



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Síntese de Melatonina no Plexo Coróide

Sara Daniela Sousa Tavares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Telma Quintela

Co-orientadora: Prof. Doutora Cecília Santos

Covilhã, Junho de 2015

O conteúdo desta dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora:

(Sara Daniela Sousa Tavares)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, os melhores pais do mundo, porque sempre me apoiaram. À minha mãe, por ser uma grande mulher, pela sua enorme força, coragem, por todos os abraços, por estar sempre do meu lado, por todo o apoio, palavras amigas, conselhos e repreensões que fizeram de mim a pessoa que hoje sou, não há palavras para agradecer!

Ao meu pai, que mesmo longe está sempre comigo, que me apoia, que tanto esforço faz para que eu possa chegar mais longe, dedico-lhe todo este trabalho e todas as minhas conquistas, porque sem o seu apoio incondicional nunca teria conseguido. Obrigado por todo o amor, carinho, compreensão. Obrigado meu querido pai!

À minha querida irmãzinha Marta, por ser quem és e como és! É a menina mais querida que conheço, agradeço por me apoiar!

Ao Rúben, por nestes cinco anos ter estado sempre do meu lado, eu sei que nem sempre sou uma pessoa fácil. Compreensão, Ajuda e Apoio em tudo! A outra metade de mim, obrigado pelo por todo o amor!

E por fim, ao meu avô e padrinho Domingos, que mesmo não estando aqui para ver este momento, sei que ficaria muito orgulhoso de mim! Esteja onde estiver sei que ele está a olhar por mim e estará sempre no meu coração!

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive!”

Ricardo Reis

Agradecimentos

Quero começar por agradecer à Professora Doutora Telma Quintela pela excelente orientação, por me ter deixado fazer parte deste projeto, por todos os conhecimentos transmitidos, por todas as horas disponibilizadas para me ajudar, por ter acreditado em mim, foi muito agradável fazer parte deste trabalho. Um muito Obrigado por tudo!

À Professora Doutora Cecília Santos que tão prontamente me acolheu no seu grupo de investigação e me deu a oportunidade de fazer parte deste projeto. Não posso deixar de agradecer toda a disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Isabel Gonçalves por todo o apoio e por se mostrar sempre disponível em ajudar.

Ao Professor Doutor Luís Passarinha por todo o apoio, disponibilidade e ajuda fundamental na parte de HPLC. Obrigado por acreditar em mim!

À Professora Doutora Cândida Tomaz pela excelente diretora de curso que sempre foi e será, por todos os bons conselho, ajuda e disponibilidade!

À Colega e Amiga Tânia Albuquerque, um sincero e especial agradecimento por todo um ano de puro companheirismo, amizade e apoio incondicional! Partilhamos juntas este percurso e muito aprendemos uma com a outra! Obrigado por estares sempre presentes e por todos os teus falsetes!

À Colega e Amiga Andreia Domingos que me ajudou na parte inicial deste projeto, que me ensinou muito do que sei hoje, obrigado pela amizade, carinho e apoio. Apesar de longe, estás sempre presente!

À Colega e Amiga Daniela Talhada por toda a sua sabedoria, auxílio e amizade ao longo deste caminho!

A todos os meus amigos, os amigos que já vinham, aos que vieram e aos que foram, por todo o apoio incondicional e por estarem comigo sempre que preciso.

Este projeto teve o apoio da Fundação Para a Ciência e Tecnologia (FCT) PTDC/SAU-NEU/114800/2009 e do projeto COMPETE Pest-C/SAU/UI0709/2011.

Resumo

A melatonina é uma hormona produzida na glândula pineal que controla uma grande variedade de processos biológicos, sendo o mais importante a regulação do ciclo claro-escuro. Para além desta função a melatonina tem um importante papel como agente antioxidante, por atuar como *scavenger* de radicais livres e por potenciar a produção de outras enzimas antioxidantes. Na glândula pineal a sua produção apresenta oscilações circadianas, sendo libertada em elevadas concentrações durante a noite e a sua produção inibida durante o dia. Diversos estudos têm vindo a identificar outros tecidos e órgãos como produtores de melatonina, nomeadamente tecidos cerebrais como o hipocampo e cerebelo. Esta hormona é alvo de muitos outros estudos, particularmente na doença de Alzheimer, em que os seus efeitos benéficos na toxicidade induzida pelo péptido beta amilóide têm sido comprovados. Estes estudos concluíram que a melatonina é capaz de impedir a agregação do péptido em placas, proteger contra a apoptose e estimular a produção de outras enzimas antioxidantes. Como tal, este estudo teve como objetivos: confirmar a presença das enzimas envolvidas na síntese de melatonina no plexo coróide de rato; comprovar que o plexo coróide tem a capacidade de sintetizar melatonina; verificar se a sua síntese pode ser alterada por oscilações circadianas e analisar o efeito da disrupção do ritmo circadiano sob os níveis de expressão da enzima N-acetiltransferase. Foram ainda avaliados os efeitos da melatonina na expressão dos genes das proteínas *scavenger* do péptido beta amilóide. Observou-se que as enzimas da via de síntese de melatonina se encontram presentes no plexo coróide de rato, bem como a presença de melatonina e serotonina em meio de cultura das células epiteliais de plexo. A enzima N-acetiltransferase apresentou oscilações circadianas nos seus níveis de expressão de mRNA, no entanto a disrupção do ritmo circadiano não influenciou a sua expressão. Verificou-se também que a melatonina tem efeitos na expressão de mRNA dos genes *scavenger*, aumentando a sua expressão no caso da enzima de degradação da insulina, metalotioneina 2, transtirretina e gelsolina. Com a análise destes resultados, coloca-se a hipótese de que o plexo coróide pode realmente ser um tecido produtor de melatonina e que essa produção pode ser regulada pelo ritmo circadiano. Além disso, com a evidência de que a melatonina participa na regulação dos genes *scavenger* e como estes se encontram expressos no plexo coróide, podemos também concluir que o relógio circadiano deste tecido pode ajudar a manter o equilíbrio de produção/eliminação do péptido beta amilóide.

Palavras-Chave

Melatonina; Ritmo Circadiano; Plexo Coróide; Doença de Alzheimer.

Abstract

Melatonin is a hormone produced in the pineal gland that controls a wide range of biological processes, the most important being the regulation of the light-dark cycle. In addition to this function, melatonin plays an important role as an antioxidant agent, to act as a scavenger of free radicals and boost the production of other antioxidant enzymes. In the pineal gland its production presents circadian oscillations, being released in high concentrations during the night and inhibited during the day. Several studies have identified other tissues and organs as melatonin producers, namely, brain tissue such as hippocampus and cerebellum. This hormone is subject to many other studies, in particular Alzheimer's disease, where its beneficial effects in the toxicity induced by the amyloid beta peptide have been demonstrated. These studies concluded that melatonin is able to prevent aggregation of the peptide plates to protect against apoptosis and stimulates the production of other antioxidant enzymes. As such, this study aimed to: confirm the presence of enzymes involved in melatonin synthesis in rat choroid plexus; verify that the choroid plexus has the ability to synthesize melatonin; analyze if its synthesis exhibits circadian oscillations and also the effect of circadian rhythm disruption in the expression levels of N-acetyltransferase enzyme. It was further evaluated the effects of melatonin on the mRNA expression of amyloid beta scavenger proteins. It was observed that the enzymes of melatonin synthesis pathway are present in rat choroid plexus as well as the presence of melatonin and serotonin in culture medium of choroid plexus epithelial cells. N-acetyltransferase enzyme showed circadian oscillations in their mRNA expression levels, however disruption of circadian rhythms did not affect its expression. It was also found that melatonin has an effect on mRNA expression of amyloid beta scavengers, increasing the expression in the case of insulin degrading enzyme, metallothionein 2, transthyretin and gelsolin. With these results we have a strong indication that the choroid plexus may actually be a melatonin-producing tissue, and such production can be regulated by circadian rhythm. Moreover, with the evidence that melatonin participates in the regulation of amyloid beta scavengers and these are expressed in the choroid plexus, this tissue may help in maintaining the balance in production / elimination of the amyloid beta peptide.

Key Words

Melatonin; Circadian Rhythm; Choroid Plexus; Alzheimer's disease.

Índice

I	Introdução	1
1.	Melatonina	1
1.1.	Recetores de Melatonina	1
1.1.1.	Recetor MT1	1
1.1.2.	Recetor MT2	2
1.1.3.	Recetor MT3	2
1.1.4.	Recetores Nucleares	2
1.2.	Síntese e produção	5
1.3.	Locais de síntese	6
1.4.	Funções da melatonina	9
1.5.	Melatonina, envelhecimento e doenças neurodegenerativas	10
2.	Ritmo Circadiano	12
2.1.	Definição	12
2.2.	Mecanismo molecular do relógio circadiano	14
2.3.	O ritmo circadiano e a melatonina	16
2.4.	Disrupção do ritmo circadiano	18
3.	Plexo Coróide	19
3.1.	Organização e morfologia	19
3.2.	Funções	21
3.3.	O Plexo Coróide, envelhecimento e doenças neurodegenerativas	23
II.	Objetivos	25
III.	Materiais e Métodos	27
1.	Animais	27
1.1.	Recém-Nascidos	27
1.1.1.	Cultura primária de células epiteliais de plexo coróide	27
1.1.2.	Explantos e estímulo com melatonina	28
1.2.	Animais Adultos	28
1.2.1.	Experiência do ritmo circadiano	28
1.2.2.	Experiência da disrupção do ritmo circadiano	29
2.2.	HPLC- High Pressure Liquid Chromatography	30

2.1.	Soluções e Reagentes	30
2.2.	Padrão Interno	30
2.3.	Soluções Padrão	31
2.4.	Fase Móvel	31
2.5.	Equipamentos	32
2.5.1.	HPLC	32
2.5.2.	Coluna	32
2.5.3.	Detetor	32
2.6.	Amostras	32
2.7.	Extração da Melatonina	33
3.	Extração de RNA total e síntese de DNA complementar	34
3.1.	Extração de RNA Total	34
3.2.	Determinação da Integridade do RNA	35
3.3.	Quantificação do RNA Total	35
3.4.	Síntese de DNA complementar	35
4.	RT-PCR	36
5.	PCR em Tempo Real	37
6.	Análise Estatística	38
IV.	Resultados	39
1.	Confirmação da presença das enzimas envolvidas na síntese de melatonina no plexo coróide	39
2.	Presença de serotonina e melatonina em meio de cultura das CPEC	40
3.	Regulação da Expressão da enzima ANAT em CPEC pelo ritmo circadiano	43
4.	Regulação da expressão da enzima ANAT em plexo coróide de rato pelo ritmo circadiano	44
5.	Efeito da disrupção do ritmo circadiano na expressão da enzima ANAT no PC de rato	45
6.	Regulação da expressão dos AB <i>scavengers</i> em explantes de PC pela Melatonina	46
VI.	Discussão	49
VII.	Conclusões e Perspetivas Futuras	53
VII.	Bibliografia	55

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das vias de sinalização dos recetores de melatonina	3
Figura 2. Representação esquemática da síntese de melatonina	5
Figura 3. Representação da via que conecta a retina à glândula pineal	7
Figura 4. Representação esquemática de todas as alterações circadianas que ocorrem durante 24h	13
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo molecular presente no núcleo supraquiasmático	15
Figura 6. Diagrama representativo da regulação da luz no relógio circadiano	17
Figura 7. Localização do Plexo Coroide no Cérebro Humano	20
Figura 8. Secreção e Circulação do LCR	22
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1,5% ilustrando a expressão de mRNA dos genes das enzimas da via de síntese da melatonina em plexo coróide de rato	39
Figura 10. Cromatograma ilustrativo do ensaio em branco	40
Figura 11. Cromatograma que ilustra o pico de serotonina detetado no meio recolhido das CPEC	41
Figura 12. Cromatogramas ilustrativos da presença de melatonina detetado no meio recolhido das CPEC	42
Figura 13. Variação da expressão do mRNA da ANAT em CPEC de rato recolhidas a diferentes horas	43
Figura 14. Variação da expressão do mRNA da ANAT em PC de rato macho e fêmea a diferentes horas	44
Figura 15. Expressão relativa de mRNA do gene ANAT após disrupção circadiana, no plexo Coróide de rato	45
Figura 16. Efeitos da Melatonina sob a expressão dos genes sequestradores do péptido AB	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição dos recetores de melatonina e respetiva função	4
Tabela 2- Lista de primers utilizados para RT-PCR	36

Lista de Acrónimos

- 5-HT-** 5- hidroxitriptamina ou serotonina.
- ACE-** Enzima conversora da Angiotensina
- ADE-** Enzimas de degradação amilóide
- ANAT-** N-acetiltransferase
- ApoJ-** Apolipoproteína J
- APP's-** Proteínas associadas amilóides
- BMAL1-** *Brain and muscle ARNT-like protein 1*
- CLOCK-** *Circadian locomotor output cycles kaput*
- CPEC-** Células Epiteliais do Plexo Coróide
- CRY-** Criptocromo
- DA-** Doença de Alzheimer
- DDC-** Triptofano Descarboxilase
- DEPC-** Dietilpirocarbonato
- DMEM-** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- FBS-** Soro Fetal Bovino
- Gch1-** GTP ciclo-hidroxilase
- GchFr-** *GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein*
- Gls-** Gelsolina
- HIOMT-** Hidroxiindole-O-Metiltransferase
- HPLC-** *High-Pressure Liquid Chromatography*
- IDE-** Enzima de degradação da insulina
- LCR-** Líquido cefalorraquidiano
- mRNA-** RNA mensageiro
- NAS-** N-acetilserotonina
- NE-** Norepinefrina
- NPV-** Núcleo Paraventricular
- NSQ-** Núcleo Supraquiasmático

Pb- Pares de Bases

PBS- Tampão fosfato salino

PC- Plexo Coróide

Pcbd 1- *protocadherin beta 1*

PER- Período 1-2

REV-ERBs- Recetores Nucleares

RNases- Ribonucleases

ROS- Espécies reativas de oxigénio

RT- PCR- Reação em cadeia da polimerase via Transriptase Reversa

RZR/ RORs- *Retinoic acid-related orphan receptors*

SNC- Sistema Nervoso Central

TJ- *Tigh Junctions*

Tph1- Triptofano Hidroxilase 1

TTR- Transtirretina

I. Introdução

1. Melatonina

A melatonina, 5-metoxi-N-acetilriptamina, é uma neurohormona produzida na glândula pineal (Tijmes et al., 1996). Quimicamente caracteriza-se por ser uma indolamina lipofílica derivada do aminoácido triptofano, que possui propriedades hidrofóbicas (Naranjo et al., 2007).

Esta hormona está implicada em vários processos neurofisiológicos como o ritmo circadiano, regulação do sono e do humor, processos anti-inflamatórios e antioxidantes (Pandi-Perumal et al., 2008).

1.1. Recetores de Melatonina

A melatonina atua através de dois recetores transmembranares, MT1 e o MT2 (Ekmekcioglu, 2006). Os recetores MT1 e MT2 pertencem à superfamília dos recetores acoplados à proteína G, e são constituídos por sete domínios membranares (Ekmekcioglu, 2006).

Um terceiro sítio de ligação da melatonina foi mais tarde identificado e inicialmente designado de “MT3”, mas posteriormente foi caracterizado e apresenta 95% de homologia com a enzima quinona redutase 2 humana. Esta enzima humana enquadra-se num grupo de redutases que protegem contra o *stress* oxidativo (Pandi-Perumal et al., 2008).

