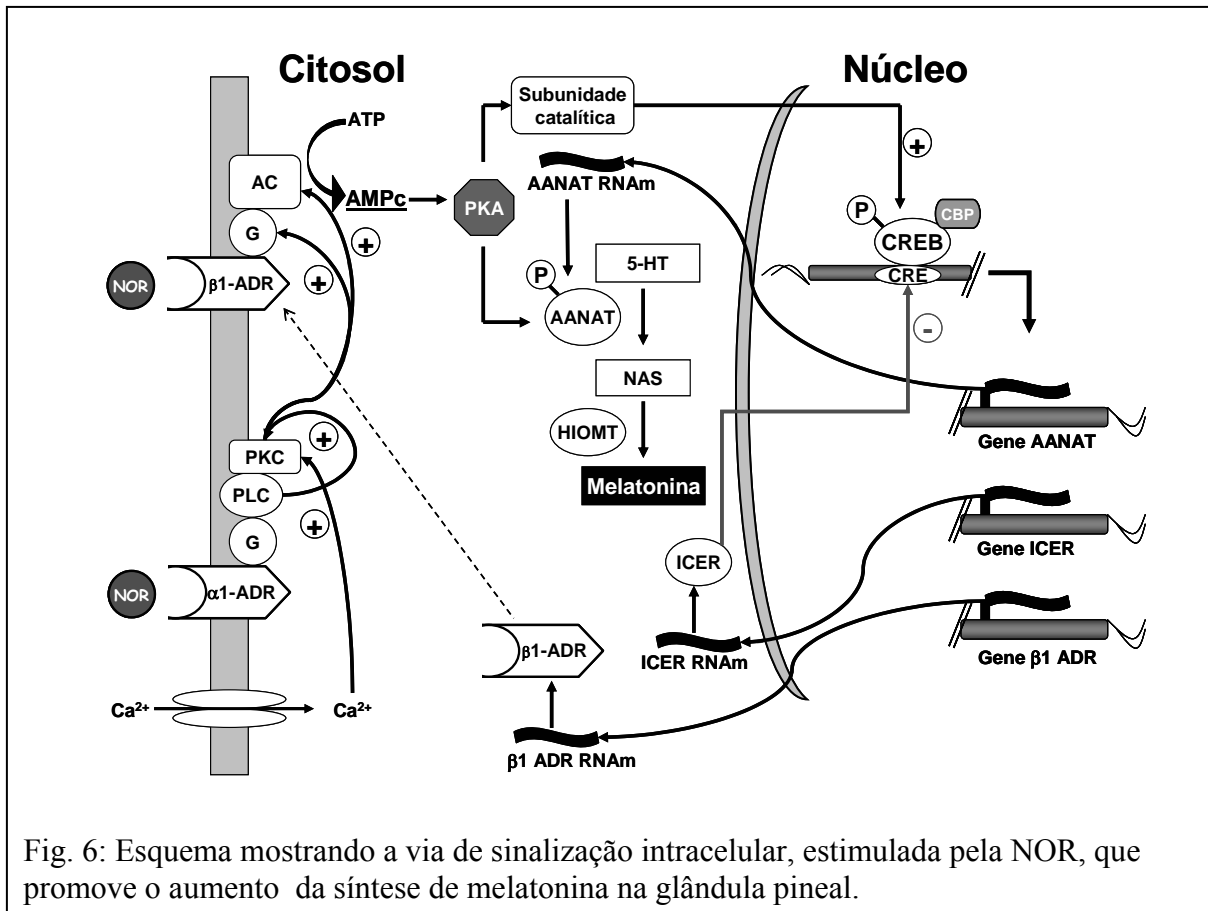


Fig. 6: Esquema mostrando a via de sinalização intracelular, estimulada pela NOR, que promove o aumento da síntese de melatonina na glândula pineal.

O cálcio e o diacilglicerol ativam a 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 (Klein et al., 1983; Sugden, 1989; Sugden et al., 1985, 1986, 1987). 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).

No rato o AMPc ativa a proteína quinase A do tipo II (PKA) (Maronde et al., 1999), que fosforila um fator de transcrição, a proteína CREB (“cAMP response element binding”), que, assim fosforilada, promove a ativação da transcrição e tradução gênica da enzima passo-limitante da síntese de melatonina, a AA-NAT. A presença da CREB fosforilada é muito importante também para a manutenção da atividade da AA-NAT, pois, quando a CREB é desfosforilada, se tem uma rápida queda na atividade da enzima (Klein et al., 1996; Koch et al., 2003; Roseboom, Klein, 1995; Tamotsu et al., 1995).

O CREB fosforilado também estimula a transcrição do gene do receptor β_1 adrenérgico (β_1 ADR), o que vai potencializar a estimulação noradrenérgica (Collins et al., 1993). Entretanto, a estimulação adrenérgica via CREB 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 AA-NAT. 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 e JunB, que também poderiam estar promovendo a queda circadiana da atividade da AA-NAT (Baler & Klein, 1995; Spessert et al., 2000).

A concentração de triptofano na pineal é maior do que em qualquer parte do SNC. O transporte de triptofano no SNC se dá através de um sistema de transporte de aminoácidos neutros, e, assim, um sistema semelhante a esse poderia estar carregando o triptofano para dentro dos pinealócitos (Sugden et al., 1989). A enzima TPH é responsável pela transformação de triptofano em 5-HTP e é a enzima passo-limitante na síntese da 5-HT. Essa enzima não parece estar saturada com relação ao seu substrato uma vez que a administração de triptofano produz um aumento dos níveis de 5-HT na pineal (Young & Anderson, 1982).

Na glândula pineal do rato a enzima TPH apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados no período noturno, fazendo com que a síntese de 5-hidroxitriptofano concentre-se durante a noite. Esse aumento de cerca de 2 vezes na atividade durante à noite deve-se tanto à sua síntese aumentada, pela indução de transcrição gênica e síntese protéica, como à ativação da enzima por fosforilação (Besançon et al., 1996; Sitaram, Lees, 1978; Shibuya et al., 1978). 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 PKA. A PKA, pela fosforilação da proteína CREB promove a transcrição da enzima TPH (Boadle-Biber, 1980; Ehret et al., 1991; Shein, Wurtman, 1971; Sitaram, Lees, 1984). A fosforilação da TPH pode ser feita pela PKA, pela quinase dependente de cálcio e calmodulina (CaMK) e pela PKC (Ehret et al., 1989, 1991; Johansen et al., 1995, 1996; Kuhn et al., 1978; Simonneaux, Ribelayga, 2003)

A regulação da atividade da TPH também é feita através de sua associação com a proteína 14-3-3. A TPH fosforilada pela CaMK, PKC ou pela PKA liga-se à proteína 14-3-3, aumentando, assim, a sua atividade e impedindo a sua desfosforilação (Ichimura et al., 1987, 1995; Banik et al., 1997; Klein et al., 2003). Baltatu et al. (2000) demonstraram que a expressão da TPH está, também, na dependência de uma ação da Angiotensina II em receptores do tipo AT₁.

A atividade da enzima TPH é dependente de oxigênio, requer a pteridina reduzida como um co-fator e, também, o grupamento tiol parece estar envolvido na modulação de sua

atividade (Frazer, Hensler, 1994). Ainda, a sua atividade pode ser estimulada por Fe^{2+} e ditiotreitol, e pelos fosfolipídeos de membrana, através da indução de sua associação à membrana plasmática (Hamon et al., 1978; Imai et al., 1989; Kuhn et al., 1978).

A concentração de 5-HT na glândula pineal é mais alta do que em qualquer outro tecido corpóreo. A 5-HT apresenta uma variação circadiana, com altas concentrações durante o período claro e baixas concentrações no período escuro (Klein et al., 1992; Mefford et al., 1983). A enzima conversora do 5-HTP em 5-HT, a descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, parece ser a mesma que atua na descarboxilação da DOPA produzindo dopamina (Frazer e Hensler, 1994).

