

**LÍVIA SILVA MEDEIROS DE MESQUITA**

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

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Solange Castro Afeche

Versão Corrigida

São Paulo  
2011

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Glândula Pineal

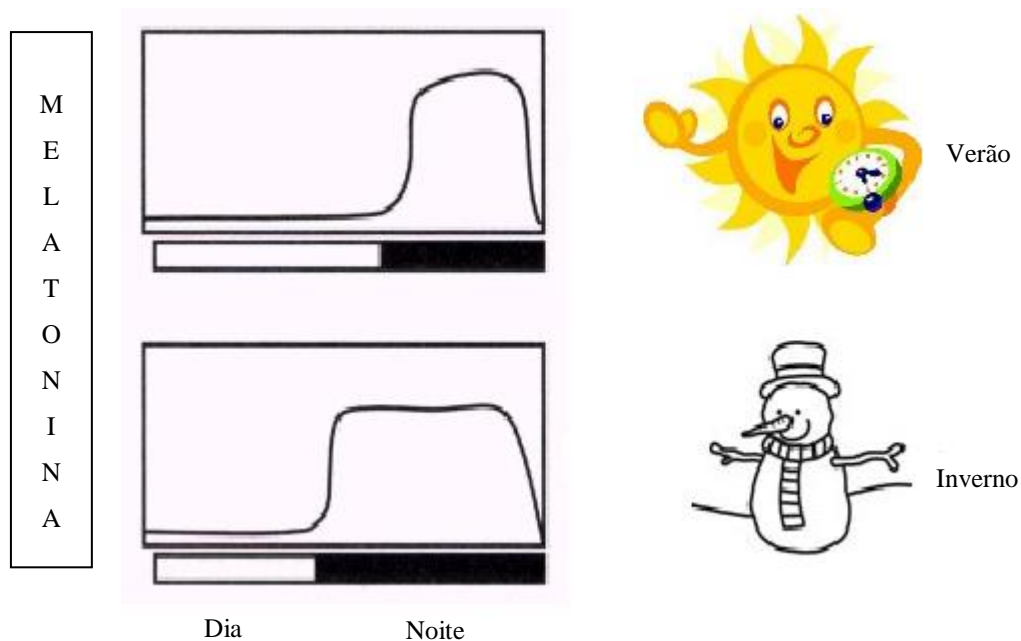
A glândula pineal foi descrita pela primeira vez pelo anatomista Herófilos (335-280a.C), que considerava a pineal como uma espécie de esfíncter regulador dos pensamentos que estariam armazenados nos ventrículos. Alguns anos depois, Galeno (129-200 d.C) observou que a estrutura pineal era diferente das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

A glândula pineal de peixes, anfíbios, répteis e algumas aves (passariformes) é diretamente fotossensível, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina de mamíferos. Nessas mesmas classes, além de suas características de fotosensibilidade e de secreção endócrina, a glândula pineal mantém conexões, tanto aferentes quanto eferentes, com o sistema nervoso central (SNC) através do pedúnculo pineal. Em mamíferos, no entanto, apesar de manter seu caráter endócrino, os pinealócitos perdem sua capacidade fotorreceptiva e a pineal, apesar de manter-se conectada diretamente com o SNC, passa a estar sob o comando do ciclo de iluminação ambiental, de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas que através de projeções diretas (poucas) ou indiretas, via sistema nervoso autônomo simpático, atingem a glândula pineal. (CIPOLLANETO; AFECHE, 2008).