Na figura 1 pode observar-se um esquema do mecanismo de ação dos recetores de melatonina. Adicionalmente, na tabela 1, encontra-se a descrição da localização dos mesmos.

1.1.1. Recetor MT1

O recetor MT1 encontra-se presente no Sistema Nervoso Central (SNC), mais especificamente no cerebelo, hipotálamo, hipocampo, substância *nigra*, área tegmental ventral, núcleo *accumbens*, glândula pituitária e no plexo Coróide (Lacoste et al., 2015).

Exteriormente ao cérebro encontra-se presente ainda nos ovários, testículos, glândula mamária, córtex adrenal, placenta, baço, pâncreas, vasos sanguíneos coronários e artéria aorta, fígado, rim, vesícula biliar, pele e sistema imunitário (Pandi-Perumal et al., 2008).

Da ativação deste recetor resulta a inibição da formação de cAMP e diminuição da atividade da Proteína Quinase A (Figura 1) (Ekmekcioglu, 2006).

1.1.2. Recetor MT2

O recetor MT2 é expresso de um modo mais restrito, centralizando a sua presença maioritariamente no cérebro, mas coexiste ainda no pulmão, retina, glândula pituitária, tecido cardíaco aórtico e coronário, miométrio e granulosa, células imunitárias, duodeno e tecido adiposo (Wood & Loudon, 2014).

Em conformidade com o recetor MT1, a ativação deste recetor provoca uma inibição na produção do cAMP e cGMP (Zawilska et al., 2009).

1.1.3. Recetor MT3

Por fim, o “recetor MT3” é expresso no fígado, rim, cérebro, coração, pulmão, intestino, músculo, tecido adiposo castanho e olho (Pandi-Perumal et al., 2008).

Este recetor também identificado como quinona redutase 2, assume um papel importante na captação de radicais livres, toxinas e metais pesados. As funções antioxidantes, neuroprotetoras e cronobióticas da melatonina podem também ser devidas à sua interação com este recetor (Pala et al., 2014).

1.1.4. Recetores Nucleares

A melatonina pode exercer alguns dos seus efeitos através dos recetores nucleares da família ROR/RZR, ilustrados de igual modo na figura 1. A estrutura destes recetores consiste num domínio N-terminal, um domínio de ligação do DNA, uma região “dobradiça” e um domínio de ligação ao ligando no C-terminal (Pandi-Perumal et al., 2008). Estes recetores encontram-se distribuídos consoante o seu subtipo: o RZRB pode ser encontrado nos tecidos neuronais e o RZR α no tecido adiposo, pele, testículos, cartilagem e fígado (Pandi-Perumal et al., 2008).

Os recetores medeiam os efeitos genómicos exercidos pela melatonina, nomeadamente a capacidade de induzir a síntese de enzimas antioxidantes (Gupta et al., 2015).

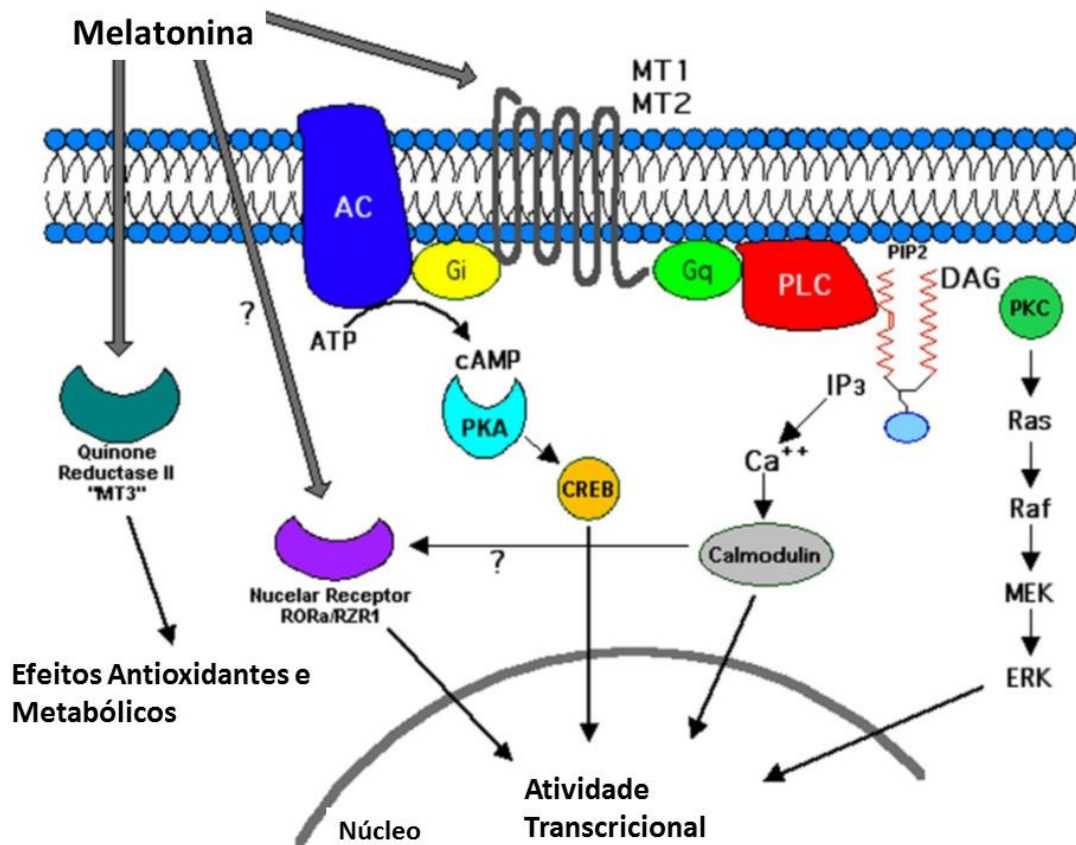


Figura 1-Representação esquemática das vias de sinalização dos receptores de melatonina. A melatonina exerce os seus efeitos biológicos através dos receptores membranares MT1 e MT2, ou via receptores nucleares ROR/RZR. Adaptado de (Pandi-Perumal et al., 2008).

Tabela 1-Distribuição dos recetores de melatonina e respetiva função. Adaptado de (Pandi-Perumal et al., 2008).

Localização	Recetores	Função da Melatonina
Núcleo Supraquiasmático	MT2	Regulação do Ritmo Circadiano
Retina	MT2, ROR α	Diminuição da libertação de dopamina
Vasculatura	MT1, MT2	MT1: vasoconstritor MT2: vasodilatador
Sistema Imunitário	MT1, MT2, ROR α	Inibição da ação dos leucotrienos Estimula a proliferação de células imunitárias Estimulação da produção de IL2 e IL6.
Sistema Reprodutor	MT1, MT2	Diminuição da libertação de GnRH, LH e FSH
Pâncreas	MT1, MT2, ROR α	Diminuição da libertação de insulina
Pele	MT1, MT2, ROR α	Regulação do crescimento do cabelo e a função da epiderme.
Trato Gastro Intestinal	MT1, MT2	Diminuição do peristaltismo, e ação da serotonina.
Osso	MT1, ROR α	Aumento da atividade dos osteoblastos e diminuição da ação dos osteoclastos
Rins	MT1, MT2	Proteção contra a inflamação e regula a filtração glomerular
Placenta	MT1, MT2, ROR α	Scavenger das ROS, diminuição da taxa de apoptose
Útero	MT1, MT2	Contractilidade Miometrial
Endométrio	MT1, MT2	Invasão de trofoblastos no início da gravidez

1.2. Síntese e produção

A biossíntese de melatonina inicia-se com a captação ativa do aminoácido triptofano, dos capilares para a glândula pineal. O triptofano é posteriormente hidroxilado e descarboxilado em serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (Chattoraj et al., 2009). A serotonina, por sua vez, vai ser n-acetilada pela enzima N-acetiltransferase (ANAT) em N-acetilserotonina (NAS). A NAS é então convertida em melatonina, pela ação da enzima Hidroxiindole-O-Metiltransferase (HIOMT; Figura2). (Lanoix et al., 2008).

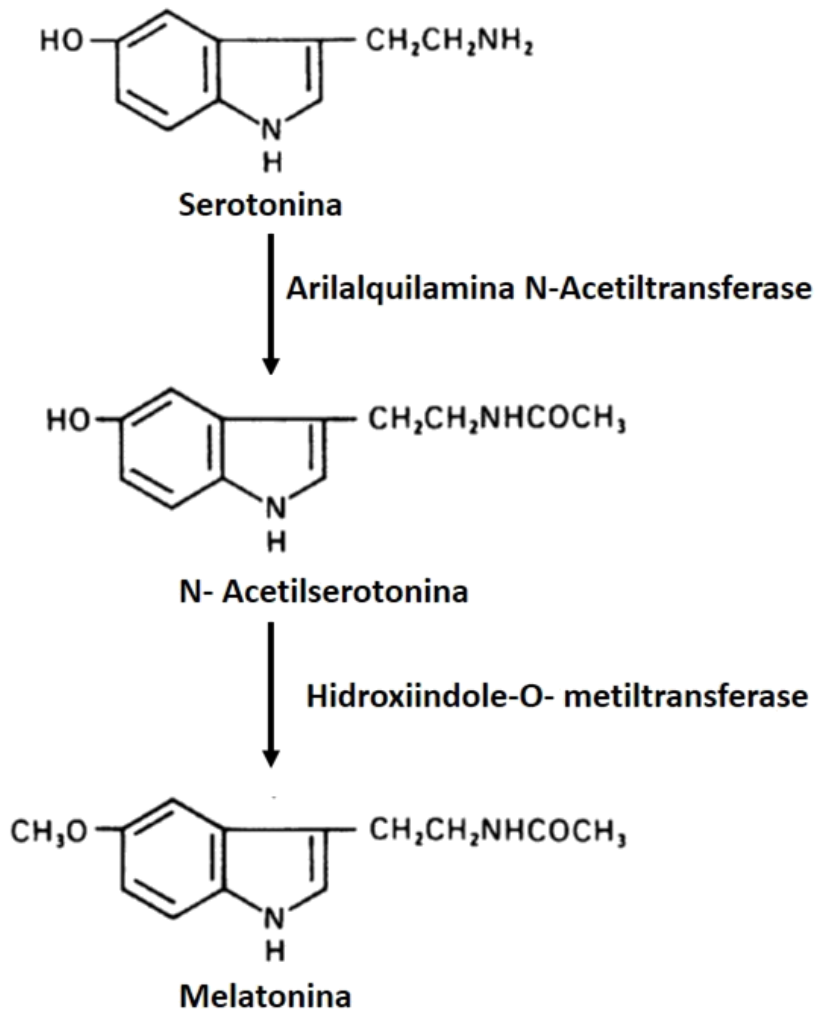


Figura 2- Representação esquemática da síntese de melatonina. Adaptado de (Klein et al., 2010).

A enzima ANAT é considerada a enzima chave em termos de regulação do processo de síntese de melatonina. Neste sentido, alterações na concentração de melatonina são o reflexo de oscilações na atividade e/ou nos níveis da ANAT (Zawilska et al., 2009). Por outro lado, a síntese de melatonina depende ainda da biodisponibilidade do triptofano. A biodisponibilidade deste aminoácido está sujeita a determinados fatores nutricionais como os níveis de folatos e vitamina B6, uma coenzima capaz de estimular a síntese de melatonina (Claustrat et al., 2005).

A ANAT tem um único centro catalítico, o qual apresenta elevada afinidade para arilalquilaminas, como a triptamina e a serotonina. A atividade da ANAT na glândula pineal humana é regulada pelo ritmo circadiano gerado pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), no hipotálamo anterior (Zawilska et al., 2009). Além da regulação pelo relógio circadiano a expressão desta enzima é ainda regulada por mecanismos de “turn-off”. (Zawilska et al., 2009).

As concentrações de melatonina são baixas durante o dia e altas durante a noite, exibindo um aumento característico após a escuridão e um pico perto do ponto médio do intervalo de escuridão (Klein, 2007). Os níveis plasmáticos, em humanos, aumentam normalmente entre as 18:00 e as 20:00, e apresentam o seu pico máximo entre a meia-noite e as cinco da manhã. A duração e a amplitude deste pico estão negativamente relacionadas com a duração do fotoperíodo (de Almeida et al., 2011). A iluminação noturna leva à degradação da enzima ANAT atuando como supressora da formação de melatonina e inibe, por consequência, a sua secreção da glândula pineal (Hardeland, 2012).

Em relação aos mecanismos de catabolismo e *clearance*, o fígado é responsável pela eliminação de mais de 90% da melatonina, tornando-se o local primordial para a sua degradação. No entanto uma porção considerável é ainda eliminada pelo rim (Macchi & Bruce, 2004).

1.3. Locais de síntese

O local *major* de produção de melatonina é a glândula pineal, que é um órgão neuroendócrino situado na linha média do cérebro. A sua principal função consiste na transdução de sinais de presença ou ausência de luz para todo o organismo, através da produção da hormona melatonina (Borjigin et al., 2012). A glândula pineal recebe inervação adrenérgica, que ativa uma cascata de eventos circadianos que levam à conversão da serotonina em melatonina (Borjigin et al., 2012).

Na figura 3 observa-se a via que conecta a retina à glândula pineal e que conduz o sinal para que ocorra produção de melatonina. Na ausência de luz o trato retino hipotalâmico transmite a informação da retina para o NSQ que gera, por sua vez, o sinal para a glândula pineal de modo a regular a produção de melatonina. A exposição à luz bloqueia a transmissão do sinal

do trato retino hipotalâmico para o NSQ, inibindo desta forma a produção de melatonina. A melatonina funciona como um “código químico” para a noite, dado que, noites mais longas estão relacionadas positivamente com uma maior duração da sua secreção (Mirick & Davis, 2008).

Na glândula pineal os genes mais expressos e com uma regulação circadiana são os que codificam proteínas essenciais na síntese de melatonina, incluindo Triptofano Hidroxilase 1 (Tph1), Triptofano Descarboxilase (Ddc), ANAT e HIOMT. Além destes é de referir também os genes responsáveis pela codificação de cofatores para as enzimas da via de síntese da melatonina, são eles *GTP ciclo-hidroxilase (Gch1)*, *GTP cyclohydrolase 1 feedback regulatory protein (GchFr)* e *protocadherin beta 1 (Pcbd 1-)* (Klein et al., 2010).

Além da melatonina, outras indolaminas fisiologicamente ativas são produzidas na glândula pineal, incluindo a 5-metoxitriptofol, que apresenta um ritmo circadiano semelhante à melatonina (Macchi & Bruce, 2004).