A redução de 5-HT à noite deve-se a dois fatores: a ativação da AA-NAT pela estimulação noradrenérgica, transformando-o em NAS; e a liberação de 5-HT das glândulas pineais, também induzida pela estimulação noradrenérgica (Walker, Aloyo, 1985; Aloyo, Walker, 1987; Aloyo, Walker, 1988). A ocorrência de secreção de 5-HT também é facilitada pela sua localização intracelular em vesículas citoplasmáticas semelhantes a estruturas secretórias (Juillard, Collin, 1980).

A 5-HT secretada tem papel na própria pineal, atuando através dos seus receptores do tipo 5-HT₂ e aumentando a síntese de melatonina induzida por noradrenalina (Aloyo, Walker, 1988; Olcese, Munker, 1994; Sugden, 1990).

Durante o dia (ou na ausência de estimulação noradrenérgica quando de glândulas em cultura), a 5-HT dos pinealócitos é desviada para a via desaminativa-oxidativa, onde sofre a ação da MAO B (E.C.1.4.3.4.; monoamina: O₂ oxidoreductase), sendo transformada em 5-hidroxi-indolaldeído, que, sob a ação da aldeído desidrogenase (E.C.1.2.1.3), transforma-se em ácido 5-hidroxi-indolacético ou, sob ação da álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.2), transforma-se em 5-hidroxitriptofol. Estes dois produtos podem ser O-metilados sob a ação da HIOMT, produzindo, respectivamente, o ácido 5-metoxi-indolacético e 5-metoxitriptofol (Klein et al., 1981).

A AA-NAT é a enzima passo-limitante da síntese de melatonina, pois ela apresenta um aumento de 100 vezes na sua atividade no período noturno, deslocando o metabolismo da 5-HT para a produção de NAS e, em seguida, melatonina.

Trata-se de uma enzima instável e cuja manutenção da atividade depende de muitos fatores. Quando cessa a estimulação simpática, se administra antagonistas adrenérgicos ou se submete o animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AA-NAT cai com uma meia vida de aproximadamente 3 min (Cipolla-Neto, Afeche, 1999; Deguchi, Axelrod, 1972; Klein, Weller, 1972; Klein et al., 1978; Parfitt et al., 1976).

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 AA-NAT está fosforilada, ocorre ligação da mesma com a proteína 14-3-3, ligação essa que se dá através do sítio da enzima fosforilado pela PKA, formando, então, um complexo AA-NAT-14-3-3 (Ganguly et al., 2001). Essa associação impede que a AA-NAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteassomal (Gastel et al; 1998). Além disso, a proteína 14-3-3 promove aumento da atividade da AA-NAT.

O rápido aumento na formação de AMPc no início da estimulação noradrenérgica provavelmente é necessário para induzir a transcrição e tradução do RNAm da enzima AA-NAT e as concentrações menores de AMPc devem ser adequadas para manter a atividade da AA-NAT, impedindo a sua proteólise (Sugden, 1989).

Em algumas espécies de mamíferos, como ovinos e primatas, o principal mecanismo de ativação da AA-NAT se dá pela inibição da proteólise proteassomal à noite, sendo muito pequena a variação diária do RNAm da enzima (Garidou et al., 2001; Gastel et al; 1998).

A atividade da enzima HIOMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes (Ribelayga et al., 1999; Simonneaux, Ribelayga, 2003).

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

O neuropeptídeo Y (NPY) tem um efeito estimulatório sobre a atividade da HIOMT, potenciando a síntese de melatonina (Ribelayga et al., 1997). Esse efeito estimulatório se dá pela entrada de cálcio nos pinealócitos. O NPY também está envolvido na regulação do ritmo de atividade da HIOMT. Estudos *in vivo* demonstraram que a atividade da HIOMT é significativamente correlacionada com a concentração do NPY, que tem um ritmo diário e sazonal (Shinohara, Inouye, 1994).

A regulação adrenérgica da atividade da HIOMT, diferentemente da AA-NAT e da TPH, parece ocorrer em longo prazo, pois em trabalhos com animais expostos à luz constante ou que tiveram removidos os seus gânglios cervicais superiores verificou-se que houve uma

redução na atividade da HIOMT, mas os níveis basais dos RNAs da enzima não estavam alterados (Sugden, 1989).

1.5 AÇÕES FISIOLÓGICAS DA MELATONINA

Atualmente sabemos que a melatonina é um hormônio que possui diferentes funções; atuando como um agente endócrino ou parácrino (Stefulj et al., 2001). Como função mais abrangente, a melatonina ajusta a resposta do organismo às condições de escuro, permitindo que haja uma adaptação às atividades e desempenhos noturnos de cada animal. Na maioria dos órgãos e tecidos a chegada da melatonina ocorre pela via circulatória e, portanto, reflete a atividade da glândula pineal.

Além de sua ação hormonal sobre ritmos diários, a melatonina pode ainda desempenhar várias outras funções fisiológicas.

A melatonina está envolvida na adaptação sazonal das funções reprodutivas (Bittman et al., 1983; Hazlerigg et al., 1996b; Malpaux et al., 1998). Esse efeito envolve a modulação da secreção do hormônio luteinizante pela sua ação no hipotálamo (Malpaux et al., 1998). Na década de 1950 acreditava-se que a ação fisiológica da glândula pineal estava ligada apenas à reprodução (Reiter, 1980). Numerosas publicações sugeriam que a melatonina tinha ação pró-gonadotrófica, enquanto outras, não menos relevantes em número, apontavam a ação do hormônio da pineal como anti-gonadotrófico. Nos anos 60 constatou-se que em animais de longo período de gestação (ex. ovinos) a melatonina é um hormônio pró-gonadotrófico, enquanto em animais com curtos períodos de gestação (hamster) a melatonina é antigonadotrófica (Markus et al., 2003).

Na retina, a melatonina possui uma função parácrina, sendo produzida de forma rítmica e local, e tem como função adaptar os animais ao escuro. A melatonina inibe a liberação de dopamina (Dubocovich, 1983) e esta inibição provoca uma modificação da adaptação à luz induzida pela dopamina e, portanto, a fotopercepção. Estas observações permitem sugerir que a melatonina é o neurotransmissor retiniano que induz a visão de noite e diferente da dopamina, que induz a visão de dia (Cahill, Besharse, 1995).

Na década passada, descobriu-se que a melatonina é um forte e efetivo eliminador (“scavenger”) de radicais livres e um antioxidante geral (Tan et al., 1993). Nos anos seguintes, esses efeitos da melatonina foram documentados em inúmeras publicações e foi demonstrado que ela reduz o dano oxidativo em vários modelos experimentais (Reiter et al., 2002; Tan et al., 2002; Reiter et al., 2000b; Allegra et al., 2003; Reiter et al., 2001). A melatonina

diretamente neutraliza várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são tóxicas para o organismo (Tan et al., 2002; Allegra et al., 2003) e, além disso, tem ações antioxidantes indiretas, incluindo a estimulação da síntese de outro importante antioxidante intracelular, a glutatona (GSH) (Urata et al., 1999). A melatonina ainda preserva a integridade funcional de outras enzimas antioxidantes, como a superoxide dismutase e catalase e pode também reduzir a geração de radicais livres na mitocôndria, melhorando a fosforilação oxidativa (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Reiter, 2003).