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

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

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



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

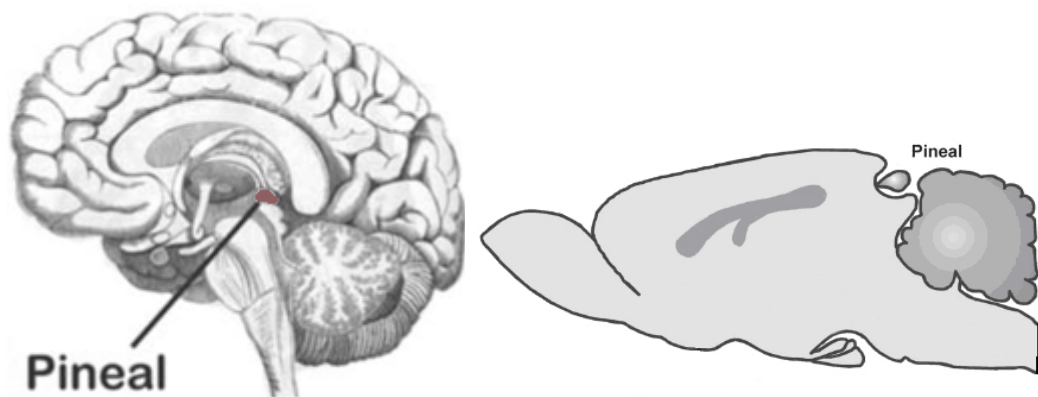
A glândula pineal é derivada de uma evaginação do diencéfalo e está localizada entre os dois hemisférios cerebrais, acima do terceiro ventrículo (Figura 2). Em mamíferos, o parênquima da glândula pineal consiste de um cordão de células separadas por capilares com amplos espaços perivasculares. Em alguns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

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

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

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

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



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

## 1.2 Inervação da Glândula Pineal

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

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

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

## 1.3 Inervação colinérgica

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



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

### 1.3.1 Receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos

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

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

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

### 1.3.2 Papel da inervação colinérgica na glândula pineal

Os receptores colinérgicos muscarínicos são encontrados nas membranas dos pinealócitos e em neurônios intrapineais (PHANSUWAN-PUJITO; MØLLER; GOVITRAPONG, 1999). Phansuwan-Pujito, Lasen, Møller (1994) e Møller et al. (1997) demonstraram a presença de RNAm codificando o receptor muscarínico do subtipo 1 ( $M_1$ ) por hibridização *in situ* em glândulas pineais de ratos utilizando oligonucleotídeos derivados de sequências de cDNA humanos. Outros estudos farmacológicos mostraram a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos pelo carbacol levando à ativação da fosfolipase C, gerando  $\text{IP}_3$ , e este efeito foi antagonizado pela pirenzepina, antagonista seletivo do subtipo  $M_1$  (LAITINEN; TORDA; SAAVEDRA, 1989).

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

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

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

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

## **1.4 Papel do glutamato na síntese de melatonina**

### **1.4.1 Receptores para glutamato**

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

Os iGluRs foram subsequentemente classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em: NMDA (n-metil-D-aspartato), AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato. Os iGluR são compostos por quatro ou cinco subunidades que, agrupadas, formam um poro central com condutância seletiva para  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ . O iGluR do subtipo NMDA possui sete subunidades identificadas: uma  $\text{NR}_1$ , quatro  $\text{NR}_2$  (A-D) e duas  $\text{NR}_3$  (A-B). O receptor NMDA funcional é composto por ligações heteroméricas entre a subunidade essencial  $\text{NR}_1$  e uma das quatro subunidades  $\text{NR}_2$  (A-D), além de uma ou duas subunidades  $\text{NR}_3$  (A-B). A expressão da subunidade  $\text{NR}_2$  sozinha não leva à composição do canal iônico funcional, enquanto que a co-expressão de cada subunidade  $\text{NR}_2$  com a subunidade  $\text{NR}_1$  resulta em expressão de canais funcionais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  em células de mamíferos (KÖHR, 2006). O iGluR subtipo AMPA é composto por quatro subunidades (GluR1-4). Cada subunidade possui um domínio extracelular N-terminal, um domínio de ligação do ligante, o qual compreende dois segmentos polipeptídicos extracelulares S1 e S2, e um domínio intracelular C-terminal. Após a ligação com o glutamato, o receptor é rapidamente ativado permitindo a abertura do canal iônico, resultando num influxo de sódio, o qual despolariza a membrana da célula pós-sináptica (SPRENGEL, 2006). Já os receptores cainato são formados por subunidades GluR 5-7 ou GluKA5-7, KA1-2 ou GluKA1-2.