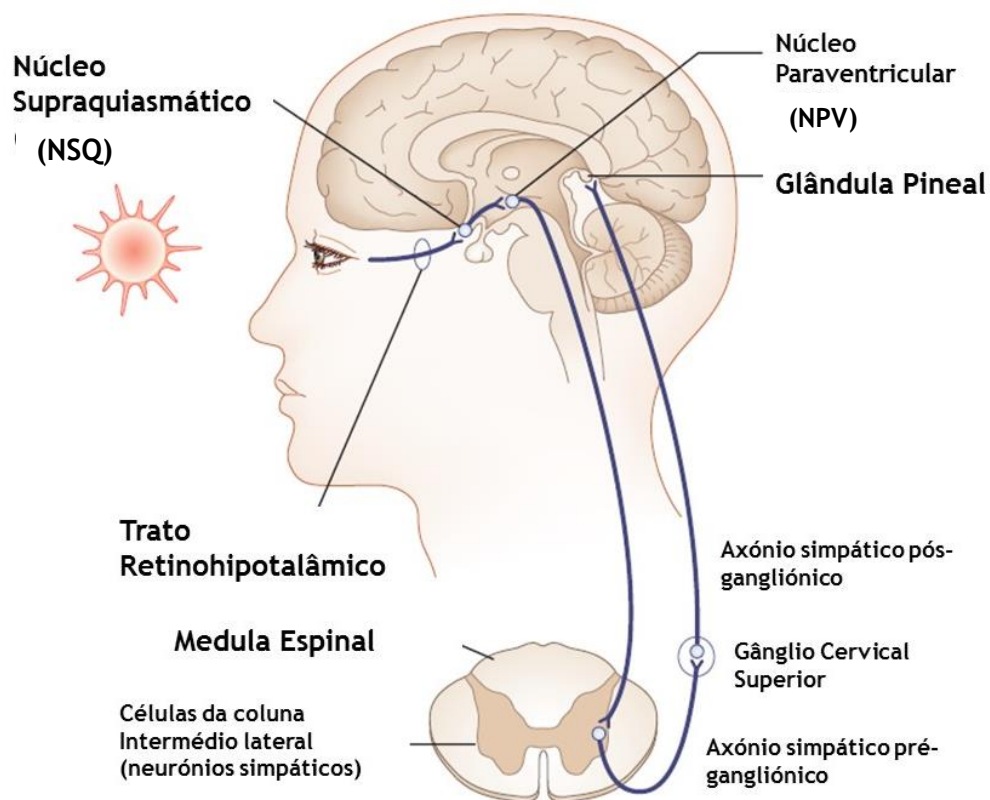


Figura 3- Representação da via que conecta a retina à glândula pineal. A informação de luz é inicialmente enviada da retina para o NSQ, onde se localiza o relógio circadiano. Daí o sinal percorre o núcleo paraventricular, o núcleo intermédio lateral e o gânglio cervical superior, que transmite o sinal para a glândula pineal. Adaptado de (Introduction, 2015).

Como referido anteriormente, a melatonina foi isolada pela primeira vez a partir da glândula pineal (Stefulj et al., 2001). Por volta dos anos 70 a produção de melatonina extra pineal começou a ganhar os seus contornos quando, após a remoção da glândula pineal, esta ainda se encontrava presente em amostras de plasma e urina dos animais pinealectomizados, indicando que existiria uma síntese extra pineal bastante significativa (Naranjo et al., 2007).

A síntese de melatonina foi descrita noutros tecidos: retina, medula óssea, timo, trato gastrointestinal, órgãos reprodutivos, pele, plaquetas, células do sistema imunitário e distintas áreas cerebrais, onde exerce efeitos autócrinos e parácrinos (Lanoix et al., 2008).

Nos mamíferos a retina também tem a capacidade de sintetizar melatonina, e esta via de produção acompanha, à semelhança da glândula pineal, os eventos circadianos (Klein et al., 2010).

Já foi demonstrado também que a melatonina é sintetizada no ovário, pela mesma via de síntese que ocorre na pineal, através das enzimas ANAT e HIOMT a partir da serotonina. Do mesmo modo, é também produzida nos oócitos (Sakaguchi, Itoh, Takahashi, Tarumi, & Ishizuka, 2013). O timo aparenta ser, de igual modo, um tecido produtor de melatonina (Naranjo et al., 2007).

Demonstrou-se que culturas celulares de astrócitos têm a capacidade de produzir melatonina, sendo que expressam igualmente ambas as enzimas (Liu et al., 2007).

No hipocampo, cerebelo, bulbo olfativo e no córtex pré-frontal, foram descritas atividades elevadas da enzima ANAT. No hipotálamo existem quantidades elevadas de melatonina à noite, que se pensa serem libertadas por este tecido. Elevada atividade enzimática e concentrações de melatonina altas sugerem que o córtex e o cerebelo são também capazes de produzir melatonina (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

1.4. Funções da melatonina

A função primordial da melatonina é operar como regulador primário do ritmo circadiano. Mais especificamente, a melatonina tem como principais funções a regulação do ambiente hormonal interno e do ciclo claro-escuro do ambiente externo (Tsang et al., 2014). A melatonina é também responsável por modular vários sistemas fisiológicos como a função imunitária, metabolismo, controlo da pressão arterial, desenvolvimento na puberdade e *scavenger* de radicais livres (Tsang et al., 2014).

A síntese e presença de melatonina em neurónios ou em células gliais indicam que esta pode exercer funções intracelulares, parácrinas e autócrinas no cérebro, possivelmente na regulação da homeostasia neuronal, através da libertação de neurotransmissores e da neurogénese. A melatonina regula também propriedades da membrana neuronal incluindo a atividade da bomba ATPase. Além disso exerce ainda efeitos anti-excitotóxicos e de proteção no cérebro. Em ratos, a melatonina estimula a dendritogénese e modula a organização do citoesqueleto em células do hipocampo e em animais com lesão cerebral promove a neurogénese. Assim, doses terapêuticas de melatonina podem auxiliar, não só na redução da lesão cerebral, mas também no tratamento de patologias neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, através da reparação do tecido danificado e promoção das conexões sinápticas (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

1.5. Melatonina, envelhecimento e doenças neurodegenerativas

De todos os mecanismos possivelmente relacionados com a idade, um dos mais estudados é o *stress* oxidativo, ao qual está associado o desgaste do organismo causado maioritariamente pela acumulação de radicais livres ao longo do tempo. Os principais radicais livres são as espécies reativas de oxigénio e de azoto (Espino et al., 2012).

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são produzidas principalmente pelos complexos I e III mitocondriais, uma vez que, daí são libertados eletrões para o sistema respiratório, sendo estes os responsáveis pela formação de radicais peróxido, radicais superóxido e radicais hidroxilo (Singh & Jadhav, 2014). Estas espécies reativas de oxigénio e os radicais a que dão origem podem causar danos graves no DNA, conduzindo a alterações na estrutura de proteínas e afetar vias de sinalização (Cardinali et al., 2013).

As ROS além de disseminarem danos celulares levam ainda ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio e conseqüentemente conduzem as células à apoptose, elevando as taxas de morte celular. O SNC, que detém uma grande atividade metabólica e onde existe um enorme tráfego de iões cálcio, é pois muito sensível ao *stress* oxidativo (Sarlak et al., 2013).

A geração destes radicais é a chave para o desenvolvimento de várias patologias relacionadas com neurodegeneração, imunidade, inflamação e doenças mitocondriais (Singh & Jadhav, 2014). Com o envelhecimento existe um mecanismo de neurodegeneração que se presume, mais uma vez, ser devido à presença destes radicais livres e ao *stress* oxidativo (Cardinali et al., 2013). A melatonina exhibe características diretas e indiretas com ação antioxidante, uma vez que detém a capacidade de equilibrar os efeitos causados pelas ROS (de Almeida et al., 2011).

Ao reagir contra as ROS, a melatonina demonstra ser um inibidor eficaz da peroxidação lipídica (Cardinali et al., 2013). A melatonina é metabolizada pelos radicais livres e convertida em 3-hidroximelatonina cíclica, fornecendo assim potencial antioxidante (Singh & Jadhav, 2014). Esta hormona funciona então como um eliminador dos radicais hidroxilo e peróxil e ainda estimula as enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase, que são cruciais para a eliminação dos radicais livres (Singh & Jadhav, 2014).

Desde o nascimento até a puberdade, os níveis de melatonina estão em constante aumento, entrando em declínio a partir da meia-idade. Este decréscimo verifica-se tanto nos níveis diários, como nos níveis noturnos de melatonina (Hardeland, 2012). Durante o processo de envelhecimento o cérebro passa por diversas alterações. As modificações abrangem a diminuição do volume cerebral, aumento no volume do sistema ventricular, redução da substância branca e perda de massa cinzenta em regiões cerebrais distintas (Sarlak et al., 2013).

Por outro lado, indivíduos mais velhos adormecem e acordam mais cedo, em relação com o padrão de secreção noturna da melatonina. Deste modo, acordam quando o seu pico de melatonina alcança o seu máximo (Wu & Swaab, 2007). O déficit de melatonina tem sido alvo de estudos na glândula pineal, circulação sanguínea, saliva, líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como, através da quantificação do seu metabolito, 6-sulfatoximelatonina, na urina (Hardeland, 2012). O declínio nos níveis de melatonina pode ser causado pela deterioração, relacionada com a idade, do *pacemaker* circadiano ou da transmissão neuronal para a glândula pineal, em concordância com o que se observa em circunstâncias de patologia neurodegenerativa, ou pode ainda advir da calcificação da pineal (Wu & Swaab, 2007).

Na doença de Alzheimer (DA) sabe-se que os níveis de melatonina estão drasticamente diminuídos no LCR, inclusivamente, num estágio muito prematuro da condição patológica. Nesta doença, está ainda reduzida a expressão dos recetores MT1 e MT2 (Liu et al., 2007).

2. Ritmo circadiano

2.1. Definição

Os mamíferos exibem um largo espectro de adaptações fisiológicas sazonais, que incluem os ciclos de crescimento, metabolismo, termogênese, hibernação, migração e comportamento sexual, todos eles sincronizados por um sistema relógio interno (Wood & Loudon, 2014).

Deste modo, a maioria dos organismos, desde a cianobactéria até ao humano, desenvolveram um sistema de “relógio” biológico, com o objetivo de se adaptarem ao ciclo dia-noite. Este relógio circadiano está sincronizado com estímulos externos, chamados de sinais de *Zeitgeber*, sendo que o mais importante é o ciclo claro-escuro (Merbitz-Zahradnik & Wolf, 2015).

O termo circadiano deriva do latim *Circa diem*, que significa “sobre o dia”. O ritmo circadiano é um sistema altamente específico, responsável pela regulação de processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, que compreende um período de aproximadamente 24 horas (Chattoraj et al., 2009).

Este processo circadiano é em termos evolutivos extraordinariamente conservado, devido à carência de sincronizar toda a atividade biológica com as persistentes, mas conjeturáveis, mudanças fomentadas pela rotação da Terra (Robinson & Reddy, 2014)

Por outro lado, o sistema relógio é extremamente versátil, permanecendo capacitado para reagir a qualquer alteração ou estímulo externo, como temperatura e ingestão de alimentos que são, por sua vez, hábeis a restabelecer o ritmo e assegurar a homeostasia do organismo (Masri et al., 2013).

Mecanicamente trata-se de um sistema relógio autónomo, composto por *loops* e *feedbacks* que interagem com *E-boxes* em genes promotores (Tsang et al., 2014), sendo influenciado por uma variedade de fatores (Chattoraj et al., 2009).

Nos mamíferos o relógio circadiano está estruturado hierarquicamente. O oscilador central (*Pacemaker/Masterclock*) está localizado no NSQ, e atua mantendo o ritmo diário em concordância com o ambiente externo (Richards & Gumz, 2012). Adicionalmente os mamíferos possuem relógios periféricos localizados em praticamente todos os órgãos e tecidos, gerando um ritmo circadiano local. (Merbitz-Zahradnik & Wolf, 2015).

O NSQ é uma estrutura bilateral com elevada densidade celular, localizado adjacientemente ao terceiro ventrículo cerebral. Na sua constituição existem cerca de 50000 neurónios em humanos e 20000 em roedores (Tsang et al., 2014). Em indivíduos cegos o *Zeitgeber* não está sincronizado com a luz ambiental e têm um ciclo livre de 24,5 a 25 horas (Rohr & Herold, 2002).

É então devido ao ritmo circadiano que todos os organismos têm a capacidade de conjugar processos inconciliáveis ou concorrentes e sincronizar períodos de atividade, alimentação e descanso durante os períodos de luz, deferindo esta competência vantagens seletivas aos organismos (Robinson & Reddy, 2014). Na figura 4 podem ser observadas as oscilações circadianas pelas quais o organismo humano passa ao longo de um ciclo de 24h.

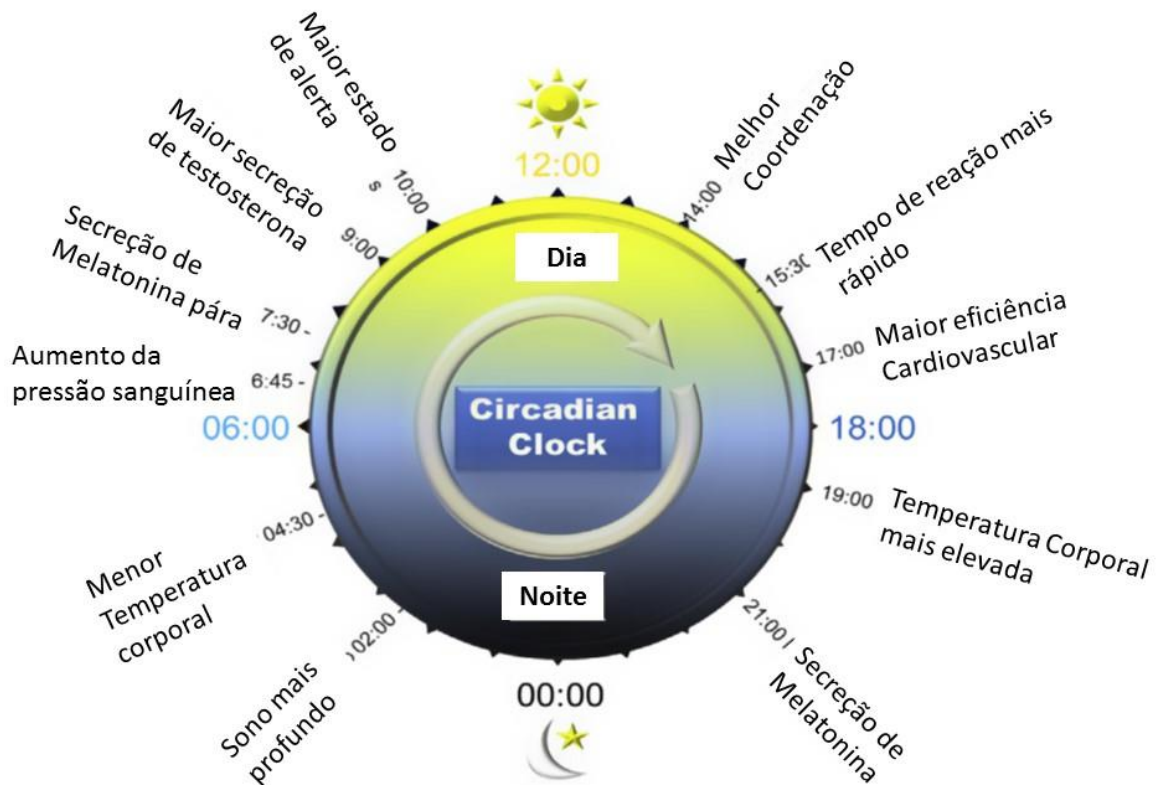


Figura 4- Representação esquemática de todas as alterações circadianas que ocorrem durante 24h. Adaptado de (Robinson & Reddy, 2014).

2.2. Mecanismo molecular do relógio circadiano

Os componentes chave do processo molecular do relógio circadiano, que conferem um comportamento rítmico, estão amplamente caracterizados em inúmeras espécies (Robinson & Reddy, 2014).

Nos mamíferos os genes Período (Per1, Per2 e Per3) e Criptocromo (Cry1 e Cry2) constituem os componentes centrais do relógio circadiano. A expressão destes genes é ativada pelo dímero proteico formado pelas proteínas *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK) e *Brain-Muscle Arnt-Like protein 1* (BMAL1) (Merbitz-Zahradnik & Wolf, 2015) (Figura 5).