Quanto aos efeitos da melatonina sobre o sistema imunológico, os primeiros estudos relataram que ratos pinealectomizados possuíam um timo estruturalmente modificado e que o tratamento com melatonina ou transplante de pineal preveniam a involução tímica em ratos velhos. Esses resultados levaram a concepção de que a melatonina poderia afetar o sistema imunológico (revisão em: Provinciali et al., 1996; Liebmann et al., 1997; Reiter et al., 2000a; Maestroni, 2001). *In vivo*, altas doses de melatonina exógena promove uma estimulação geral do sistema imunológico, aumentando a atividade de células T, o crescimento linfocitário, a resposta humoral, e pode inibir a involução tímica promovida pelo envelhecimento. *In vitro*, a melatonina também aumenta a atividade de células T “helper” e “natural killer” (NK), a produção de IL-2 e interferon gama, e a expressão gênica da IL-1 em monócitos humanos. Resumindo, a maioria dos autores concorda que a melatonina possui um efeito imunestimulatório. Esse efeito pode ocorrer via ação direta da melatonina em seus receptores, já que receptores de melatonina foram identificados em vários tecidos do sistema imunológico. Além disso, a melatonina, agindo como um cronobiótico, pode estar envolvida na organização circadiana do sistema imunológico (Simonneaux, Ribelayga, 2003). Também já foi proposto que a melatonina pode mediar variações sazonais da função imune, que é aumentada em dias curtos, quando o pico noturno de melatonina é mais longo (Nelson, Drazen, 2000).

A melatonina também já se mostrou envolvida em outros processos, dentre os quais: 1) metabolismo energético, já que possui a capacidade de potencializar a ação da insulina (Lima et al., 1994; Alonso-Vale et al., 2005); 2) regulação do desenvolvimento e plasticidade neural durante o desenvolvimento fetal e; 3) proteção cardio-vascular, já que age em vasos periféricos provocando vaso dilatação e possui ação anti-hipertensiva (Sewerynek, 2005).

Por último, a melatonina também é utilizada farmacologicamente. Ela possui propriedades analgésicas, anticonvulsivas e ansiolíticas (Golombek et al., 1996). Seus efeitos cronobióticos têm sido utilizados para resincronização de ritmos vigília/sono e atividade/repouso em pacientes cegos e para casos de defasagem horária e trabalho noturno (Arendt et al., 1997; Middleton et al., 1997). A melatonina também exerce efeitos terapêuticos

sendo, por exemplo, capaz de induzir sono sem afetar a fase circadiana de outros parâmetros (Folkard et al., 1990). No homem, esse efeito ocorre paralelamente a uma diminuição da temperatura corporal (Cardinali, Pévet, 1998).

1.6 A MELATONINA E O TUMOR

Várias evidências da eficácia da melatonina na redução do crescimento tumoral vêm sendo acumuladas e, apesar da maioria dos trabalhos resultarem da experimentação animal (Blask et al., 2002; Sauer et al., 2001), estudos com humanos (Lissoni, 2002) com uma grande variedade de diferentes cânceres também sugerem uma ação oncostática da melatonina (Reiter, 2003).

Uma definição amplamente aceita para “tumor” é a de que este seria uma massa de tecido anormal, que possui um crescimento desordenado e maior do que o apresentado por tecidos normais, permanecendo este comportamento mesmo após o fim do estímulo que o provocou (Wills, 1952). Caso o foco tumoral formado apresente a capacidade de migrar e estabelecer colônias secundárias (metástases) diz-se que o tumor é de natureza maligna ou um câncer (Junqueira, 2000). Esta patologia apresenta um aspecto único pois sua natureza exige que ocorram modificações no DNA das células (Trichopoulos et al., 1996).

Assim como ocorre na função da melatonina de promover o sono, sua concentração que reduz a proliferação de células cancerígenas, o crescimento tumoral e a incidência de metástase, varia da fisiológica à farmacológica. Se, de fato, concentração fisiológica de melatonina restringe o crescimento tumoral, a redução da produção de melatonina associada ao envelhecimento pode contribuir para o aumento da incidência de câncer em idosos. Também existem evidências que indicam que a eficácia da melatonina em limitar a proliferação de células tumorais depende da hora do dia de sua administração. Se a melatonina é dada no final da fase clara, seu efeito é mais eficaz (Sauer et al., 2001).

Sabe-se também que a melatonina pode ser, em casos individuais, um inibidor de carcinoma mamário e ovariano humano (Bartsch et al., 2000). Este hormônio tem o potencial de atrasar marcadamente o aparecimento do tumor mamário palpável (Rao, 2000) e, segundo Kumar et al. (2000), a melatonina pode funcionar como um agente anti-mutagênico e oncostático endógeno.

Em humanos, o uso de melatonina, em alguns casos, reduz o crescimento tumoral e prolonga a sobrevivência dos pacientes portadores câncer quando comparados com indivíduos tratados com a terapia convencional para câncer (Lissoni, 2002). Um fato importante é que a

administração da melatonina, quando combinada com quimioterapias padrão, freqüentemente melhora a qualidade de vida. Essa ação provavelmente está relacionada à habilidade da melatonina em reduzir a toxicidade de agentes quimioterápicos (Reiter et al., 2002). Esses achados em humanos são ainda mais marcantes pelo fato da melatonina ser usada no tratamento de câncer apenas depois das terapias convencionais serem consideradas realmente ineficientes.

Em termos de mecanismo de ação, o modo como a melatonina inibe a proliferação de células tumorais já foi parcialmente definido e aparentemente envolve diferentes mecanismos. No caso de hepatomas experimentais e enxertos heterólogos de câncer humano de pulmão, a melatonina age em receptores específicos de membrana, limitando o transporte de ácido linoleico (LA), um fator de crescimento para as células tumorais (Blask et al., 2002). Com a diminuição do consumo de LA, a concentração intracelular do ácido 13-hidroxiotadecadienoico (13-HODE) diminui e, sendo o 13-HODE uma molécula mutagenicamente ativa que normalmente aumenta a proliferação celular dos tumores via MAPK, sua redução contribui para interromper o crescimento tumoral.

Existe uma variedade de outras ações que foram implicadas para explicar os efeitos oncostáticos da melatonina. Em cânceres dependentes de estrógeno, como o câncer de mama, sabe-se que a melatonina reduz a expressão gênica do receptor de estrógeno (Molis et al., 1994). Outros mecanismos em potencial são representados pela capacidade da melatonina de reduzir a angiogênese no tecido tumoral (Lissoni, 2001), de atrasar a transição da fase G1 para S do ciclo celular, de melhorar a comunicação celular entre células normais e cancerígenas e de alterar o status redox intracelular (Reiter, 2003).

Além de inibir tumores já estabelecidos, a melatonina pode também diminuir a gênese tumoral. Como antioxidante, a melatonina é particularmente efetiva na redução de danos ao DNA mediado por radicais livres (Karbownik et al., 2001). O DNA danificado, se não for reparado, pode promover uma mutação e iniciar um tumor. Como uma porção significativa da aquisição de câncer em humanos envolve inicialmente danos ao DNA como consequência de produtos tóxicos de oxigênio e nitrogênio, acredita-se que antioxidantes que protegem o DNA desse tipo de dano reduzem a incidência de câncer. São grandes as evidências de que a melatonina protege o DNA deste tipo de dano mais eficientemente que outros antioxidantes clássicos (Karbownik et al., 2001; Reiter, 2003).

1.7 A CAQUEXIA

A instalação do tumor no organismo promove uma série de mudanças que podem resultar na morte do paciente. Na maioria dos casos, a causa da morte é uma condição denominada caquexia (do grego Kakos “mal, ruim” e hexis “condição do corpo”) (Beutler, 1998). Esta condição não é exclusiva do câncer, mas também está presente em várias outras doenças, como falência cardíaca, sepsis, diabetes e AIDS (Brink et al., 2002).