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

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

#### 1.4.2. Ações do glutamato na glândula pineal

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

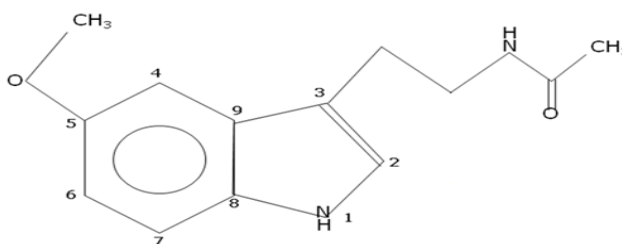
### 1.5 Melatonina

A melatonina é produzida e secretada principalmente pelos pinealócitos da glândula pineal, segundo um padrão rítmico com pico secretório no período noturno. É uma indolamina de peso molecular 232,3Da, possui carácter anfifílico, podendo atravessar facilmente as membranas celulares por difusão (Figura 3). A melatonina, uma vez produzida na glândula pineal, é imediatamente secretada e pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo. A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos sendo que sua metabolização periférica se concentra especialmente no fígado. Neste processo a melatonina é convertida em 6-hidroximelatonina, que após conjugação com sulfatos ou com glucoronídeos é excretada na urina. No SNC e na própria glândula pineal a melatonina pode ser transformada em quinuraminas sob a ação da 2,3 indolamina dioxigenase. A melatonina pode atuar tanto em receptores de membrana quanto nucleares. Nos mamíferos estão bem caracterizados três tipos de receptores de membrana. Os receptores de alta afinidade, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G. O terceiro tipo de receptor de membrana para melatonina em mamíferos é o MT<sub>3</sub>, um receptor

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

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

**Figura 3.** Estrutura molecular da melatonina

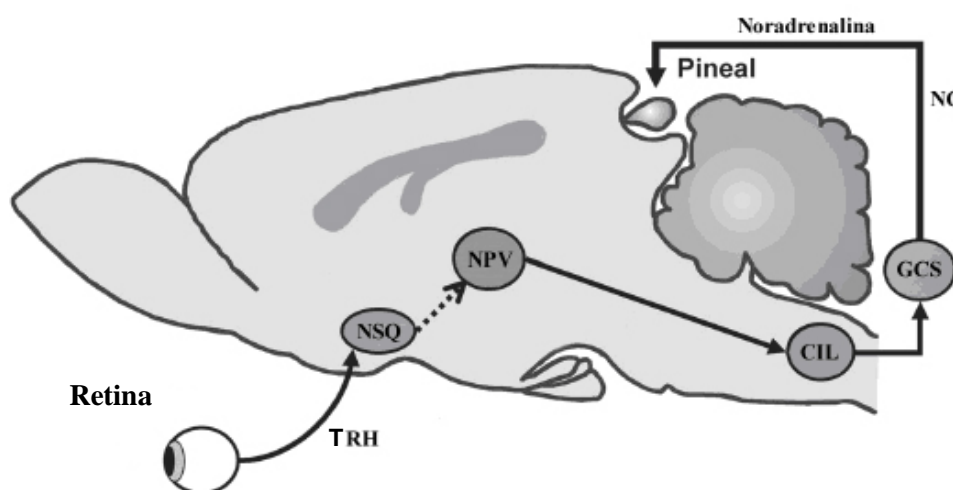


FONTE: CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008.

### 1.6 Controle neural da síntese de melatonina

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

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



FONTE: Richter et al., (2004).