No global, as proteínas PER e CRY formam complexos no citoplasma que a determinada altura migram para o núcleo, onde inibem a ação do BMAL e CLOCK e consequentemente inibem a sua própria transcrição (Robinson & Reddy, 2014).

Para além deste *loop* principal, existe um segundo *loop* de *feedback* relevante para a rede de “genes relógio”. Este segundo *loop* envolve recetores nucleares REV-ERB α /B e os ROR α , que ativam e reprimem respetivamente a transcrição do BMAL1, através de um ciclo de transcrição em anti-fase (Frank et al., 2013).

Oscilações na transcrição dos recetores REV-ERB α /B e ROR α conferem ritmicidade na expressão do BMAL1, e o complexo BMAL1/CLOCK atua diretamente no gene do recetor REV-ERB α /B, estabelecendo deste modo o *loop* secundário do ritmo circadiano (Frank et al., 2013).

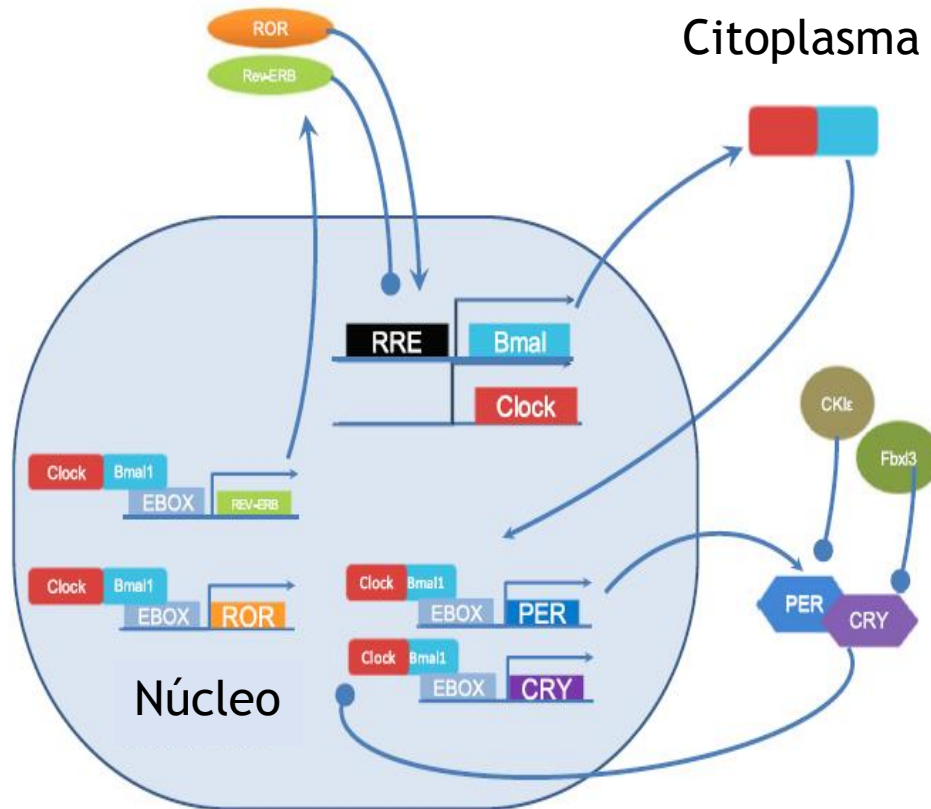


Figura 5- Representação esquemática do mecanismo molecular presente no núcleo supraquiasmático. Os produtos de transcrição do BMAL e COCK deslocam-se para o citoplasma e dimerizam. Posteriormente, retornam ao núcleo e ligam a *E-boxes* promovendo a transcrição dos *Per*, *Cry*, *REV-ERB* e *ROR*. *Per* e *Cry* deslocam-se até ao citoplasma dimerizam e quando retornam ao núcleo inibem a formação do complexo *CLOCK/BMAL1*. *Per* e *Cry* são subsequentemente degradados por ligação à proteína cinase e *Fbxl3* respetivamente. *REV-ERB* inibe a transcrição do *BMAL*, enquanto que, o *ROR* promove a transcrição do *BMAL1*. Adaptado de (Robinson & Reddy, 2014)

2.3. O Ritmo circadiano e a melatonina

O ritmo da Melatonina é gerado pelo relógio central localizado no NSQ, bem como outros ritmos biológicos (alimentação, ciclos de sono, temperatura, cortisol, etc.). Deste modo, o ciclo claro-escuro é o regulador da secreção de melatonina. Oscilações nos níveis da enzima ANAT causam ritmicidade na síntese de melatonina. Após a exposição à luz os níveis de ANAT diminuem enquanto que na escuridão estes aumentam (Coomans et al., 2015) (Figura 8).

A luz inibe a síntese de melatonina durante o dia, e a sua ausência estimula, por outro lado, a síntese durante a noite. O fotoperíodo externo influencia a atividade elétrica do NSQ, permitindo deste modo que ocorram dias maiores no verão e menores no inverno. Durante o verão o sinal de melatonina é relativamente mais curto quando comparado com o inverno, em que o sinal de melatonina é mais prolongado. Estas mudanças induzidas pelo fotoperíodo na secreção de melatonina têm inúmeros efeitos na fisiologia e comportamento sazonal (Coomans et al., 2015).

A melatonina é então secretada durante o período de escuridão. Deste modo, a função da melatonina, como já foi referido anteriormente, é mediar sinais de luz/escuridão associada a uma regulação do ritmo circadiano e sazonalidade. Assim, a melatonina através desta informação comporta-se como um sincronizador endógeno capaz de estabilizar o ritmo circadiano. Após uma exposição noturna repetida à luz, a produção de melatonina é deslocada para a parte da manhã, aumentando o sono diurno. Além disso, há uma relação clara entre a duração dos períodos de sono e a secreção de melatonina (Figura 6) (Claustrat et al., 2015).

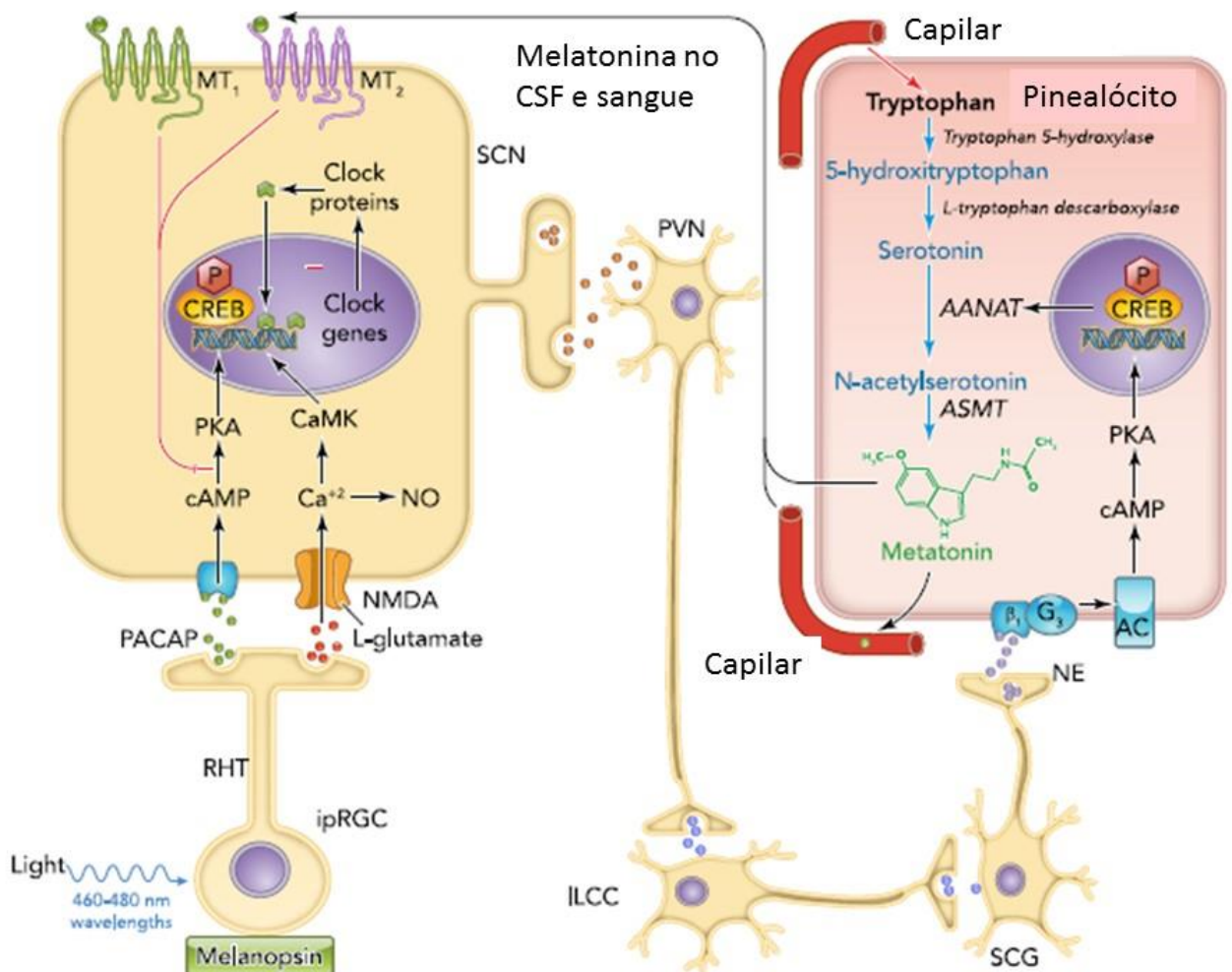


Figura 6- Diagrama representativo da regulação da luz no relógio circadiano. A retina recebe a informação da luz, que é transmitida para o NSQ e posteriormente alcança a glândula pineal, onde regula a síntese de melatonina a partir do triptofano. Esta via envolve sinapses no núcleo paraventricular (NPV), na coluna intermediolateral (ILCC) e no gânglio cervical superior (GCS). A melatonina libertada no LCR e no sangue atua no NSQ para modular a atividade circadiana, bem como as oscilações circadianas nos tecidos periféricos. AANAT, arylalkylamine N-acetyltransferase; AC, adenylate cyclase; ASMT, acetylserotonin methyl transferase; CaMK, calcium/calmodulin protein kinase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CREB, cAMP response element-binding protein; CSF, cerebrospinal fluid; NE, norepinephrine; NMDA, N-methyl-D-aspartate receptor; NO, nitric oxide; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating peptide; PKA, protein kinase A; RHT, retinohypothalamic tract. Adaptado de (Reiter et al., 2014).

2.4. Disrupção do ritmo circadiano

As doenças cronobiológicas são o resultado da dessincronização do ritmo circadiano com os ritmos ambientais (Chattoraj et al., 2009).

A disfunção do ritmo circadiano pode resultar do trabalho por turnos ou doenças neurodegenerativas, aparentando ter ligação a uma ampla gama de doenças como a depressão, dor, inflamação, doenças coronárias, diabetes e cancro, demonstrando a importância da manutenção dos ciclos claro/escuro (Wu & Swaab, 2007).

Uma vez que o ritmo circadiano é fundamental para o ciclo do sono, as alterações no relógio durante o envelhecimento são muito frequentemente relacionadas com distúrbios de sono associados à idade, como a redução do sono noturno de qualidade e a diminuição do estado de alerta durante o dia (Wu & Swaab, 2007).

Sendo a melatonina um regulador primário do ritmo circadiano, quantificável numa ampla gama de amostras biológicas, como a urina, sangue e saliva, assume, deste modo, um papel fundamental como biomarcador da desregulação circadiana (Mirick & Davis, 2008).

3. Plexo Coróide

3.1. Organização e morfologia

O plexo coróide (PC) humano é um tecido que está localizado nos ventrículos cerebrais e pesa aproximadamente 2 gramas. Existem quatro plexos, um em cada ventrículo cerebral como se pode observar na Figura 7. Os plexos dos ventrículos laterais são semelhantes estruturalmente com os do terceiro e quarto ventrículo. São constituídos por uma rede vascular, revestida por uma única camada de células cúbicas epiteliais, chamadas células endimárias, unidas por junções muito apertadas. Entre o endotélio e o epitélio está localizado o estroma (Spector & Johanson, 2013). No lado basolateral o epitélio contacta com o estroma vascular, já no lado apical contacta com os ventrículos cerebrais (Janssen et al., 2013).

As células epiteliais do plexo diferem de outras células epiteliais por formarem a barreira cerebral na parte fenestrada. Estas células apresentam um elevado conteúdo mitocondrial, 12-15% do volume celular, o que pode ser explicado pelas necessidades energéticas requeridas para o transporte transepitelial (Spector et al., 2015).

O epitélio do PC é caracterizado pela presença de sistemas de transporte muito específicos e uma atividade pinealocítica muito baixa, conferindo-lhe uma grande capacidade de controlar a passagem de substâncias (Schwerk et al., 2015).

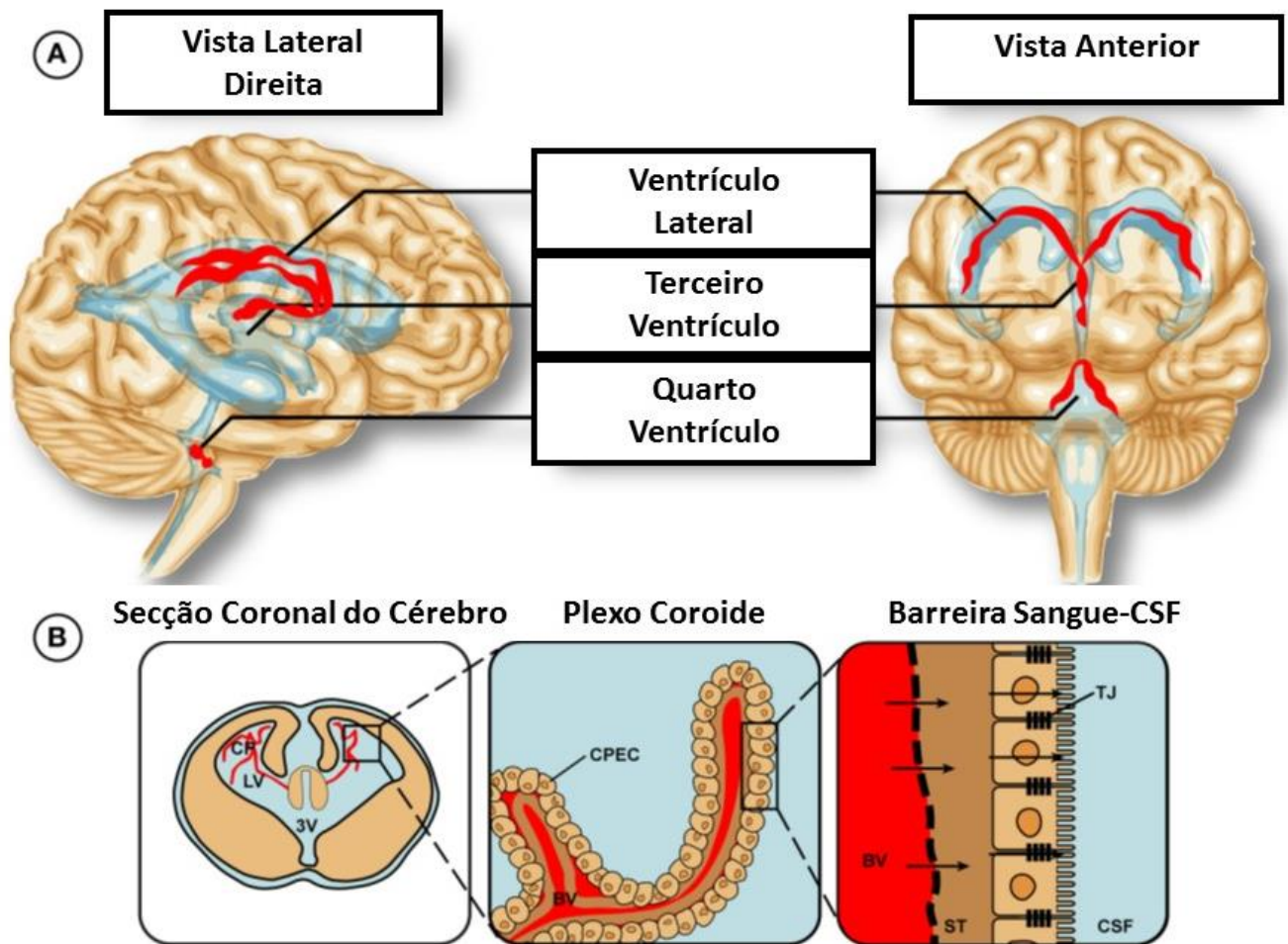


Figura 7- Localização do Plexo Coróide no Cérebro Humano. (A) Ilustração da presença do plexo nos ventrículos laterais, terceiro e quarto ventrículo, assinalados a vermelho. (B) Cada plexo é constituído por vasos fenestrados, revestidos por uma única camada de células epiteliais, unidos por junções muito apertadas, formando a barreira Sangue-CSF. Abreviaturas: BV- Vasos Sanguíneos; CP- Plexo Coróide; CPEC- Células Epiteliais do Plexo Coroide; CSF- Líquidos Cefalorraquidiano, LV- Ventrículo Lateral; NU- Núcleo; ST- Estroma/ membrana basal; TJ- Junções Apertadas; 3V- Terceiro Ventrículo. Adaptado de (Liddelow, 2015).