Entre os sintomas mais comuns da síndrome da caquexia, destacam-se depleção e redistribuição dos substratos energéticos do organismo, má absorção intestinal, diarreia, anomalias hídricas e eletrolíticas, rápida e acentuada perda de peso, fraqueza progressiva (astenia), perda de apetite (anorexia) e balanço nitrogenado e calórico negativo (revisão em Lawson et al., 1982; Fearon, Carter, 1988; Williams, Siddiqui, 1990).

A etiologia da caquexia é complexa e não há, até o presente momento, consenso sobre os fatores que deflagram e mantêm o quadro. Fatores secretados pelo tumor em crescimento estão aparentemente implicados na mobilização de ácidos graxos e proteínas (Tisdale, 1999). Contudo, a concepção da síndrome como um estado inflamatório crônico, no qual a reação do hospedeiro à presença do tumor aparece como principal agente causal, tem tomado impulso (Lundholm et al., 2004; McCarthy, 2003; Fearon, Moses, 2002). As citocinas têm um papel de grande importância na patogênese da caquexia. O fator de necrose tumoral α (TNF- α), as interleucinas (IL-1 e IL-6), o interferon- γ (IFN- γ) e as prostaglandinas, fatores cuja concentração está alterada na caquexia, induzem diversos dos sintomas relacionados à síndrome (Fearon, Moses, 2002; Argilés et al., 2003b).

A melatonina, além de diminuir a proliferação de células tumorais, tem a capacidade de melhorar o quadro caquético desenvolvido nos hospedeiros. Isso porque a melatonina exerce um importante controle sobre o transporte de ácidos graxos nos depósitos de gordura e nos tumores (Sauer et al., 2001), o que diminui a depleção dos estoques de gordura, diminuindo a perda de peso e, conseqüentemente, melhorando o quadro de caquexia. Outra importante ação imputada à melatonina, que também auxilia no controle da síndrome da caquexia, é a de diminuir a concentração plasmática de TNF- α (Lissoni, 1996). Estudos sugerem que a caquexia neoplásica depende, pelo menos em parte, do aumento da produção de TNF- α (Beutler, Cerami, 1986). Logo, uma redução nas concentrações de TNF- α pode contribuir para melhorar o quadro caquético.

A complexa inter-relação entre as necessidades dos tecidos por metabólitos essenciais e os hormônios circulantes está bastante alterada no indivíduo portador de tumor. Isto ocorre

não apenas pela demanda de metabólitos essenciais para o crescimento do tecido tumoral, mas possivelmente, pela ação direta de secreções do tumor sobre os órgãos endócrinos (Goodlad, 1964).

Segundo Seelaender et al. (1996), a capacidade de produção e secreção hormonal pode ser comprometida, possivelmente, pela ausência de precursores disponíveis ou por deficiência na atividade enzimática das glândulas endócrinas na fase tardia da caquexia. Em ratos, na fase final da caquexia provocada pelo tumor de Walker 256, um carcinosarcoma de crescimento rápido, ocorre uma redução na secreção de insulina pelo pâncreas em resposta a altas concentrações de glicose, acompanhada por um fluxo alterado de Ca^{2+} . Como o Ca^{2+} tem papel chave na regulação da secreção de insulina pelas células β pancreáticas, esse pode ser o mecanismo responsável pela secreção prejudicada deste hormônio (Fernandes et al., 1991).

1.8 O CÂNCER E A GLÂNDULA PINEAL

Embora muitos estudos sejam realizados sobre a ação da melatonina em tumores e na síndrome da caquexia, poucos estudam a ação dos tumores, incluindo seus produtos e as alterações metabólicas causadas por sua instalação no organismo, sobre o padrão de produção e secreção de melatonina, isto é, sobre a glândula pineal.

Alguns trabalhos mostram que durante o desenvolvimento tumoral a concentração plasmática de melatonina encontra-se alterada. Lissoni et al. (1986) encontrou alta concentração plasmática de melatonina em vários pacientes portadores de tumor. Por outro lado, Bartsch et al. (1994) mostrou uma depressão na concentração plasmática de melatonina em função do tumor em estudos com pacientes portadores de câncer de próstata ou de pulmão. No mesmo trabalho de Bartsch et al. (1994), os resultados demonstram que pacientes com tumores de grau de desenvolvimento médio e grande não têm ritmo circadiano de melatonina significativo.

Mais recentemente, um estudo mostrou que em pacientes portadores de tumores primários de diferentes tipos histológicos, incluindo tanto tumores endócrino dependentes quanto independentes, há uma tendência de diminuição da concentração de melatonina circulante (Bartsch, Bartsch, 1999).

Segundo Bartsch (1997), seus resultados, obtidos com pacientes portadores de câncer de pulmão ou próstata através da análise da concentração de melatonina plasmática, favorecem a concepção de uma modulação da atividade secretória de melatonina da pineal pelo crescimento tumoral. Porém, isto só seria possível caso a melatonina circulante refletisse

caquexia-anorexia pela produção e ação local em regiões cerebrais específicas (Plata-Salamán, 2000). Estes dados reforçam uma função para citocinas cerebrais como mediadores de manifestações de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas e na comunicação cérebro - sistema periférico (ex. através do sistema nervoso autônomo) (Plata-Salamán, 2000).

Mecanismos neurais que merecem atenção significativa na síndrome de caquexia-anorexia são aqueles que resultam de interações entre citocinas, peptídeos/neuropeptídeos e neurotransmissores. Estas interações podem resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou atividades antagonistas e pode envolver modificações de moléculas de transdução e mediadores intracelulares. Assim, estes dados mostram que a síndrome de caquexia-anorexia é multifatorial e que entender a interação entre mecanismos periféricos e cerebrais é essencial para a caracterização da patofisiologia integrativa desta síndrome (Plata-Salamán, 2000).

As citocinas podem interagir com o sistema nervoso de diferentes maneiras, incluindo a via de transporte de citocinas da circulação periférica para o SNC através da barreira hemato-encefálica e órgãos circunventriculares (que carecem da barreira hemato-encefálica, como a glândula pineal), transporte axonal retrogrado de citocinas, indução da geração de mediadores químicos pelas citocinas (ex. prostaglandina e óxido nítrico) e comunicação sistema periférico – cérebro via sinais de fibras neurais aferentes (Plata-Salamán, 2000).

A ação das citocinas nos mecanismos neurais centrais pode ser direta (via modulação dos processos neurais) ou indireta (via modulações neuroquímicas). As citocinas podem agir diretamente nos neurônios que se propõem participar do controle da alimentação na área hipotalâmica lateral, núcleo hipotalâmico ventromedial e paraventricular (Plata-Salamán, 2000), núcleo este que participa do controle neural do metabolismo da glândula pineal.

Sabendo-se desta atividade de citocinas sobre o sistema nervoso é possível imaginar que haja uma ação das citocinas envolvidas no processo tumoral sobre a glândula pineal.

Maestroni, em 1998, colocou que as citocinas envolvidas na ação imune-hematopoiética da melatonina, como IL-1, IL-2 e IFN- γ , podem influenciar a produção de melatonina pela glândula pineal. Isso porque a glândula pineal localiza-se fora da barreira hemato-encefálica e alguns trabalhos mostram que o IFN- γ pode afetar diretamente a síntese de melatonina na glândula pineal (Withyachumnarnkul et al., 1990a, 1990b). Outro trabalho mostra que citocinas hematopoiéticas como GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony stimulating factor”) também podem influenciar a produção de melatonina (Zylinska et al., 1995).

Trabalho utilizando um carcinosarcoma localizado e de crescimento lento mostrou aumento na estimulação das células do sistema imune durante o desenvolvimento tumoral

a sua secreção pela pineal e não fosse alterada por um metabolismo modificado do hormônio da pineal. O metabolismo de melatonina pode estar alterado por uma maior utilização de melatonina pelo organismo portador do tumor. Esta maior utilização de melatonina pode ser explicada por uma maior demanda metabólica por melatonina devido às várias ações anticarcinogênicas deste hormônio.