### 1.7 Bioquímica da síntese de melatonina

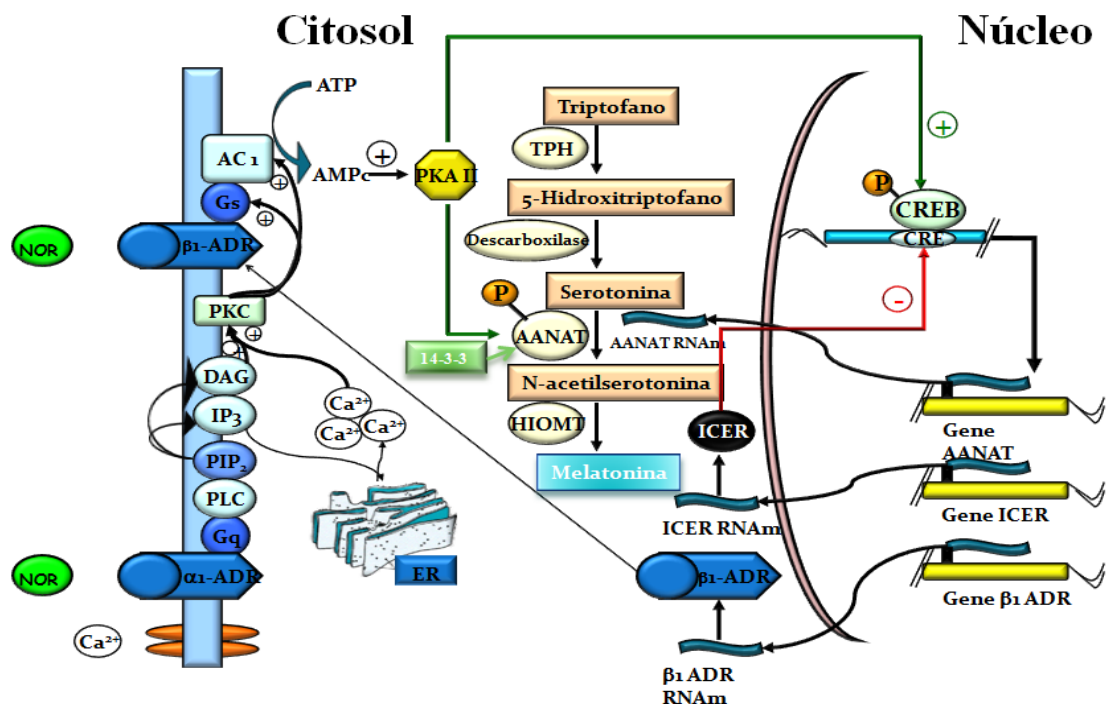
A glândula pineal sintetiza o hormônio melatonina no período noturno, induzida por estimulação noradrenérgica. A interação da noradrenalina com os receptores  $\beta$ -adrenérgicos (subtipo  $\beta_1$ ) induz o aumento do AMPc intracelular através da ativação de uma proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilato ciclase. A ativação dos receptores  $\alpha$  (subtipo  $\alpha_{1B}$ ) ativa uma proteína Gq ligada à estimulação da fosfolipase C, gerando fosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol. O  $IP_3$ , atuando em seus receptores no retículo endoplasmático, induz a liberação do cálcio desses estoques, tendo como consequência um aumento do cálcio intracelular. A rápida elevação do cálcio deve-se à liberação do retículo (SCHAAD et al., 1995) e o platô que se segue deve-se à entrada de cálcio pelos canais da membrana plasmática responsáveis pela reposição dos estoques intracelulares (os “SOCs”) (GOMPERS; KRAMER; TATHAM, 2002; LEE et al., 2006).

O cálcio e o diacilglicerol ativam a proteína quinase C (PKC), a qual potencia o aumento do AMPc já induzido pela estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Este efeito pode ocorrer pela fosforilação da adenilato ciclase ou da proteína Gs (SUGDEN, 1989). O cálcio tem um papel potenciador da síntese do AMPc intracelular também por atuar através do complexo

cálcio/calmodulina na ativação da adenilato ciclase, que na glândula pineal foi caracterizada como do tipo 1 (ANHOLT, 1994; TZAVARA et al., 1996).

O AMPc ativa a proteína quinase A do tipo II (PKA) (MARONDE et al., 1999), a qual fosforila um fator de transcrição, a proteína CREB (“cAMP response element binding”), que, assim fosforilada, promove a ativação da transcrição e tradução gênicas da enzima passo-limitante da síntese de melatonina, a AANAT. A presença da CREB fosforilada é muito importante também para a manutenção da atividade da AANAT, pois, quando a CREB é desfosforilada, se tem uma rápida queda na atividade da enzima (KLEIN; ROSEBOOM; COON, 1996; ROSEBOOM; KLEIN, 1995; TAMOTSU et al., 1995). A estimulação adrenérgica induz também a síntese de fatores de transcrição negativos na glândula pineal, sendo um dos mais importantes o ICER (“inducible cAMP early repressor”), que tem um papel inibitório da transcrição do gene da AANAT. O RNAm do ICER exibe um ritmo circadiano na pineal do rato, com um pico na segunda metade da noite, precedendo o declínio da síntese de melatonina. Além do ICER, o AMPc estimula a síntese de outros fatores de transcrição negativos como do Fra-2 (“Fos-related antigen-2”) e JunB que também poderiam estar promovendo a queda circadiana da atividade da AANAT (Figura 5) (BALER; KLEIN, 1995; SPESSERT et al., 2000).