3.2. Funções

O plexo participa de um modo crucial na manutenção da pressão nos ventrículos, metabolismo cerebral, funções celulares dos neurónios, em processos imunológicos e inflamatórios, na comunicação celular, neuroproteção após isquemia e neurodegeneração (Janssen et al., 2013).

O epitélio do plexo secreta, na sua maioria, LCR que ajuda a manter o ambiente cerebral extracelular estável. O PC consegue manter este equilíbrio por eliminar substâncias indesejadas e por bombear compostos fundamentais, como vitaminas, hormonas e péptidos através do LCR (Spector & Johanson, 2013).

No SNC é essencial que a composição do ambiente extracelular seja extremamente bem controlada para o ótimo funcionamento neuronal. Como tal, existem duas barreiras que promovem a separação eficiente entre o plasma circulante e os fluidos cerebrais extracelulares. A *blood-brain-barrier*, que separa o plasma do líquido intersticial do cérebro e a *blood-cerebrospinal fluid barrier* que, por sua vez, separa o sangue do LCR. Estas estruturas impedem a difusão livre de solutos, eliminam e precavêm a passagem de xenobióticos, facultando um ambiente controlado requerido para o ótimo funcionamento do SNC. O fenótipo destas barreiras é conseguido pela existência de junções muito apertadas (*tight junctions*) entre células adjacentes do epitélio do PC (Redzic, 2013).

O PC humano produz 400-600 mL de LCR por dia. O LCR que sai dos ventrículos laterais segue para o terceiro e quarto ventrículos, e posteriormente flui para o espaço subaracnoide do cérebro e medula espinal pelas aberturas ao longo do cerebelo. No final regressa para a circulação periférica através da reabsorção pelas granulações aracnoicas nos seios venosos do cérebro (Figura 8) (Lehtinen et al., 2013).

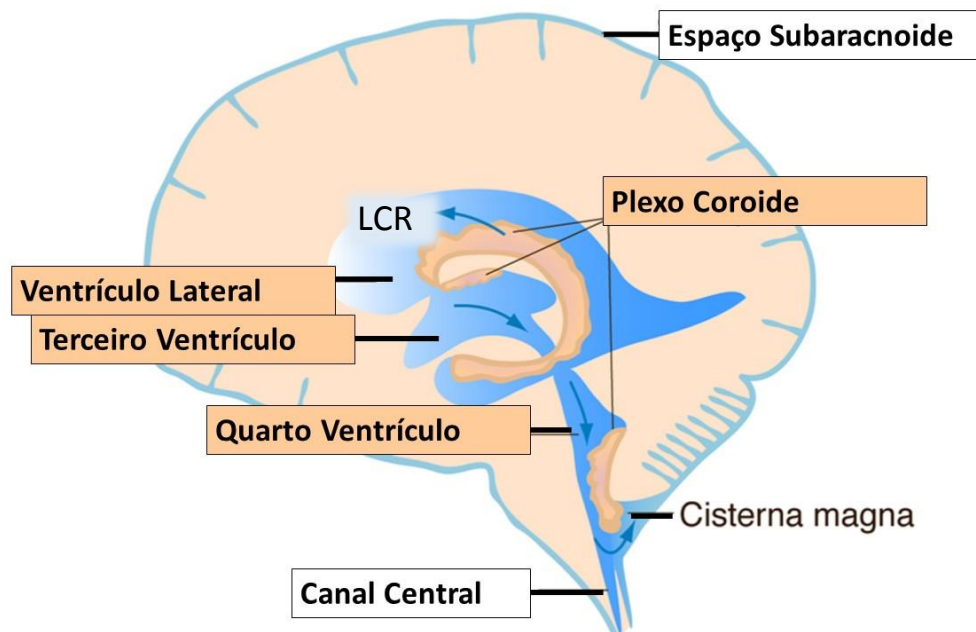


Figura 8- Secreção e circulação do LCR. O LCR é secretado pelo plexo coróide, tecido localizado em cada ventrículo do cérebro. O LCR parte dos ventrículos laterais para o terceiro e quarto ventrículo, depois para o espaço subaracnoide e espinal medula. É reabsorvido no final para a circulação periférica. Adaptado de (Lehtinen et al., 2013).

O LCR é rico em proteínas, lípidos, hormonas, colesterol, glucose, micro RNA's e outras moléculas e metabolitos essenciais às múltiplas funções do SNC. Por outro lado, o LCR detém um pertinente interesse clínico, uma vez que nele se podem encontrar presentes biomarcadores para distintas patologias do SNC (Lehtinen et al., 2013).

3.3. O Plexo Coróide, envelhecimento e doenças neurodegenerativas

Ao longo do envelhecimento e em situações de neurodegeneração o PC também sofre determinadas alterações morfológicas. Estas mudanças no epitélio podem refletir-se numa diminuição da produção de LCR e síntese de proteínas, nomeadamente o decréscimo na secreção de fatores de crescimento, importantes para estimular a neurogénese (Lehtinen et al., 2013).

No caso particular da DA, o plexo sofre modificações muito semelhantes às observadas com o decorrer da idade. A atrofia do epitélio está significativamente acentuada, havendo também perda de massa celular quando comparada com plexos mais jovens e sem patologia. Todas as modificações sofridas na morfologia do plexo vão por consequência afetar o seu normal funcionamento. Por outro lado, já foram encontradas placas amiloides em autópsias a indivíduos com Alzheimer, o que sugere que a deposição destas placas possa também causar a disfunção do plexo. Das proteínas secretadas pelo plexo há algumas em particular que diminuem na DA, como é o caso da Transtirretina, Gelsolina e Apolipoproteína J, sendo estas estão envolvidas na *clearance* do péptido beta amilóide (péptido A β) via recetor da megalina. Portanto, é possível que a deposição do A β no plexo possa corromper o transporte e síntese proteica via megalina (Krzyzanowska & Carro, 2012).

A deposição de placas amiloides no cérebro aparenta ser a principal causa de demência na patologia de Alzheimer, aumentando o interesse na *clearance* do péptido A β . Além do péptido A β é hoje em dia conhecida a presença de outras proteínas na composição das placas amiloides, proteínas associadas amiloides (APP's) (Mulder et al., 2014).

Tem-se tornado cada vez mais evidente que os níveis de A β no cérebro são mantidos de acordo com um equilíbrio entre a sua produção e eliminação, quer por via enzimática, proteases, quer por via não enzimática, através de proteínas transportadoras. O número de enzimas conhecidas como proteolíticas do péptido amilóide (ADE's) tem vindo a aumentar e já são mais de 20, quer membranares quer solúveis. A enzima que degrada a insulina (IDE) é uma destas enzimas e desempenha um papel fundamental na eliminação do péptido A β do cérebro (Nalivaeva et al., 2014).

A IDE é uma peptidase de zinco que foi inicialmente identificada como uma enzima implicada no metabolismo da insulina e com potencial considerável na diabetes, sendo um dos muitos vínculos entre a DA e a diabetes. Esta proteína é a principal protease da APP citosólica. Outro substrato importante desta enzima é a somatostatina, um neuropéptido que decresce com a idade e na DA, que ao ligar-se á IDE consegue modular a sua afinidade para o péptido amilóide, através de uma ligação alostérica (Nalivaeva et al., 2014).

Outra enzima importante na *clearance* do A β é a enzima conversora da angiotensina (ACE), maioritariamente por agir como carboxidipeptidase e por converter a forma mais hidrofóbica e tóxica, a A β 42 em A β 40. Deste modo, pode concluir-se que esta enzima pode ser muito importante para prevenir a acumulação da espécie mais tóxica do péptido no cérebro (Nalivaeva et al., 2014).

Por outro lado, as proteínas de ligação e transporte do péptido amilóide interagem de modo a modular a sua solubilidade, transporte, *clearance*, degradação e formação de fibrilhas (Calero et al., 2012).

Em 1999, o grupo de investigação do cientista Chauhan's identificou uma proteína secretora, a gelsolina (GLS), que se pode ligar à forma solúvel do péptido amilóide de um modo dependente da concentração. Sendo assim, quanto maior é a quantidade de GLS mais A β se irá ligar até se atingir a saturação. Esta ligação é altamente específica para as formas monoméricas, semelhante com a ligação antigénio-anticorpo, não ocorrendo no caso das formas fibrilares nem oligómeros (Yu et al., 2015)

Outra proteína de ligação ao péptido amilóide no cérebro é a transtirretina (TTR) que facilita a sua *clearance* e previne a toxicidade induzida pelo A β . Esta proteína também apresenta uma maior afinidade para a forma A β -42 quando comparada com a afinidade para a forma A β -40 (Kerridge et al., 2014).

Outro grupo de proteínas, chamadas as apolipoproteínas, do qual faz parte a Apolipoproteína J (ApoJ), podem ser encontrados nas formas fibrilares e placas de A β . Estas estão relacionadas com uma forma mais precoce da doença, mesmo antes de haver alterações na proteína Tau. As apolipoproteínas possuem efeitos benéficos, tal como as outras APP's, que passam pela redução da associação de oligómeros de A β . A ApoJ complexada com o péptido amilóide tem a capacidade de se ligar ao recetor de megalina e consequentemente conduz à internalização e degradação do A β (Mulder et al., 2014).

As metalotioneínas (MTs) são proteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa), ricas em cisteína e com elevado conteúdo em metais, podendo ser divididas em 4 famílias (MT1-MT4). As MT1 e MT2 estão presentes amplamente em todo o organismo, por outro lado, as MT3 e MT4 encontram-se mais centralizadas no SNC. Pensa-se que estas proteínas conferem uma vantagem de sobrevivência em situações de *stress* biológico e danos celulares. De um ponto de vista fisiológico é de salientar que condições de oxidação e inflamatórias conduzem a um aumento da síntese das MT1 e MT2, podendo estes níveis serem relacionados com a proteção em doenças neurodegenerativas como a DA. Particularmente pensa-se que o efeito da MT2 no caso da DA esteja relacionado com a redução nas alterações da homeostasia iónica provocadas pelo A β (Manso et al., 2012).

II. Objetivo

Ao longo dos anos muitos foram os estudos que confirmam a síntese extra pineal de melatonina, nomeadamente em várias áreas do cérebro tais como, o cerebelo hipocampo e bolbo olfativo (Acuña-Castroviejo et al., 2014). No entanto, nada há ainda descrito no PC.

A DA caracteriza-se pela deposição de placas de péptido amilóide em várias regiões cerebrais, controlada por proteínas *scavenger* que auxiliam na sua *clearance*, também elas expressas no PC (Nalivaeva et al., 2014).

Como tal traçaram-se os seguintes objetivos para este trabalho:

- Detetar a presença das enzimas da via de síntese de melatonina em PC de rato;
- Detetar a presença de melatonina em meio de culturas primárias de plexo coróide (CPEC);
- Estudar a oscilação circadiana da enzima ANAT em plexo coróide de ratos macho e fêmea e em CPEC;
- Analisar a influência da disrupção circadiana na expressão do gene da enzima ANAT, em PC de ratos macho e fêmea;
- Avaliar o efeito da incubação de explantes de plexo Coróide de rato com melatonina na expressão dos genes das proteínas *scavenger* do péptido AB.

III. Materiais e Métodos

1. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram *Rattus Norvegicus*, da estirpe *Wistar Han*, adultos (3 a 6 meses) e recém-nascidos (3 a 5 dias).

Todos animais foram criados e mantidos no biotério do CICS, Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade da Beira Interior. Foram colocados em gaiolas apropriadas a temperatura de 22°C, num ciclo de 12h luz e 12h escuro, com fornecimento de comida e água *ad libitum*.

A manipulação dos animais obedeceu às diretrizes da União Europeia para o cuidado e manuseamento de animais de laboratório (Diretiva 2010/63/UE).

1.1. Recém-Nascidos

1.1.1 Cultura primária de células epiteliais de plexo coróide

Com o objetivo de se obterem as CPEC utilizaram-se ratos recém-nascidos, com 3 a 5 dias, de onde se recolheram os PC.

Os PCs foram mantidos em tampão fosfato salino (PBS) até serem sujeitos a digestão com a enzima pronase (0.2%; Fluka, Seelze, Germany) a uma temperatura de 37°C durante 5 minutos.

Após este processo os PCs foram centrifugados a 410G durante 2 minutos, rejeitou-se o sobrenadante e o pellet obtido foi ressuscitado em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM Life Technologies, Inc., Paisley, UK) completo, que contem 10% de soro fetal bovino (FBS, Biochrom AG, Berlin) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma, Saint Louis, USA).

Posteriormente, as células dissociadas mecanicamente foram então lavadas e ressuscitadas em meio DMEM suplementado com fator de crescimento epidérmico (Sigma), insulina (Sigma) e citosina arabinosina C (Sigma).

Por fim, semearam-se as células em placas de 12 poços com 1,5mL de DMEM suplementado em cada poço e foram colocadas numa incubadora a 37°C e numa atmosfera de 5% de CO₂.

O meio de cultura foi substituído no dia seguinte e mantiveram-se as células em crescimento por um período de 4-5 dias, para posterior utilização. Após os 4-5 dias, o meio de cultura foi recolhido e guardado a -20°C para posteriormente ser analisado por HPLC.

1.1.2 Explantes e estímulo com melatonina

Com o objetivo de se analisar o efeito da melatonina na expressão dos genes *scavenger* do péptido A β incubaram-se explantes de PC com esta hormona.