Nosso trabalho anterior (Ferreira et al., 2004) mostrou uma alteração do padrão de produção/secreção de melatonina pela glândula pineal em função do desenvolvimento do tumor de Walker 256. Também foi encontrada uma secreção circadiana média de melatonina aumentada 2,8 vezes em relação ao grupo controle para o grupo sacrificado 14 dias após a inoculação tumoral. Esses resultados contribuem para a idéia de que o crescimento tumoral modula a produção de melatonina pela pineal. Sendo assim, seria o metabolismo alterado de melatonina que estaria levando a uma menor concentração plasmática deste hormônio como foi encontrado por Bartsch (1994).

1.9 AS CITOCINAS E A GLÂNDULA PINEAL

Tendo em vista todos estes trabalhos, resta ainda entender como o desenvolvimento do tumor e o estabelecimento da síndrome da caquexia estariam alterando o metabolismo da glândula pineal. São ainda poucos os trabalhos realizados nesta área, provavelmente porque o cérebro foi, durante muito tempo, considerado um sítio imunologicamente privilegiado, no qual nem células ou fatores do sistema imune poderiam entrar e modificar suas funções sob condições fisiológicas normais e porque se pensava que o sistema imune era regulado apenas por fatores hematopoiéticos (Lawrence, 2000).

Porém, sabe-se agora que o sistema imune, endócrino e nervoso têm influências regulatórias bidirecionais, assim como sobreposição comum, em termos de receptores e ligantes para estes receptores (Lawrence, 2000). Além disso, sabe-se que células e fatores imunológicos (citocinas) podem trafegar dentro do cérebro na ausência de patologias (Lawrence, 2000) e a imunização periférica aumenta o número de células do sistema imune trafegando pelo cérebro (Sandberg-Wollheim et al., 1986).

A expressão de citocinas não é restrita às células do sistema imune, pois neurônios e células da glia, assim como células musculares, também podem produzir inúmeras citocinas (Van Meir, 1995). Citocinas das células periféricas, assim como as produzidas endogenamente pelas células do SNC, podem influenciar múltiplas funções do SNC (Lawrence, 2000). Dados mostram que citocinas podem estar envolvidas no processo de

(Bartsch et al., 1995). Provavelmente linfócitos T helper-1 são ativados pelos antígenos de superfície do tumor e em resposta produzem IL-2 (Bartsch, Bartsch, 1997). Estudos mostraram que esta citocina estimula a produção de noradrenalina (Baker et al., 1989), podendo assim promover uma maior expressão e ativação da AA-NAT e, conseqüentemente, aumentar a produção de melatonina pela pineal (Bartsch, Bartsch, 1997).

A infusão periférica de IL-1 aumenta a concentração de triptofano e 5-HT no SNC, enquanto que a infusão intracerebral de IL-1 aumenta a frequência de transmissão de impulsos neurais e a secreção de 5-HT. Durante o crescimento tumoral ocorre o aumento da produção/secreção de IL-1 que facilita o suprimento de triptofano para o SNC (Laviano, 1996). Este aumento de triptofano circulante e no SNC que ocorre com a liberação de IL-1 durante o desenvolvimento tumoral, pode levar a um aumento da produção de melatonina, visto que triptofano é o substrato desta síntese.

Uma importante citocina envolvida no mecanismo neuroimunomodulatório da melatonina é o TNF- α . Sabe-se que a melatonina tem um efeito inibitório sobre a produção de TNF- α (Di Stefano, Paulesu, 1994) e alguns estudos sugerem a existência de um mecanismo de “feedback” operando entre a glândula pineal e o TNF- α (Lissoni et al., 1994; Fernandes et al., 2006).

O TNF- α é um dos principais mediadores da síndrome da caquexia, já que é responsável por grande parte das alterações metabólicas características desta síndrome paraneoplásica (Argiles et al., 2006) e doses crescentes de TNF- α são necessárias para manter o os efeitos da caquexia (Argiles et al., 2003).

A literatura nos mostra o importante papel da melatonina como neuroimunomodulador e especula sobre uma possível regulação do sistema imune, via citocinas, sobre a produção/secreção de melatonina.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir com esse trabalho que durante o estabelecimento da caquexia associada ao câncer (tumor de Walker 256) ocorre uma modulação da produção de melatonina na glândula pineal via alteração da expressão gênica e da atividade da principal enzima que regula sua síntese, a AA-NAT. Os resultados indicam que o aumento da expressão e atividade da AA-NAT se deve a uma hiper-ativação da via de sinalização intracelular estimulada pela NOR.

A modulação promovida, na glândula pineal, pelo desenvolvimento tumoral e estabelecimento da síndrome da caquexia permanece visível mesmo quando mantemos a glândula por 48 h em cultura. Porém, apenas as alterações mantidas quando isolamos as glândulas não reproduzem os efeitos encontrados *in vivo*, indicando que fatores produzidos pelo tumor ou pelo organismo em resposta à presença do tumor participam da modulação.

Dentre os fatores que podem estar envolvidos nessa modulação que promove a hiper-ativação da via de sinalização intracelular que leva à produção de melatonina, podemos destacar a NOR, o TNF- α e a insulina. Esses fatores isoladamente são capazes de aumentar a produção de melatonina em cultura e todos se mostram aumentados durante a caquexia.

O TNF- α , em particular, é um forte candidato a participar da modulação da produção de melatonina durante a caquexia, já que a pré-incubação com essa citocina nos experimentos *in vitro* promoveu o aumento da produção de melatonina na mesma fase da estimulação noradrenérgica em que vemos o aumento *in vivo*. Porém, o TNF- α sozinho não reproduz totalmente o fenômeno encontrado *in vivo*, indicando, como esperado, a ação de diversos fatores nessa modulação.

Como a melatonina é um hormônio que transmite informações circadianas e sazonais para todos os órgãos e células do corpo, sincronizando os processos fisiológicos e metabólicos com as variações anuais e diárias do fotoperíodo, incluindo o metabolismo energético (Lissoni et al., 1996), parece razoável assumir que mudanças no perfil de secreção desse hormônio podem colaborar para uma perda do controle metabólico que facilitaria a instalação de síndromes metabólicas como a caquexia.

Acreditamos que esse trabalho tenha sido importante no sentido que aprofundou os conhecimentos da complexa relação entre a síndrome da caquexia e a glândula pineal, especialmente quanto à produção de seu principal produto, a melatonina. Além disso, abriu

novos horizontes para futuras pesquisas, ainda necessárias, que venham somar para o completo entendimento dos fenômenos biológicos relacionados a este quadro patológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *Journal of Pineal Research* 2001; 30: 65–74.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *Journal of Pineal Research* 2003; 34: 1–10.
- Alonso-Vale MIC, Andreotti S, Peres SB, Anê GF, Borges-Silva CN, Cipolla Neto J, Lima FB. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: 805-812.
- Aloyo VJ, Walker RF. Alpha-adrenergic control of serotonin release from rat pineal glands. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 61-6.
- Aloyo VJ, Walker RF. Noradrenergic stimulation of serotonin release from rat pineal glands in vitro. *J. Endocrinol.* 1987; 114: 3-9.
- Anholt RRH. Signal integration in the nervous system: adenylate cyclases as molecular coincidence detectors. *TINS* 1994; 17 (1): 37-41.
- Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 1999; 115: 836–847.
- Arendt J, Skene DJ, Middleton B, Lockley SW, Deacon S. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness. *J. Biol. Rhythms* 1997; 12: 604-17.
- Argilés JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Figueras M. Pathophysiology of neoplastic cachexia. *Nutr Hosp*, 2006; 21 Suppl 3:4-9.
- Argilés JM, Moore-Carrasco R, Busquets S, López-Soriano FJ. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. *Drug Discov Today*. 2003b; 8 (18): 838-44.
- Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 2003a; 35: 405–409
- Baker HS, Marcus SL, Frank O, Petrylek DP, Deangelis B, Dutcher JP, Wiernik PH. Interleukin-2 enhances biopterins and catecholamines production during adoptive immunotherapy for various cancers. *Cancer* 1989;64: 1226-1231.
- Baler R, Klein DC. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27319-25.