**Figura 5.** Bioquímica da síntese de melatonina



FONTE: modificada de Maronde, 2007

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

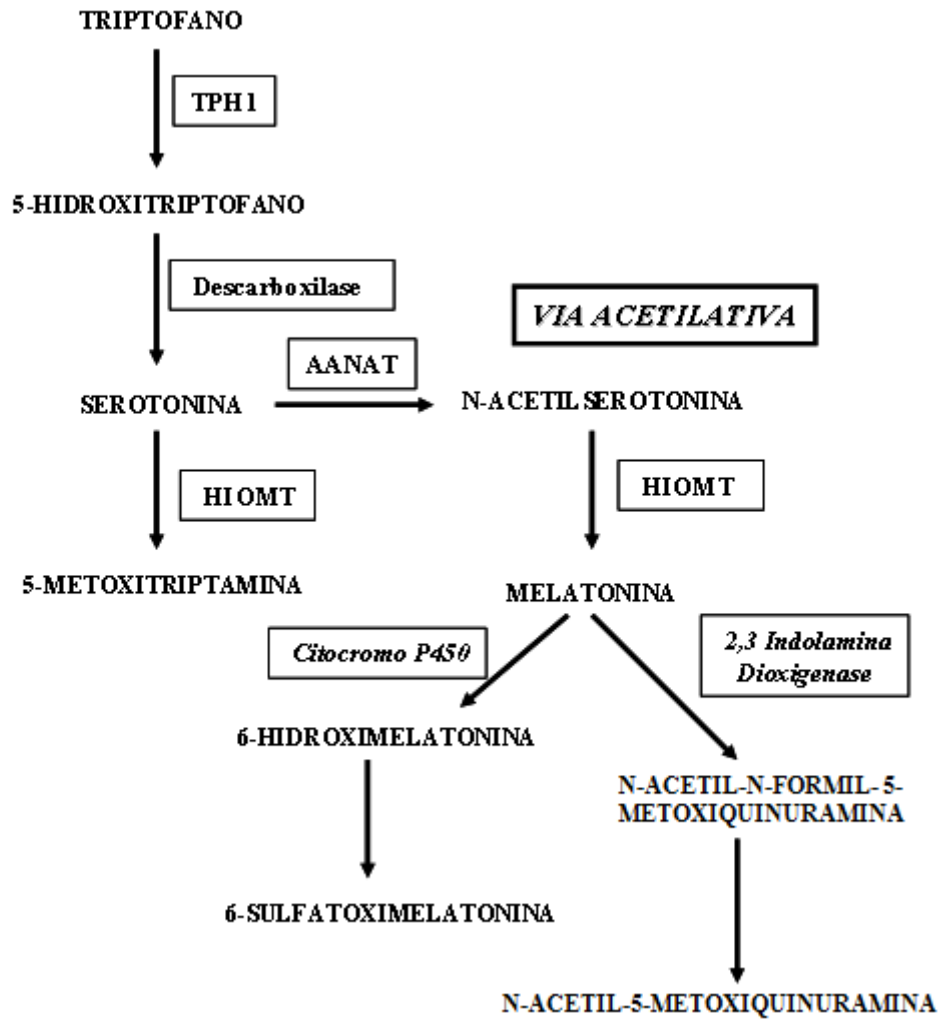
Na glândula pineal do rato, a enzima TPH apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados no período noturno. Alguns autores atribuem esse aumento da atividade tanto à sua síntese aumentada, pela indução de transcrição gênica e síntese protéica, como à ativação da enzima por fosforilação.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

A AANAT é uma enzima instável e a manutenção de sua atividade depende de muitos fatores. Quando cessa a estimulação simpática, ou quando se submete o animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AANAT cai com uma meia vida de aproximadamente 3 min (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008). A estabilização da atividade desta enzima deve-se à presença do AMPc em níveis elevados durante todo o período noturno. A ativação da PKA pelo AMPc leva à fosforilação da enzima em dois sítios específicos localizados no N-terminal e no C-terminal. Quando a AANAT está fosforilada ocorre a sua ligação com a proteína 14-3-3, formando um complexo AANAT-14-3-3. Essa associação impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteassomal (GANGULY et al., 2001).