Para a obtenção de explantes de PC utilizaram-se ratos recém-nascidos, com 3-5 dias.

Os PCs foram colocados em placas de 48 poços contendo 500 μ L de DMEM simples e por cada poço foram colocados os plexos correspondentes a dois animais.

A melatonina, previamente dissolvida em etanol 99,9%, foi adicionada aos explantes em três concentrações diferentes (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M) e os explantes permaneceram em contacto com a hormona durante 24 horas. Realizou-se ainda um controlo ao qual se apenas adicionou o veículo (etanol a 0,02%).

Após as 24 horas os PCs foram recolhidos e guardados a -80°C , bem como o meio de cultura que foi guardado a -20°C .

1.2. Animais Adultos

1.2.1 Experiência do ritmo circadiano

Nesta experiência foram utilizados 64 animais, machos e fêmeas, com 2 meses \pm 2 semanas, que foram mantidos em condições normais de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em que a luz acendia às 7h e desligava às 19h.

Os animais foram divididos em quatro grupos com 8 fêmeas e 8 machos cada grupo e foram sacrificados de 6 em 6 horas, a diferentes ZTs: ZT1, ZT7, ZT13 e ZT19, sendo que estes tempos correspondem às 08:00, 14:00, 20:00 e 02:00 horas, respetivamente.

No sacrifício dos animais às 20:00 e 02:00 foram tidos os cuidados necessários para que em momento algum os animais se encontrassem expostos à luz, utilizando como fonte de iluminação a luz infravermelha.

O sacrifício dos animais foi executado de forma alternada entre machos e fêmeas, de forma a normalizar os resultados. Posteriormente o cérebro foi retirado, os PCs dos ventrículos laterais recolhidos e congelados em nitrogénio líquido, sendo depois armazenados a -80°C para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

1.2.2 Experiência da interrupção do ritmo circadiano

Nesta experiência foram utilizados 32 animais com ± 2 meses de idade, que foram distribuídos em dois grupos.

A diferença de condições entre estes dois grupos baseou-se na sua exposição à luz, uma vez que, um dos grupos foi sujeito a ciclos de escuridão constante e o outro a ciclos de luz constante. Estes dois grupos eram constituídos por 8 machos e 8 fêmeas.

Após 3 dias de exposição à luz ou escuridão constantes, os animais foram sacrificados com CO₂ gasoso e posteriormente decapitados com recurso a uma guilhotina. A eutanásia, no caso dos animais sujeitos a escuridão constante foi executada na total ausência de luz, para garantir a total fiabilidade dos resultados.

O sacrifício dos animais foi executado de forma alternada entre machos e fêmeas, de forma a normalizar os resultados. Posteriormente o cérebro foi retirado, os PCs dos ventrículos laterais recolhidos e congelados em nitrogénio líquido, sendo depois armazenados a -80°C.

2. HPLC- High Pressure Liquid Chromatography

HPLC é uma técnica cromatográfica que se distingue por usar a fase móvel a alta pressão. A utilização de elevada pressão permite reduzir o tamanho das partículas da coluna e por consequente o tamanho da coluna, utilizando um menor volume de amostra e um menor gasto de fase móvel. É ainda uma técnica cromatográfica bastante sensível, que permite detetar a presença de analitos mesmo em baixas concentrações.

2.1. Soluções e Reagentes

Todos os reagentes utilizados na preparação da fase móvel e/ou amostra foram de grau analítico, à exceção do metanol que foi de grau HPLC, uma vez que, foi utilizado para o acondicionamento da coluna e do equipamento.

Além do metanol foram utilizados o clorofórmio, diclorometano e acetonitrilo (Fisher Chemicals, Loughborough Reino Unido).

2.2. Padrão Interno

Para a identificação de qualquer molécula biológica é muito útil a utilização de um composto cuja concentração se conhece, padrão interno, adicionado à amostra posteriormente à extração.

Para uma melhor eficiência o padrão interno deve apresentar uma estrutura semelhante à molécula em análise e propriedades químicas similares. Por outro lado, não deve estar presente naturalmente nas amostras a analisar e não deve apresentar sinal no limite de deteção do analito.

Neste caso, foi utilizada a 3,4-dihidroxibenzilamina, que é a mais utilizada no caso das aminas biogénicas.

2.3. Soluções Padrão

As soluções padrão de melatonina e serotonina foram preparadas ambas em metanol. De início preparou-se uma solução mãe de cada uma com uma concentração final de 5 mg/mL. No final, a concentração obtida no meio foi de 100 ng/mL. Estas soluções foram adicionadas ao meio antes de se proceder à extração para também se testar a eficácia do método de extração.

2.4. Fase Móvel

A fase móvel tem como função dissolver a amostra, sem que as duas formem qualquer interação. Deve apresentar um elevado grau de pureza ou ser facilmente purificada. Tem que ser compatível com o detetor utilizado e possuir uma polaridade conveniente de modo a separar de modo eficiente todos os componentes da amostra.

A fase móvel utilizada neste trabalho consistia em 75mM de KH_2PO_4 , 25 μM de EDTA, 1,7mM de OSA e 15% de acetonitrilo (v/v), sendo o pH ajustado com ácido ortofosfórico até 3.5. A temperatura da coluna foi de 23°C. A fase móvel foi preparada com água *MilliQ*, com um volume final de 500mL ou 1L, sendo no final filtrada usando um filtro de nylon com 0.2 μm de poro e sonicada por um período de 15 minutos antes da utilização.

O tempo de cada corrida foi de 20 minutos a um fluxo isocrático de 1 ml/min. Os potenciais da célula analítica foram de + 300mV no canal 1, canal de oxidação, e -150mV no canal 2, canal de redução.

2.5. Equipamentos

2.5.1 HPLC

O Sistema de cromatografia foi o 1260 da *Agilent*, com um sistema de injeção automático e sistema quaternário de bombas.

2.5.2 Coluna

A separação dos componentes foi realizada com recurso a uma coluna C₁₈, de fase reversa, *Zorbax 300SB* (*Agilent*; 5µm, 250x4.6mm). Neste tipo de coluna os componentes da amostra são separados com base na sua polaridade. A fase reversa é a mais adequada para a análise de analitos hidrofóbicos. O recheio destas colunas é composto por sílica acoplada a grupos hidrofóbicos, neste caso é o octadecil que é uma cadeia linear de 18 carbonos.

2.5.3 Detetor

O detetor é utilizado para observar a separação obtida. No caso de não haver analito presente na amostra a composição do solvente é constante, no entanto é alterada na presença deste. Então, o detetor tem a capacidade de monitorizar estas diferenças por sinais eletrónicos.

Os detetores eletroquímicos são os mais sensíveis na deteção de monoaminas. Estes detetores dependem de uma reação eletroquímica gerada por um potencial constante aplicado por uma célula eletroquímica na fase móvel. Se o potencial for alto o suficiente vai haver oxidação ou redução nos elementos da fase móvel, que gerará um sinal que será medido em função do tempo, originando um cromatograma de corrente vs tempo.

Os compostos devem ser de natureza eletroativa para serem suscetíveis a este tipo de deteção. O potencial aplicado é característico de cada composto, e é dependente de vários fatores como a natureza da superfície da célula, composição da fase móvel e o pH.

O detetor utilizado foi o *Coulochem III* (*ESA*) com uma célula contendo um elétrodo de elevada sensibilidade.

2.6. Amostras

As amostras utilizadas foram meio de cultura de CPEC. O meio foi recolhido após 6 dias em cultura e armazenado em tubos de 50mL a -80°C.

2.7. Extração da Melatonina

O processo de extração é uma operação de separação ou purificação de um componente que se pretende isolar do resto da amostra.

A extração líquido-líquido é um método para separar um componente específico de uma mistura de líquidos, baseado nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra em dois líquidos imiscíveis, neste caso a amostra e o solvente orgânico.

O solvente foi colocado num tubo com a amostra e foi submetido a agitação durante aproximadamente 1 hora. Após este tempo, os tubos foram centrifugados e recolheu-se a fase transparente onde estava contido o analito de interesse, e a fase rosa foi dispensada. O solvente evaporou numa atmosfera de azoto e o resíduo depositado foi dissolvido em 100 μ L de fase móvel.

3. Extração de RNA total e síntese de DNA complementar

3.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total utilizou-se o reagente Trizol, que se define como uma solução monofásica composta por fenol e guanidina isotiocianato, que possibilita a disrupção celular e dissolução de vários componentes celulares, sem nunca alterar a integridade do RNA.

Após a adição deste reagente as amostras são sujeitas a disrupção mecânica com recurso a um pilão, e permanecem 5 minutos à temperatura ambiente, de modo que todos os complexos nucleoproteínas se dissociam por completo.

Posteriormente adicionou-se o clorofórmio (200µL de Clorofórmio por 1mL de Trizol), a cada uma das amostras e misturou-se por inversão. Durante 10 minutos as amostras permaneceram à temperatura ambiente, e foram posteriormente centrifugadas a 4°C durante 15 minutos, a uma velocidade de 12000G.

Depois deste processo obtiveram-se 3 fases: a do fundo com coloração rosa é considerada a fase orgânica onde se encontram proteínas e resíduos de clorofórmio, a interfase de cor branca onde se encontra o DNA e em cima a fase de interesse (transparente) onde se encontra o RNA.

Desta forma, a fase de interesse foi recuperada para um novo tubo, ao qual se adicionou isopropanol (500µL de Isopropanol por cada mL de Trizol), misturou-se novamente por inversão, obtendo-se o RNA precipitado.

Após um período de 10 minutos de incubação à temperatura ambiente e posterior centrifugação a 4°C, durante 10 minutos a 12000G, o sobrenadante é rejeitado e o *pellet* que contém o RNA precipitado, é lavado com 500µL de etanol dissolvido em 25% de água dietilpirocarbonato (DEPC), e centrifugado à mesma temperatura durante 5 minutos a 7500G. Para finalizar, retirou-se o excesso de etanol e o *pellet* de RNA foi reidratado e dissolvido em 10µL de água DEPC e guardado a -80°C.

Durante todo este processo deve ter-se o máximo de cuidado uma vez que o RNA é muito suscetível à degradação através da ação de ribonucleases que se encontram presentes em materiais biológicos e são extremamente persistentes a diferentes tratamentos.

Por outro lado, o RNA é uma molécula bastante instável, mais uma razão para se redobram os cuidados durante todo o processo de extração.

É portanto obrigatória a utilização de água DEPC livre de ribonucleases, materiais autoclavados e luvas de modo a minimizar qualquer tipo de contaminação. É ainda importante referir que a realização de todo o processo deve ser efetuado em gelo de modo a proteger o RNA da degradação pela temperatura.

3.2. Determinação da integridade do RNA

De forma a garantir a viabilidade do RNA para posterior utilização é importante determinar o seu estado de integridade.

As amostras de RNA foram analisadas com recurso à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *Greensafe premium* (NzyTech, Portugal) que atua como intercalante com os ácidos nucleicos.

As amostras para deposição no gel são preparadas com 2µL de RNA, 8µL de água DEPC e 1µL de *Loading Buffer 10x*, sendo posteriormente depositadas no gel.

O gel correu a uma intensidade de corrente de 100V durante 30 minutos e no final da corrida é visualizado no transiluminador.

A integridade e viabilidade do RNA é avaliada pela presença de duas bandas no gel, a 18S e a 28S, sendo que a segunda deve apresentar o dobro da intensidade da primeira.

Em situações de degradação, esta proporção de intensidade não se verifica, e pode observar-se arrastamento.

3.3. Quantificação do RNA total

Para quantificar o conteúdo de RNA das amostras recorre-se à técnica de espectrofotometria, utilizando o nanoespectrofotómetro *Nanophotometer™* (Implen, Germany).

Este equipamento permite-nos avaliar de um modo direto o conteúdo da amostra de RNA numa concentração de µg/µL e o rácio A260/A280, que permite avaliar o estado de pureza do RNA.

O RNA é considerado puro quando a razão entre as absorvâncias se encontra no intervalo entre 1,8 e 2,1.

Um valor inferior a 1,8 é um indicativo de contaminação por proteínas ou por fenol, por outro lado valores superiores a 2,1 são indicativos de contaminação com DNA.

3.4. Síntese de DNA complementar

A síntese de cDNA é um passo essencial para a posterior realização de RT-PCR e PCR em Tempo Real. Este processo ocorre pela ação da enzima transcriptase reversa, que produz uma cópia exata e sem intrões de DNA a partir de RNA mensageiro.

A transcrição Reversa foi realizada utilizando o *kit NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NzyTech, Portugal) conforme as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para cada reação adicionou-se RNA na concentração de 500ng/µL, 10µL de *NZYRT 2x Master Mix*, 2µL de *NZYRT Enzyme Mix* e H₂O DEPC até se perfazer um volume final de 20µL.

Os tubos são colocados no termociclador a: 25°C durante 10 minutos, 50°C durante 30 minutos, 85°C durante 5 minutos. De seguida são retirados e colocados em gelo aos quais se adiciona 1µL de *NZY RNase H* e incubou-se a 37°C durante 20 minutos.

Os tubos, contendo o cDNA, são retirados do termociclador e são guardados a -20°C até serem utilizados.

4. RT-PCR

O RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) é uma técnica de biologia molecular que possibilita a replicação *in vitro* de DNA de forma extremamente rápida, que foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80 (Saiki et al., 1988). Este método baseia-se na capacidade da DNA polimerase conseguir sintetizar uma nova cadeia de DNA através de uma outra previamente disponível. A técnica de PCR possibilitou a confirmação da presença dos genes das enzimas intervenientes no processo de síntese de melatonina, em PC de rato. Para a seleção dos *primers* mais apropriados para cada gene, recorreu-se ao programa *Primer-Blast-NCBI-NHI*. Na tabela 2 encontram-se as sequências de primers para cada gene, bem como a temperatura de *Melting* correspondente.

Tabela 2- Lista de primers utilizados para RT-PCR.

Gene	Primer Fw	Primer Rv	T de Melting
Tph1	CCAGGAGAACAAAGACCATTC	ATTCAGCTGTTCTCGGTTGATG	55°C
DDC	GAACAGACTTAACGGGAGCCTTT	CTACTCCCTCTCTGCTCGCAG	58°C
ANAT	TTGCATGATTCTCCTGCCTA	CCCAGAATCCTGTGAGAAATG	56°C
HIOMT	TACGGGGACAGGAAGTTTTG	GTGCCACTTCTGGGTTTCATT	54°C

Nesta técnica, de forma a amplificar as sequências pretendidas foi utilizada a enzima *NzyTaq DNA polimerase* (NzyTech Portugal) seguindo as instruções do fabricante. Para cada reação utilizou-se 5µL de *10x Buffer*, 1,5µL de MgCl₂ a 50 mM, 1µL de dNTP's a 10mM, 0, µL de *Primer Fw* e 0,3µL de *Primer Rv* a uma concentração 25µmol, e 0,2µL de *NzyTaq*. No final, perpez-se o volume até 23,5µL com água destilada e a cada reação adicionou-se 1,5µL de cDNA, à exceção do negativo, ao qual se adicionou água estéril.

Todo o processo de RT-PCR ocorreu num termociclador *TProfessional Basic Gradient* (Biometra) nas seguintes condições: 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, temperatura ótima de emparelhamento de cada *primer* durante 45 segundos e por fim as amostras foram expostas a 72°C durante 5 minutos.