- Baltatu O, Silva JA Jr, Ganten D, Bader M. The brain renin-angiotensin system modulates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2000 Jan; 35(1 Pt 2): 409-12.
- Banik U, Wang GA, Wagner PD, Kaufman S. Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 26219-25.
- Bartsch C, Bartsch H, Buchberger A, Rokos H, Mecke D, Lippert TH. Serial transplants of DMBA-induced mammary tumors in Fischer rats as model system for human breast cancer. IV. Parallel changes of biopterin and melatonin indicate interactions between the pineal gland and cellular immunity in malignancy. *Oncology*. 1995; 52(4):278-83.
- Bartsch C, Bartsch H, Flüchter St-H, Meche D, Lippert TH. Diminished pineal function coincides with disturbed circadian endocrine rhythmicity in untreated primary cancer patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; 719:502-525.
- Bartsch C, Bartsch H. Melatonin in cancer patients and in tumour-bearing animals. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 247-64.
- Bartsch C, Bartsch H. The modulation of pineal melatonin secretion in malignancy: results and possible mechanisms. In: Weeb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pévet P. Pineal update. Westbury: PJD Publications limited, 1997. p. 369-376.
- Bartsch H, Buchberger A, Franz H, Bartsch C, Maidonis I, Mecke D, Bayer E. Effect of melatonin and pineal extracts on human ovarian and mammary tumor cells in a chemosensitivity assay. *Life Sci* 2000; 67(24): 2953-60.
- Berardino MB, Roingear FC, Fukagawa NK. Plasma tryptophan and tyrosine concentrations: determination using high performance liquid chromatography and fluorometric detection. *J Nutr Biochem*. 1990; 1(4): 220-2.
- Besançon R, Simonneaux V, Jouvét A, Belin MF, Fèvre-Montange M. Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Mol. Brain res*. 1996; 40: 136-8.
- Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320: 584-588.
- Beutler B. Cachexia: a fundamental mechanism. *Nutr. Rev.* 1998; 46: 369.
- Bittman EL, Karch FJ, Hopkins JW. Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1983; 113: 329-36.

- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anti-cancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002; 2: 113–132.
- Boadle-Biber MC. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubated with N⁶,O²-dibutyryl adenosine-3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem. Pharmacol.* 1980; 29: 669-72.
- Brink M, Anwar A, Delafontaine P. Neurohormonal factors in the development of catabolic/anabolic imbalance and cachexia. *Int J cardiol.* 2002; 85 (1): 111-21.
- Brown GM, Bar-Or A, Grossi D, Kashur S, Johansson E, Yie SM. Urinary 6-sulphatoxymelatonin, an index of pineal function in the rat. *J. Pineal Res.* 1991; 10: 141-7.
- Cahill GM, Besharse JC. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: regulation by a photoreceptor oscillator. In: *Progress in Retinal and Eye Research*. Vol. 14. London: Elsevier Science Ltd; 1995. p. 267-91.
- Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medic. Rev.* 1998; 2: 175-90.
- Cassola AC, Afeche SC. Use of neurotoxins to study Ca²⁺ channel functions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 29: 1759-63.
- Cassola AC, Jaffe H, Fales HM, Afeche SC, Magnoli FC, Cipolla-Neto J. ω-Phonetoxin IIA: A calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol* 1998; 436: 545-52.
- Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula pineal. In: Aires MM (Ed.). *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999; 805-11.
- Collins S, Ostrowski J, Lefkowitz RJ. Cloning and sequence analysis of the human beta 1-adrenergic receptor 5'-flanking promoter region. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1172(1-2):171–174.
- Deguchi T, Axelrod J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal. Biochem.* 1972; 50: 176-9.
- Delfino FJ, Walker WH. NF-kB Induces cAMP-response Element-binding Protein Gene Transcription in Sertoli Cells. *J Biol Chem* 1999; 274 (50, Issue Dec 10): 35607–35613.
- Di Stefano A, Paulesu L. Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J Pineal Res* 1994; 17(4):164-9.

- Drott C, Svaninger G, Lundholm K. Increased urinary excretion of cortisol and catecholamines in malnourished cancer patients. *Ann Surg* 1988; 208: 645-650
- Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 1983; 306: 782-4.
- Ehret M, Cash CD, Hamon M, Maitre M. Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem.* 1989; 52: 1886-91.
- 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.* 1991; 57: 1516-21.
- Erlich SS, Apuzzo MLJ. The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. *J. Neurosurg.* 1985; 63: 321-41.
- Espat NJ, Copeland EM, Moldawer LL, Tumor necrosis factor and cachexia: a current perspective. *Surg Oncol* 1994; 3: 255–262.
- Fearon KC, Moses AG. Câncer cachexia. *Int J Cardiol.* 2002; 85 (1): 73-81.
- Fearon KCH, Carter DC. Cancer cachexia. *Ann. Surg.* 1988; 208: 1-4.
- Fernandes LC, Machado UF, Nogueira CR, Carpinelli AR, Curi R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. *Am. J. Physiol.* 1991; 258: E1033-E1036,.
- Fernandes PACM, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a feedback of the immune response on circadian timing *J Pineal Res* 2006; 41:344–350.
- Ferreira ACF, Martins EJ, Afeche SC, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. The profile of melatonin production in tumour-bearing rats. *Life Sci* 2004; 75(19): 2291-302.
- Ferreira ZS, Fernandes PA, Duma D, Assrey J, Avellar MC, Markus RP. Corticosterone modulates norepinephrine induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res* 2005; 38:182–188.
- Folkard S, Arendt J, Aldous M, Kennett H. Melatonin stabilizes sleep onset time in blind men without entrainment of cortisol or temperature rhythms. *Neurosci. Lett.* 1990; 113: 193-8.
- Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GJ. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* New York: Raven Press, 1994. p. 283-308.
- Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Namboodiri MA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/ 14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 8083-8.

- Garcia RAP, Afeche SC, Scialfa JH, Amaral FG, Santos SHJ, Lima FB, Young ME, Cipolla-Neto J. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in the rat pineal gland. *Life Sci.* in press.
- Garidou ML, Bártoli, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the pineal complex. *Neuroscience* 2001; 105 : 721-9.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science.* 1998; 279(5355): 1358-60.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225–60
- Golombek DA, Pévet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behaviour: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1996; 20: 403-12.
- Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER. Signal transduction. San Diego: Academic Press, 2002. p. 145-187.
- Goodlad GAJ. Protein metabolism and tumor growth. In: Munro, H.N. & Allison, J.B. *Mammalian protein metabolism.* New York, Academic Press, 1964; 2: 415-44.
- Hamon M, Bourgoin S, Hery F, Simonnet G. Phospholipid-induced activation of tryptophan hydroxylase from rat brain stem. *Biochem. Pharmacol.* 1978; 27: 915-22.
- Hazlerigg DG, Hastings MH, Morgan PJ. Production of a prolactin releasing factor by the ovine pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* 1996; 8: 489-92.
- He YC, Wang YH, Cao J, Chen JW, Pan DY, Zhou YK. Effect of complex amino acid imbalance on growth of tumor in tumor-bearing rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12): 2772–2775
- Heymsfield SB, McManus CB. Tissue components of weight loss in cancer patients. A new method of study and preliminary observations. *Cancer* 1985; 55(1): 238–249
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature* 1986; 324: 73–76.
- Hirata F, Hayaishi O, Tohuyama T, Senoh S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 1311-3.