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



**Figura 6.** Vias metabólicas da síntese e degradação da melatonina



FONTE: Cipolla-Neto; Afeche, 2008

## 1.8 Metilecgonidina ou Anidroecgonidina metil éster (AEME)

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

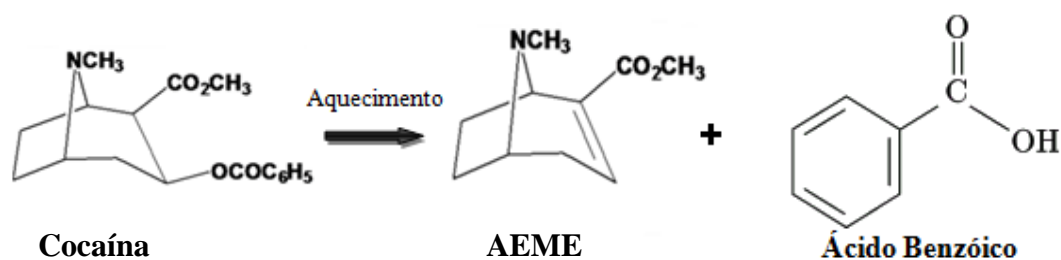
Estudos em ovinos e plasma humano, demonstraram que AEME é mais estável do que a cocaína e que o seu volume de distribuição aparentemente também é maior, chegando a ser mais potente do que a própria cocaína (SCHEIDWEILER et al., 2000; FANDINO; TOENNES; KAUERT, 2002).

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

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

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

**Figura 7.** Decomposição térmica da cocaína.



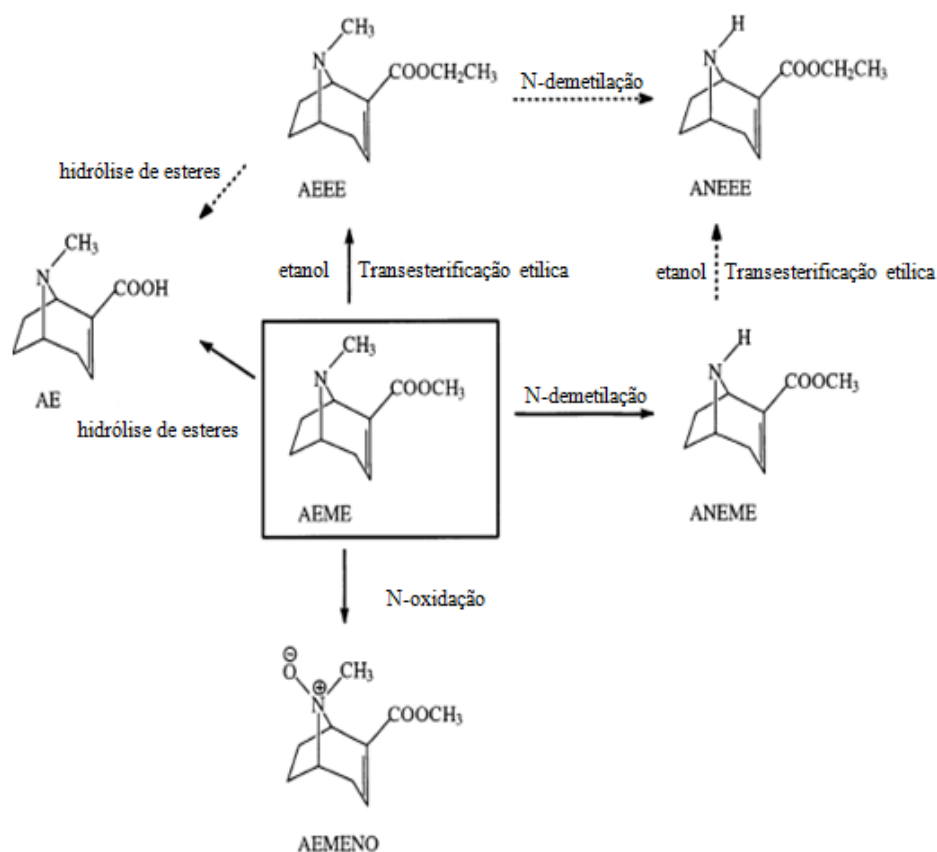
FONTE: modificada de Garcia, (2009).