Para a visualização dos produtos de PCR procedeu-se a preparação de um gel de agarose a 1,5% com *Greensafe premium*, que permitiu a identificação das bandas. Utilizou-se ainda no gel um marcador de peso molecular, *Hiperladder II* (Bioline) que permitiu identificar por comparação o peso da banda do produto de PCR. O gel foi observado no transiluminador onde se confirmou o peso de cada banda, os produtos foram então sequenciados e confirmada a sua identidade.

5. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real é uma combinação da metodologia de RT-PCR com um mecanismo de deteção por fluorescência em tempo real. A quantificação do mRNA da enzima ANAT, foi realizada usando o *kit Maxima SYBR®Green* (Thermo Scientific).

Para a otimização da técnica foram realizados testes de eficiência, com quatro concentrações distintas de cDNA, 1:1 1:2, 1:4, 1:8. Como controlo endógeno foi utilizado o gene da ciclofilina A, para obter uma normalização nos níveis de expressão do gene em estudo. Todas as amostras foram realizadas em duplicado, no termociclador *iCycler Iq™* (Bio-Rad).

As reações de amplificação para cada gene em estudo e para o gene endógeno, foram preparadas para um volume final de 20µL: 10µL de *Syber green*, 0,8µL de *primer Fw* e 0,8µL de *primer Rv* diluídos de 1:20, 1,5µL de cDNA e fez-se o volume até 20µL com água estéril. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos.

As formações de dímeros de *primers* e a especificidade do produto amplificado foram avaliadas através da análise da curva de *melting*. Os níveis relativos de expressão da enzima ANAT nos diferentes grupos foram calculados pelo método $\Delta\Delta Ct$.

6. Análise Estatística

A análise estatística neste trabalho prático foi realizada com recurso ao programa *GraphPad Prism 5* (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA), tendo sido avaliada pelos testes estatísticos *ANOVA*, seguido do teste de *Bonferroni*. Considerou-se um resultado estatístico significativo quando $p < 0.05$.

IV. Resultados

1. Confirmação da presença das enzimas envolvidas na síntese de melatonina no plexo coróide

Para se confirmar a presença das enzimas da via de síntese da melatonina utilizou-se a técnica RT-PCR, que permitiu a amplificação das sequências dos genes em estudo. Os fragmentos amplificados foram observados por eletroforese em gel de agarose na presença de *Green Safe* e confirmou-se que correspondiam ao pretendido por comparação com o marcador de peso molecular, *HipperLadder II*. Na figura 9 ilustra-se, da esquerda para a direita, o marcador M, controlo negativo CN e o fragmento de cada gene de interesse.

Os produtos de PCR foram sequenciados e os resultados foram analisados no programa *NCBI-BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmando-se, por comparação com a base de dados, a identidade das sequências de mRNA correspondentes aos genes em análise. Após alinhamento das sequências amplificadas com as sequências da base de dados de *Wistar Han*, obteve-se uma homologia superior a 95% para todas as sequências nucleotídicas. Deste modo, confirmou-se a presença de mRNA dos genes da via de síntese da melatonina em PC de rato.

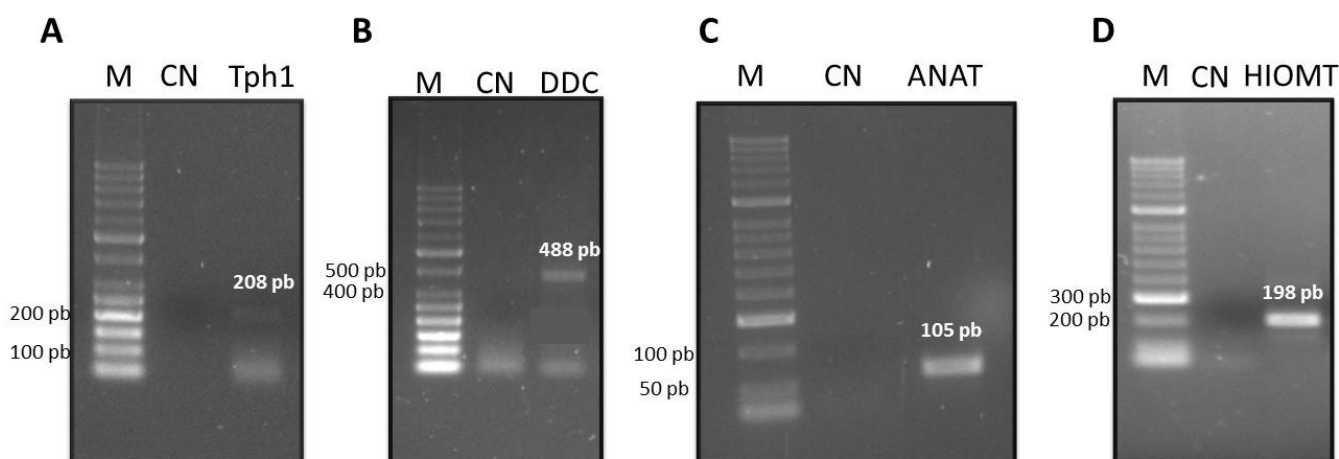


Figura 9- Eletroforese em gel de agarose 1,5% ilustrando a expressão de mRNA dos genes das enzimas da via de síntese da melatonina em plexo coróide de rato. Na figura está representado (da esquerda para a direita) o marcador (M), o controlo negativo (CN) e os fragmentos do gene em causa Tph1 (A) com 208 pb, DDC (B) com 488 pb, ANAT (C) com 105 pb e HIOMT (D) com 198 pb.

2. Presença de serotonina e melatonina em meio de cultura das CPEC

Após a confirmação da presença das enzimas da via de síntese de melatonina verificou-se a sua produção pelo plexo Coróide. Usando uma técnica cromatográfica, foi analisada a presença de serotonina e melatonina em meio de cultura de CPEC. Para se garantir que o meio não continha nenhum dos analitos foi realizado um ensaio em branco, que consistiu em analisar meio de cultura que não esteve em presença de células. Este meio foi submetido a todos os passos da experiência, incluindo o processo de extração e secagem com azoto liquido. Após a análise do ensaio em branco foi possível concluir que o meio não continha serotonina nem melatonina como se pode observar na figura 10. Pela análise dos padrões, soluções de serotonina e melatonina com concentrações conhecidas, foi possível determinar o tempo exato a que cada analito aparecia no cromatograma, ou seja, o seu tempo de retenção na coluna que para a serotonina foi de aproximadamente 8,7 minutos e para a melatonina 15,3 minutos. Neste caso específico os analitos foram separados consoante a sua polaridade, ou seja, quanto mais apolares os compostos mais tempo permanecem na coluna e demoram a chegar ao detetor. As soluções padrão foram injetadas antes de iniciar cada ensaio, para se ter uma maior precisão de que o sinal observado correspondia ao analito pretendido. Como se pode observar na figura 11, a presença de serotonina foi confirmada em meio de CPEC pela técnica de HPLC, com recurso ao detetor eletroquímico.

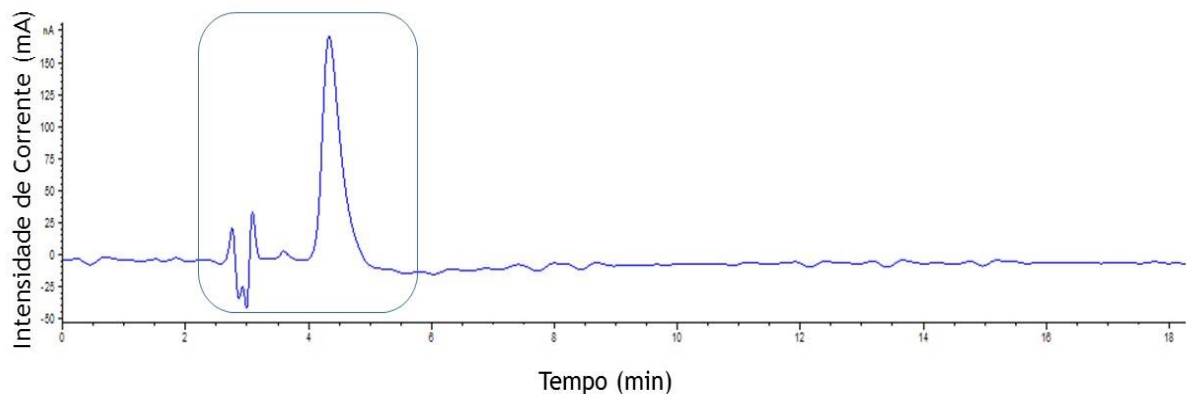


Figura 10- Cromatograma ilustrativo do ensaio em branco. O pico correspondente á fase móvel está assinalado na figura.

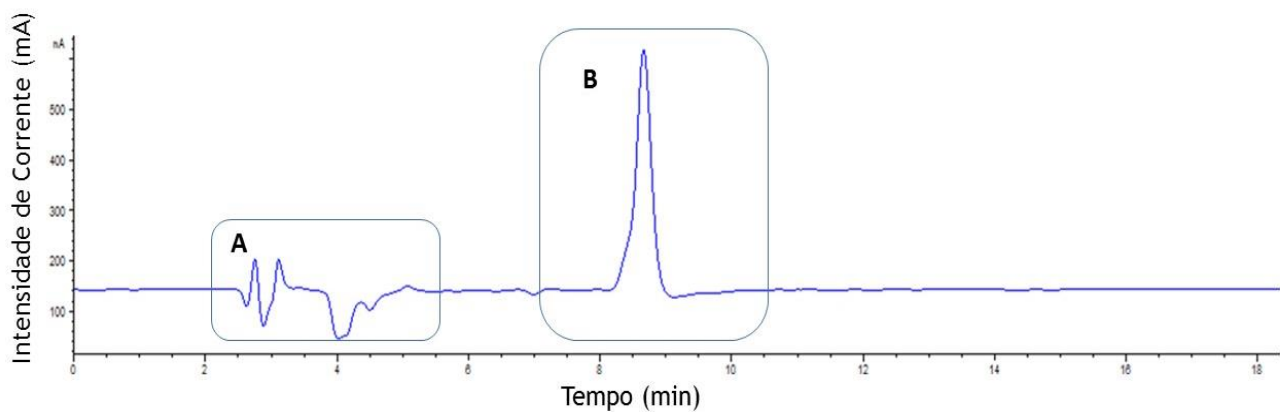


Figura 11- Cromatograma que ilustra o pico de serotonina detetado no meio de cultura recolhido das CPEC. Pode ser observado na figura o pico da fase móvel (A) e o pico de serotonina (B).

A melatonina sendo uma molécula muito mais hidrofóbica que a serotonina apresenta um tempo de retenção bem maior como se pode observar na figura 12, onde apresenta um tempo de retenção de aproximadamente 15,3 minutos.

Foi seguido o mesmo procedimento, e a presença de melatonina foi também confirmada por HPLC, com recurso a um detetor eletroquímico. Ainda que, o pico apresente menos intensidade pode garantir-se por comparação com o tempo de retenção da solução padrão que se trata da melatonina.

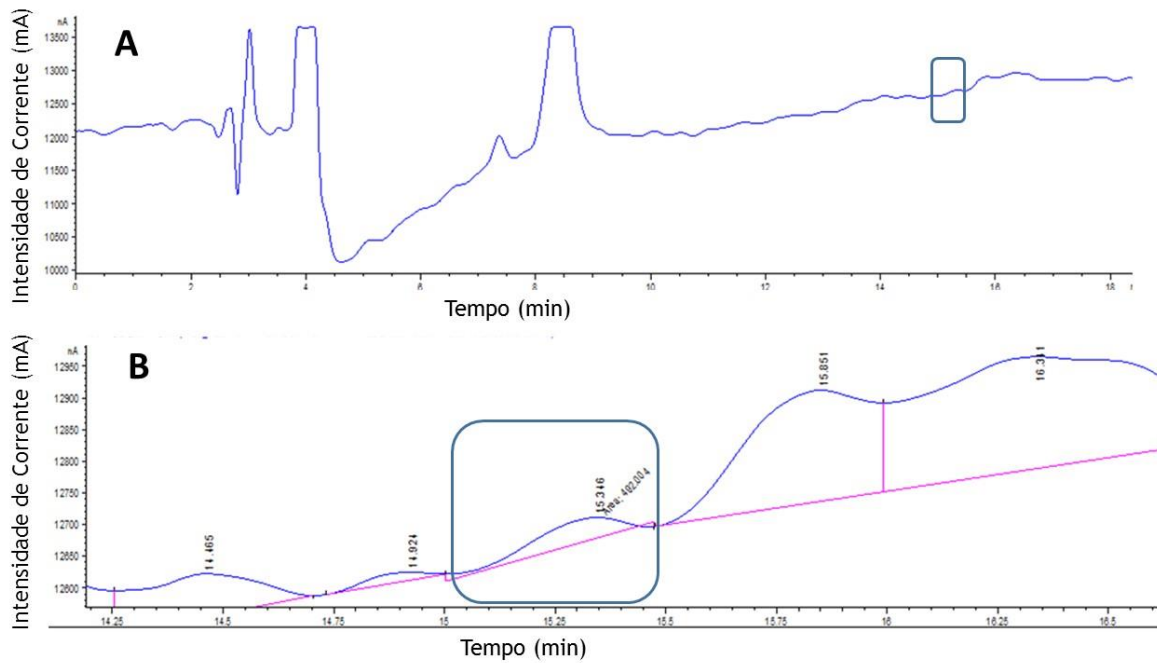


Figura 12- Cromatogramas ilustrativos da presença de melatonina em meio recolhido das CPEC. (A) visão geral do cromatograma, onde se encontra assinalado o pico de melatonina. (B) Visão mais aproximada do pico de melatonina. A área do pico de melatonina é significativa, uma vez que a quantidade de proteína é ilustrada pela largura do pico e não pela sua altura.

3. Regulação da expressão da enzima ANAT em CPEC pelo ritmo circadiano

A enzima ANAT é considerada a enzima chave no processo de síntese de melatonina. Depois de se confirmar a sua presença no plexo coróide procedeu-se à análise da sua expressão ao longo de 24h.

De forma a estudar as possíveis oscilações da enzima ANAT associadas ao ritmo circadiano, recolheram-se CPEC em intervalos de 6 horas, 08:00, 14:00, 20:00 e 02:00, avaliando posteriormente a expressão da ANAT por PCR em tempo real.

Pela observação da figura 13 verifica-se que há um aumento significativo da enzima ANAT às 20:00 e 02:00 quando comparado com as 14:00 ($p < 0.001$). Quando se compara com as 8:00 não se verifica qualquer alteração significativa.

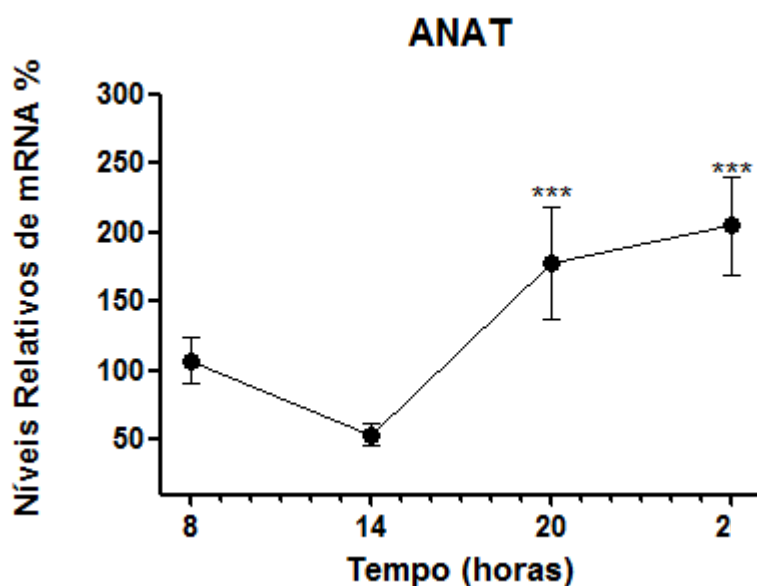


Figura 13- Variação da expressão do mRNA da ANAT em CPEC de rato recolhidas a diferentes horas. Os dados foram analisados através do *software Graphpad* (ANOVA, teste *Bonferroni*). Onde *** representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$; $n=5-8$).