- Hiroi M, Ohmori Y. Transcriptional Coactivator CREB-binding Protein Cooperates with STAT1 and NF- κ B for Synergistic Transcriptional Activation of the CXC Ligand 9/Monokine Induced by Interferon- γ Gene. *J. boil. Chem.* 2003; 278 (1): 651–660.
- Ichimura, Isobe T, Okuyama T, Yamauchi T, Fujisawa H. Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Letters* 1987; 219: 79-82.
- Imai Y, Yamauchi T, Fujisawa H. Modulation of tryptophan hydroxylase activity by phospholipids: stimulation followed by inactivation. *J. Neurochem.* 1989; 53: 1293-9.
- Iwagaki H, Hizuta A, Tanaka N, Orita K. Decreased serum tryptophan in patients with cancer cachexia correlates with increased serum neopterin. *Immunol Invest.* 1995; 24(3):467-78.
- Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase by exogenous protein kinase A. *J. Neurochem.* 1996; 66: 817-23.
- Johansen PA, Jennings I, Cotton RGH, Kuhn DM. Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J. Neurochem.* 1995; 65: 882-8.
- Juillard MT, Collin JP. Pools of serotonin in the pineal gland of the mouse: the mammalian pinealocyte as a component of the diffuse neuroendocrine system. *Cell Tissue Res.* 1980; 213: 273-91.
- Junqueira J, Carneiro. *A Célula Cancerosa*. In: *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG.. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 1996; 85: 403–414.
- Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. Anti-carcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2001; 33: 735–753.
- Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Aug; 33(8): 735-53.
- Kayacan O, Karnak D, Beder S, Güllü E, Tutkak H, Senler FC, Köksal D. Impact of TNF- α and IL-6 levels on development of cachexia in newly diagnosed NSCLC patients. *Am J Clin Oncol.* 2006; 29(4): 328-35.
- Kitay JI, Altschule MD. Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. *Endocrinology.* 1954 Dec; 65(6): 782-4.

- Klein DC, Auerbach DA, Namboodiri MAA, Weller GHT. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In: Reiter RJ. *The Pineal Gland*. Boca Raton: CRC Press, 1981.
- Klein DC, Buda MJ, Kapoor CL, Krishna G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science* 1978; 199: 309-11.
- Klein DC, Ganguly S, Coon SQ, Gaildrat P, Morin M, Weller JL, Obsil T. 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? *J. Neuroendocrinol.* 2003; 15: 370-7.
- Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-Omethyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1979; 174:245–262.
- Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme. The first poscloning view. *TEM* 1996; 7: 106-12.
- Klein DC, Schaad NL, Namboodiri MAA, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem. Soc. Trans.* 1992; 20 (2): 299-304.
- Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 599-603.
- Klein DC, Weller JL. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* 1972; 177: 532-3.
- Koch M, Mauhin V, Stehle JH, Schomerus C, Korf HW. Desphosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatase is involved in inactivation of NAT gene transcription in rat pineal gland. *J. Neurochem.* 2003; 85: 170-9.
- Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H. The fate of -, melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 1961; 236: 3072-5.
- Kuhn DM, Vogel RL, Lovenberg W. Calcium-dependent activation of tryptophan hydroxylase by ATP and magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978; 82: 759-66.
- Kumar CA, Das UN. Effect of melatonin on two stage skin carcinogenesis in Swiss mice. *Med Sci Monit* 2000; 6(3): 471-5.
- Kuroda K, Nakashima J, Kanao K, Kikuchi E, Miyajima A, Horiguchi Y, Nakagawa K, Oya M, Ohigashi T, Murai M. Interleukin 6 Is Associated with Cachexia in Patients with Prostate Câncer. *Urology.* 2007; 69(1):113-7.

- Kurth AH, Wang C, Hayes WC, Shea M. The evaluation of a rat model for the analysis of densitometric and biomechanical properties of tumor-induced osteolysis. *J Orthop Res* 2001; 19 (2):200–205
- Kveder S, Mcisaac WM. The metabolism of melatonin (N-acetyl 5-methoxytryptamine) and 5-methoxytryptamine. *J. Biol. Chem.* 1961; 236: 3214-20.
- Larsen PJ. Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech* 1999; 46:296–304.
- Laviano A, Meguid MM, Yang Z, Gleason JR, Cangiano C, Fanelli FR. Cracking the riddle of cancer anorexia. *Nutrition* 1996; 12: 706-710.
- Lawrence DA, Kim D. Central/peripheral nervous system and immune responses. *Toxicology* 2000; 142: 189-201.
- Lawson DH, Richmord A, Nixon DW, Rudman D. Metabolic approaches to cancer cachexia. *Am. Rev. Nutr.* 1982; 2: 277-301.
- Liebmann PM, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K. Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112:203–211.
- Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SMF, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJA, Carvalho CRO, Cipolla-Neto J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: 934-941.
- Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. *Braz J Méd Biol Res.* 1994; 27(4): 995-1000.
- Lissoni P, Barni S, Tancini G, Brivio F, Tisi E, Zubelewicz B, Braczkowski R. Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994; 8(4):126-9.
- Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, Barni S, Ardizzoia A, Brivio F, Zubelewicz B, Chatikhine V. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *European Journal of cancer* 1996; 32A(8): 1340-1343.
- Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, Barni S, Ardizzoia A, Brivio F, Zubelewicz B, Chatikhine V. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer* 1996; 32A (8), 1340–1343.
- Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Nuroendocrinol* 2001; 22: 45-7.

- Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer* 2002; 10(2):110-6.
- Lundholm K, Daneryd P, Kirner U, Hyltander A, Bosaeus I. Evidence that long-term COX-treatment improves energy homeostasis and body composition in cancer patients with progressive cachexia. *Int J Oncol.* 2004; 24 (3): 505-12.
- Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10:467-476.
- Maestroni GJ. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol B.* 1998; 43(3): 186-92.
- Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P. Evidence that melatonin acts in the premamillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 1998; 139: 1508-16.
- Markus RP, Afeche SC, Barbosa Jr EM, Lotufo CMC, Ferreira ZS, Cipolla-Neto J. Glândula Pineal e Melatonina. In: Marques N, Menna-Barreto L. (Org.). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 3 ed. São Paulo: EDUSP, 2003. p. 191-222.
- Maronde EE, Wicht H, Taskén K, Geniesser HG, Deghani F, Olcese J, Kolf HW. CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase Type II. *J. Pineal Res.* 1999; 27:170-182.
- McCarthy Do. Rethinking nutritional support for persons with cancer cachexia. *Biol Res Nurs.* 2003; 5(1): 3-17.
- Mefford IN, Chang P, Klein DC, Namboodiri MAA, Sugden D, Barchas J. Reciprocal day/night relationships between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1983; 113 (5): 1582-6.
- Michael J, Tisdale DSC. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition.* 2001; 17(5):438-42
- Middleton B, Arendt J, Stone BM. Complex effects of melatonin on human circadian rhythms in constant dim light. *J. Biol. Rhythms* 1997; 12: 467-77.
- Molis TM, Spriggs LL, Hill SM. Modulation of oestrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 1994; 8: 1681-1690.
- Moore RY, Klein DC. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res* 1974; 71: 17-33.
- Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 1996; 73:125-130.