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

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

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

**Figura 8.** Produtos de biotransformação da AEME



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

FONTE: (FANDIÑO et al., 2002).

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

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

cianotoxina que atua como bloqueador muscular (WOOD et al., 2007). Vários estudos *in vitro* mostraram que AEME age como agonista muscarínico do receptor M<sub>2</sub> (HUANG et al., 1997; WOOLF et al., 1997; YANG et al., 2001, 2002).

Em miocárdio de furão foi observado que a AEME e a cocaína em baixas concentrações possuem um efeito ionotrópico negativo o qual foi bloqueado por metocramina (antagonista M<sub>2</sub>), mas não por antagonistas M<sub>1</sub> e M<sub>3</sub>, sugerindo que esse efeito ionotrópico negativo da cocaína e da AEME é provavelmente devido à estimulação de receptores muscarínicos M<sub>2</sub> (HUANG et al., 1997). Outro estudo utilizando uma linhagem de células pulmonares de embriões humanos (células HEL299), que expressam especificamente receptores muscarínicos M<sub>2</sub>, mostrou que a AEME diminui a produção de AMPc devido a ativação da proteína Gi, inibindo a adenilciclase, e aumentando a produção de GMPc devido a produção aumentada de óxido nítrico (NO) por ativação da NO sintase (NOS) (YANG et al., 2001).

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

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

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

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

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

diminui a síntese de melatonina, diminui a atividade da principal enzima da via de síntese da melatonina (AANAT), diminui a expressão das enzimas TPH e AANAT, e também aumenta a expressão dos receptores para melatonina  $MT_1$  e  $MT_2$  do cerebelo (PERES et al., 2011).

Além disso, a glândula pineal e a melatonina parecem ter um papel importante nos efeitos de sensibilização à cocaína que acontecem com o seu uso prolongado, aumentando alguns de seus efeitos, dentre eles o déficit da atividade locomotora. Alguns trabalhos mostraram que a sensibilização à cocaína ocorre predominantemente no período claro, quando a melatonina está ausente e que, em animais pinealectomizados, a ritmicidade de sensibilização deixa de existir (KURTUNCU et al., 2004). Em camundongos knockout para os receptores  $MT_1$  a sensibilização à cocaína ocorre tanto durante o dia como a noite, o que não ocorre em animais knockout para os receptores  $MT_2$ , indicando que o receptor  $MT_1$  é essencial para a sensibilização diurna da cocaína (MANEV; UZ, 2006).

## 6 CONCLUSÕES

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

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

- O conteúdo de cálcio intracelular foi aumentado pela presença da AEME, o que reforça a presença de receptores muscarínicos ligados ao aumento do cálcio intracelular na glândula pineal de ratos, como o  $M_1$ , descrito na literatura.
- *In vivo*, houve uma diminuição da melatonina no final do período escuro, confirmando a redução observada nos experimentos *in vitro*.



## REFERÊNCIAS\*

AFECHE, S. C.; AMARAL, F. G.; VILLELA, D. C. M.; ABRAHÃO M. V.; PERES, R.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin and the pineal gland. In *New research on Neurosecretory Systems*. Nova York: E. Romano, S. De Luca 2008, p.151-177.

AKHISAROGLU, M.; AHMED, R.; KURTUNCU, M.; MANEV, H.; UZ, T. Diurnal rhythms in cocaine sensitization and in Period 1 levels are common across rodent species. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.79, p.37-42, 2004.

ANHOLT, R. R. H. Signal integration in the nervous system: adenylate cyclases as molecular coincidence detectors. **Trends Neurosci**, v.17, p.37-41, 1994.

ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **J. Reprod. Fertil.**, v.3, p.13-22, 1998.

BALER, R.; KLEIN, D. C. Circadian expression of transcription factor Fra-2 in the rat pineal gland. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.27319-27325, 1995.

BERRIDGE, M. J. Calcium microdomains: organization and function. **Cell Calcium**. 2006 v.40, p.405-412. Epub 2006 Oct 9. Review

BOADLE-BIBER, M. C. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubated with N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. **Biochem. Pharmacol.**, v.29, p.669-672, 1980.