- Morgan CR, Lazarow A. Immunoassay of insulin: two antibodies system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. *Diabetes* 1963; 12: 115-121.
- Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917:404-415.
- Nordan RP, Pumphrey JG, Rudikoff S. Purification and NH₂-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1, *J Immunol* 1987; 139: 813-817.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275(40): 31311-7.
- Olcese J, Munker M. Extracellular serotonin promotes melatonin release from cultured rat pinealocytes: evidence for an S₂-type receptor-mediated autocrine feedback. *Brain Res.* 1994; 643: 150-4.
- Parfitt A, Weller JL, Klein DC, Sakai KK, Marks BH. 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* 1975; 11: 241-255.
- Parfitt A, Weller JL, Klein DC. Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. *Neuropharmacology* 1976; 15: 353-8.
- Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 2000; 182 (3):339-350
- Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Chneyer U, Spessert R, Mühlbauer E. Diabetic gotto kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res.* 2006; 40:135-143.
- Pfeffer M, Kühn R, Krug L, Korf HW, Stehle JH. Rhythmic variation in b1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10, 2896-2904
- Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 2002a; 33:172-177.

- Picinato Mc, Haber Ep, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2002b; 33:156-160.
- Piffar PM, Fernandez R, Tchaikovski O, Hirabara SM, Folador A, Pinto GJ, Jakobi S, Gobbo-Bordon D, Rohn TV, Fabricio VE, Moretto KD, Tosta E, Curi R, Fernandes LC. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumorbearing rats. *Cancer Lett.* 2003; 201(2):139–148
- Plata-Salamán CR. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. *Nutrition* 2000; 16: 1009-1012.
- Provinciali M, Di Stefano G, Bulian D, Tibaldi A, and Fabris N. Effect of melatonin and pineal grafting on thymocyte apoptosis in aging mice. *Mech. Ageing Dev.* 1996; 90:1–19.
- Pupo AA, Marreiro D. Dosage of insulin levels using radioimmunoassay with double antibodies. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1970; 6: 153-156.
- Ramos EJB, Suzuki S, Marks D, Inui A, Asakawa A, Meguid MM. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7(4):427-34.
- Rao GN, Ney E, Herbert RA. Effect of melatonin and linolenic acid on mammary cancer in transgenic mice with c-neu breast cancer oncogene. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 64(3): 287-96.
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2000a; 917:376–386.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2001; 34: 237–256.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *Journal of Biomedical Science* 2000b; 7: 444–458.
- Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2002; 54: 1299–1321.
- Reiter RJ. Melatonin synthesis: multiplicity of regulation. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 294:149-158.
- Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 17(2): 273–285.
- Reiter RJ. toperiod: its importance as an impeller of pineal and seasonal reproductive rhythms. *nt J Biometeorol.* 1980 Mar; 24(1): 57-63.

- Reppert SM, Godson CG, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b-melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8734–8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13:1177–1185.
- Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 1999; 140: 1375-84.
- Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* 1997; 777: 247-50.
- Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 1996; 137(7):3033-45.
- Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 1995; 47:439–449.
- Sandberg-Wollheim M, Zweiman B, Levinson AI, Lisak RP. Humoral immune responses within the human central nervous system following systemic immunization. *J Neuroimmunol.* 1986 May; 11(3): 205-14.
- Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288CTC-bearing and normal buffalo rats via receptor-mediated signal transduction. *Life Sciences* 2001; 68: 2835-2844.
- Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. Polyunsaturated fatty acids, melatonin and cancer Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Supportive Cancer Care* 2002; 10: 110–116.
- Schaad NC, Vanecek J, Rodriguez IR, Klein DC, Holtzclaw L, Russell JT. Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 1995; 47: 923-33.

- Schenda J, Vollrath L. An intrinsic neuronal-like network in the rat pineal gland. *Brain Res.* 1999; 823: 231-3.
- Schomerus C, Korf HW. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad. Sci* 2005; 1057: 372-83
- Seelaender MCL, Ambrico C, Rodrigues MCPS, Boeck-Haebisch EM, Curi R. Hormonal alterations in Walker 256 tumor: bearing rats possible role of calcium for the maintenance of cachexia. *Cancer Research, Ther. Contr.* 1996; 5: 29-33.
- Sewerynek E. Cardiovascular Effects of Melatonin. In: Pandi-Perumal SR. *Melatonin: Biological Basis of its Function in Health and Disease.* USA: Landes Bioscience, 2005.
- Shein HM, Wurtman RJ. Stimulation of [14C]tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyryl adenosine 3',5', monophosphate in rat pineal organ cultures. *Life Sci.* 1971; 10: 935-40.
- Shibuya H, Toru M, Watanabe S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res.* 1978; 138: 364-8.
- Shinohara K, Inouye SIT. Circadian variations of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat pineal gland. *Neuroreport* 1994; 5:1262–1264.
- Simoneaux V, Rodeau JL, Calgari C, Pévet P. Neuropeptide Y increases intracellular calcium in rat pinealocytes. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 725-8.
- Simoneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 325-95.
- Sitaram BR, Lees GJ. Effect of oxygen on the induction of tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of rat pineal glands. *J. Neurochem.* 1984; 42: 1183-5.
- Smirnov AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66(1):19-26.
- 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.* 2000; 864: 270-80.
- Stefulj J, Hörtner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wölfler A, Semmler J, Liebmann PM. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res.* 2001 May; 30(4): 243-7.
- Sugden AL, Sugden D, Klein DC. α 1-Adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 741-5.
- Sugden AL, Sugden D, Klein DC. Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 11608-12.

- Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature* 1985; 314:359-61.
- Sugden D. 5-Hydroxytryptamine amplifies β -adrenergic stimulation of N-acetyltransferase activity in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* 1990; 55 (5): 1655-8.
- Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989; 45: 922-31.
- Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 1989; 45: 922-31.
- Tamotsu S, Schomerus C, Stehle JH, Roseboom PH, Korf HW. Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated rat pinealocytes: an immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 1995; 282: 219-26.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal* 1993; 1: 57–63.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002; 2: 181–198.
- Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 1999; 406:171–182.
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; 306: 52-58.
- Tisdale MJ. Wasting in cancer. *J Nutr.* 1999; 129 (1): 243-246.
- Trichopoulos D, Li FP, Hunter DJ. What causes cancer? *Sci. Am.* 1996; 275(3): 80-7.
- Tzavara ET, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ;93(20): 11208-12.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protei-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27: 838–847.
- Van Meir EG. Cytokines and tumors of the central nervous system. *Glia.* 1995 Nov; 15(3): 264-88.

- Vanecek J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic alfa1 and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*, 1985; 116: 2167-2173.
- Walker RF, Aloyo VJ. Norepinephrine stimulates serotonin secretion from rat pineal glands, in vitro. *Brain Res.* 1985; 343: 188-9.
- Williams JF, Siddiqui R. Biochemistry of cancer cachexia: review of results, a new hypothesis and a proposal for treatment. *Med. Sci. Res.* 1990; 18: 3-10.
- Wills RA. *The spread of tumors in the human body.* Butterworth, london, 1952.
- Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Attia AM, Reiter RJ. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J Pineal Res.* 1990a; 8(4):313-22.
- Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Santana C, Attia AM, Reiter RJ. Interferon-gamma modulates melatonin production in rat pineal glands in organ culture. *J Interferon Res.* 1990b; 10(4):403-11.
- Withyachumnarnkul B, Reiter RJ, Lerchl A, Nonaka KO, Stokkan KA. Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int J Biochem.* 1991; 23(12):1397-401.
- Wurtman RJ, Axelrod J, Fischer JE. Melatonin synthesis in the pineal gland: effect of light mediated by the sympathetic nervous system. *Science.* 1963; 143: 1328-30.
- Young SN, Anderson GM. Factors influencing melatonin, 5-hydroxytryptophol, 5-hydroxyindolacetic acid, 5-hydroxytryptamine and tryptophan in rat pineal glands. *Neuroendocrinology* 1982;35: 464-8.
- Zhong H, Voll R. E, Ghosh S. Phosphorylation of NFkB p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the co-activator CBP/p300. *Mol Cell* 1998; 1: 661.
- Zylinska K, Komorowski J, Robak T, Mucha S, Stepien H. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J. Neuroendocrinol* 1995; 56: 187-190.