CALVO, J.; BOYA, J.; GARCIA-MAURIÑO, E. Ultrastructure of the pineal gland in the adult dog. **J Pineal Res**. v.5, p.479-87, 1988.

CHEN, L. C.; GRAEFE, J. F.; SHOJAIE, J.; WILLETTS, J.; WOOD, R.W. Pulmonary effects of the cocaine pyrolysis product, methylecgonidine, in guinea pigs. **Life Sci.**, v.56, n. 1 p.7-12, 1995.

CIPOLLA-NETO, J.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; AFECHE, S. C.; SCIALFA, J. H. & PERAÇOLI, A. M.. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. **Brain Res.**, v.691, p.133-141, 1995.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. **Glândula pineal**. In: AIRES, M. M. (coord.). *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 3 ed p. 980-990, 2008

COURT, J.; MARTIN-RUIZ, C.; GRAHAM, A.; PERRY, E. Nicotine receptors in human brain. Topography and pathology. **J. Chem. Neuroant**, v.20, p.281-98, 2000.

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PARFITT, A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C.; SAKAI, K. K.; MARKS, B. H. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Mol. Pharmacol.**, v.11, p.241-255, 1975

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TZAVARA, E. T.; POUILLE, Y.; DEFER, N.; HANOUNE, J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.11208-11212, 1996.

UZ, T.; AHMED, R.; AKHISAROGLU, M.; KURTUNCU, M.; IMBESI, M.; DIRIM ARSLAN, A.; MANEV, H. Effect of fluoxetine and cocaine on the expression of clock genes in the mouse hippocampus and striatum. **Neuroscience**, v.134, p.1309- 1316, 2005.

VILELLA, D. C. **Síntese de melatonina na glândula pineal de ratos: modulação pelo glutamato**. Dissertação.(Mestrado em Fisiologia Humana). 2007. 98f. : Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2007.

VOLLRATH, L. Mammalian pinealocytes: ultrastructural aspects and innervation. **Ciba Found Symp.**, v.117, p.9-22. 1985.

WADA, E.; WADA, K.; BOULTER, J.; DENERIS, E.; HEINEMANN, S.; PATRICK, J.; SWANSON, L.W. Distribution of alpha2, alpha3, alpha4, and beta2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 284, p.314 –335, 1989.

WESSLER, I.; REINHEIMER, T.; BITTINGER, F.; KIRKPATRICK, C. J.; SCHENDA, J.; VOLLRATH, L. Day-night rhythm of acetylcholine in the rat pineal gland. **Neurosci. Lett.**, v.224, p.173-176, 1997.

WOOD, R. W.; SHOJAIE, J.; FANG, C. P.; GRAEFE, J. F. Methylecgonidine coats the crack particle. **Pharmacol Biochem Behav.** v.53, p.57-66, 1996.

WOOD, S. A.; RASMUSSEN, J. P.; HOLLAND, P. T.; CAMPBELL, R.; CROWER, A. L. M. First report of the cyanotoxin Anatoxin-A from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria), **J. Phyco.**, v.43, p. 356-365, 2007.

WOOLF, J. H.; HUANG, L.; ISHIGURO, Y.; MORGAN, J. P. Negative inotropic effect of methylecgonidine, a major product of cocaine base pyrolysis, on ferret and human myocardium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**v.30, p.352-9, 1997.

XIE, D. P.; CHEN, L. B.; LIU, C. Y.; ZHANG, C. L.; LIU, K. J.; WANG, P. S. Arecoline excites the colonic smooth muscle motility via M<sub>3</sub> receptor in rabbits. **Chin. J. Physiol.** , v. 47, p.89-94, 2004.

YAMADA, H.; OGURA, A.; KOIZUMI, S.; YAMAGUSHI, A.; MORIYAMA, Y. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. **J. Neurosci.**, v.18, p. 4946-4952, 1998.

YAMADA, H.; YAMAMOTO, A.; TAKAHASHI, M.; MICHIBATA, H.; KUMON, H.; MORIYAMA, Y. The L-type Ca<sup>2+</sup> channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. **J. Pineal Res.** v.21, p.165-74, 1996.



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

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

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

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

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