4. Regulação da expressão da enzima ANAT em plexo coróide de rato pelo ritmo circadiano

Com o objetivo de analisar a regulação da expressão da enzima ANAT pelo ritmo circadiano, avaliou-se a expressão do seu mRNA em PC de ratos fêmea e macho recolhidos a diferentes ZTs: ZT1 (8:00), ZT7 (14:00), ZT13 (20:00) e ZT19 (02:00), pela técnica de PCR em tempo real. Para a normalização dos valores utilizou-se o gene da Ciclofilina.

Os níveis de ANAT variam ao longo do dia nas fêmeas, atingindo o pico de expressão na ausência de luz, mais concretamente uma hora após as luzes apagarem (ZT13). Verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre o ZT7 e o ZT13 ($p < 0.05$; Figura 14). Já nos machos os níveis de mRNA da ANAT mantiveram-se constantes nos períodos em análise, não mostrando variações estatisticamente significativas (Figura 14).

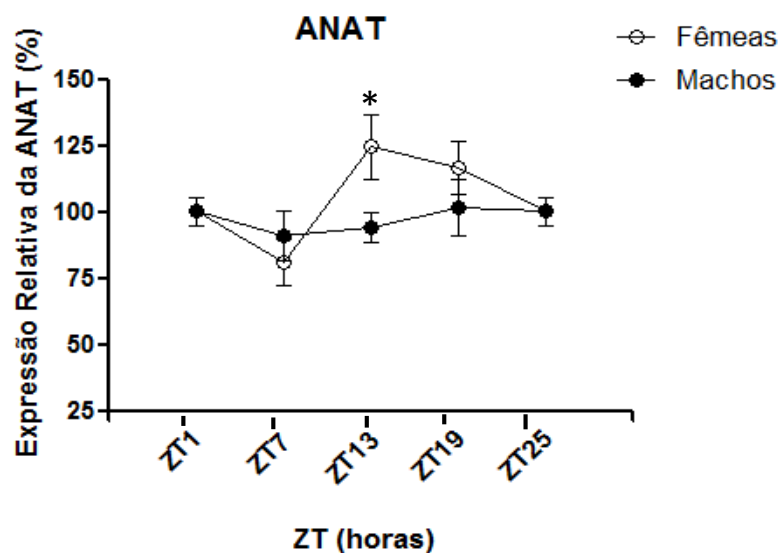


Figura 14-Variação da expressão do mRNA da ANAT em PC de rato macho e fêmea a diferentes horas. Os dados foram analisados através do *software Graphpad* (ANOVA, teste Bonferroni). Onde *representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$; $n=5-8$).

5. Efeito da disrupção do ritmo circadiano na expressão da enzima ANAT no PC de rato

O efeito da disrupção do ritmo circadiano na expressão da enzima ANAT foi analisado em plexos de ratos machos e fêmeas expostos durante 3 dias a ciclos de luz ou escuridão constante. Os resultados foram comparados com um grupo controle, constituído por animais da mesma idade expostos a um fotoperíodo normal, 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Os níveis de expressão da ANAT após a disrupção do ritmo circadiano não sofreram alterações significativas, quer em fêmeas, quer em machos (Figura 15).

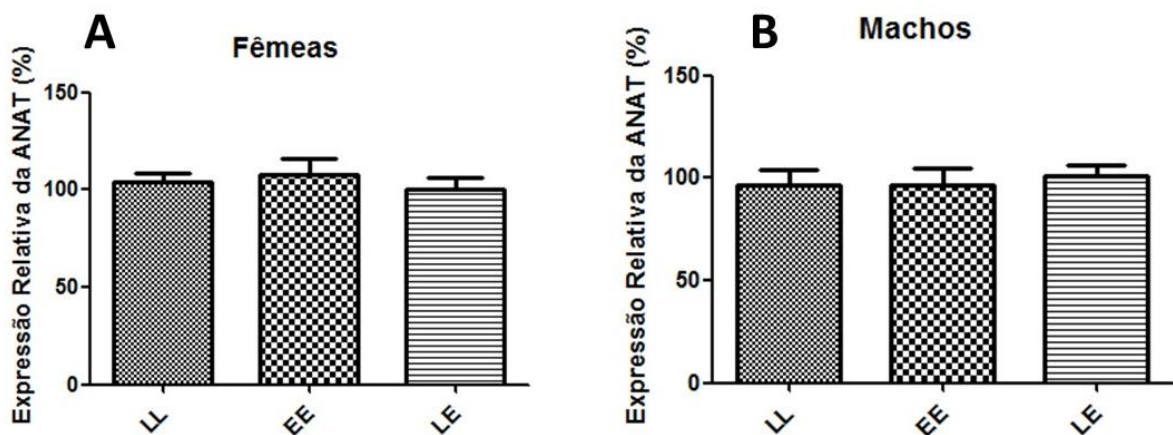


Figura 15- Expressão relativa de mRNA do gene ANAT após disrupção do ritmo circadiano, no plexo coróide de rato. Cada barra representa a média \pm SEM (n=5-8). Nas fêmeas (A) não houve variação significativa na expressão da enzima, bem como nos machos (B); LL- Luz/Luz, EE- Escuro/Escuro e LE- Luz/Escuro.

6. Regulação da expressão dos AB scavengers em explantes de PC pela melatonina

Para estudar os possíveis efeitos da melatonina em processos neurodegenerativos, nomeadamente na DA, foram incubados explantes de PC com diferentes concentrações de melatonina e analisou-se a expressão de moléculas sequestradoras do péptido AB: ACE, IDE, ApoJ, MT2, TTR e GLS.

Na figura 16 podem ser observados os gráficos correspondentes à análise dos resultados de PCR em tempo real da expressão das moléculas sequestradoras de AB.

A expressão do gene ACE, não apresenta diferenças estatisticamente significativas comparando o controlo com as diferentes concentrações de melatonina (Figura 16A). Na Figura 16B está representada a expressão do gene da IDE onde se podem observar diferenças estatisticamente significativas quando se compara o controlo negativo com a concentração mais elevada de melatonina ($10^{-5}M$; $p < 0.01$). Não se observam diferenças significativas utilizando as concentrações de melatonina mais baixas ($10^{-6}M$ e $10^{-8}M$). Na Figura 16C pode observar-se que a expressão da ApoJ não sofre qualquer alteração após estímulos com melatonina. A MT2, representada na Figura 16D, apresenta diferenças estatisticamente significativas quando se compara o controlo negativo com a concentração mais elevada de melatonina ($10^{-5}M$; $p < 0.05$). Na Figura 16E está representada a expressão da TTR, que apresenta diferenças estatisticamente significativas quando se compara o controlo negativo com a concentração mais elevada de melatonina ($10^{-5}M$; $p < 0.01$). Por fim, pode observar-se na Figura 16F que a GLS também apresenta diferença estatisticamente significativa quando se compara o controlo negativo com a concentração ($10^{-5}M$; $p = 0.01$). Neste gráfico pode-se observar ainda diferenças estatisticamente significativas por comparação do controlo e a concentração mais baixa ($10^{-8}M$; $p < 0.05$).

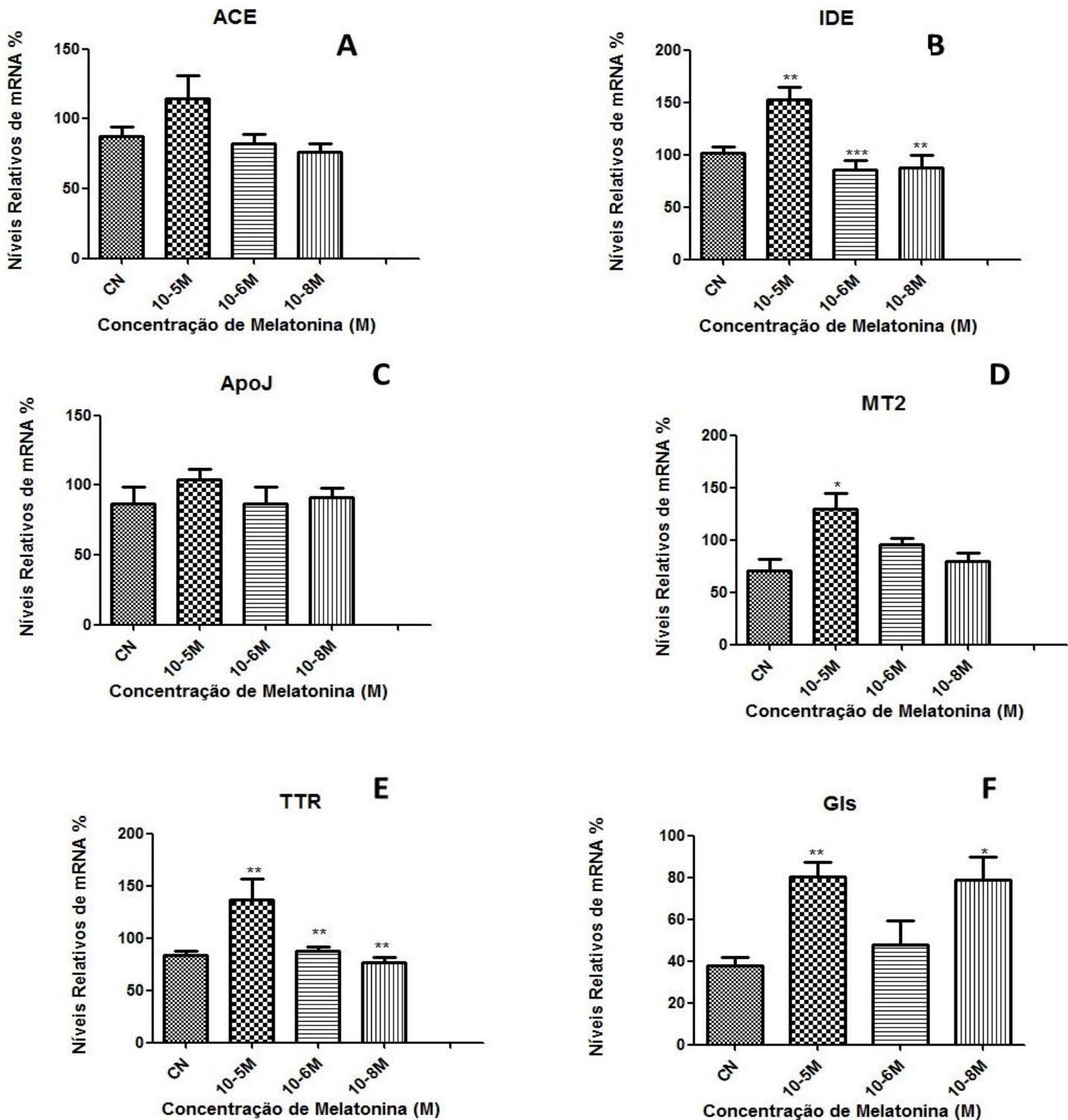


Figura 16- Regulação da expressão dos genes sequestradores do péptido AB. ACE (A), IDE (B), ApoJ (C), MT2 (D), TTR (E) e Glis (F) em explantes de plexo coróide tratados com Melatonina (10^{-5} M; 10^{-6} M e 10^{-8} M), durante 24 horas a 37°C. Em cada gráfico o CN (controlo negativo) representa os explantes incubados com o veículo (etanol a 0.02%). Valores expressos em média \pm SEM (n=5-8).

V. Discussão

A identificação de novos locais de produção de melatonina extra glândula pineal tem vindo a aumentar. No cérebro já são vários os tecidos descritos como produtores desta hormona, nomeadamente, cerebelo, hipocampo e bulbo olfativo (Acuña-Castroviejo et al., 2014). A principal função da melatonina é funcionar como reguladora do ritmo circadiano (Tsang et al., 2014).

Recentemente, genes associados ao ritmo circadiano foram identificados no PC de rato pelo nosso grupo de investigação e foi demonstrada a sua ritmicidade (Quintela et al., 2014).

Apesar de já ter sido observado a presença dos recetores de melatonina (MT1 e MT2) no PC (Lacoste et al., 2015), ainda não existem evidências relativamente à produção de melatonina neste tecido.

Para averiguar se o plexo produz melatonina, foi inicialmente confirmada a presença das enzimas da sua via de síntese por RT-PCR. Esta técnica já foi utilizada em vários estudos semelhantes: num estudo efetuado em 2001 foi descrita a presença das enzimas ANAT e HIOMT por RT-PCR, em vários tecidos (baço, coração, rim, músculo, entre outros) (Stefulj et al., 2001). Foi ainda observada num outro estudo realizado em culturas celulares de astrócitos, a presença das enzimas ANAT e HIOMT também por RT-PCR (Liu et al., 2007).

Posteriormente a presença de melatonina em meio de cultura de CPEC foi avaliada por HPLC, com o recurso a um detetor eletroquímico, onde se conseguiu identificar a melatonina e a serotonina. Num estudo efetuado no ovário, a presença de melatonina foi detetada por este método, mas usando um detetor de fluorescência (Itoh et al.,). Este método é considerado bastante adequado para detetar e quantificar a melatonina por ser muito sensível e seletivo, sendo a coluna C18 a mais apropriada para a sua separação e o detetor eletroquímico mais sensível que o de fluorescência, como foi demonstrado num estudo efetuado em amostras biológicas (de Almeida et al., 2011).

De forma a avaliar a ritmicidade circadiana do gene da ANAT, o padrão diário deste gene foi analisado por PCR em tempo real em CPEC a diferentes horas (08:00, 14:00, 20:00 e 02:00 horas). A expressão de mRNA da ANAT apresentou oscilações circadianas, ocorrendo o pico máximo de expressão às 02:00 horas e o mínimo às 14:00 horas. Este estudo foi também efetuado em animais machos e fêmeas. Nos machos não se observa qualquer tipo de oscilação, já nas fêmeas os níveis da enzima ANAT variam durante o dia, atingindo um máximo às 20h (ZT13). Estes resultados estão de acordo com o que acontece na glândula pineal, uma vez que os níveis de expressão da ANAT aumentam na ausência de luz e diminuem na sua presença (Klein et al., 2010). Na retina, onde também há síntese de

melatonina, esta produção segue os eventos circadianos (Klein et al., 2010). O facto de só se observar oscilações nas fêmeas pode estar relacionado com as hormonas, uma vez que vários estudos indicam que alterações no ritmo circadiano das mulheres ocorrem devido a elevadas concentrações de estrogénios (Nakamura et al., 2010).

A manutenção do ciclo claro-escuro na sincronização do organismo é de extrema importância, já que alterações na exposição à luz podem conduzir a alterações no ritmo circadiano interno. Estudos com modelos animais sujeitos a alterações no seu fotoperíodo normal, demonstraram alterações no comportamento, bem como défice de memória e aprendizagem, devido a uma diminuição na neurogénese do hipocampo (Karatsoreos, 2014). Em humanos, a exposição à luz pode alterar a secreção hormonal, como resposta à presença ou ausência de luz na retina. Como já referido, a luz é o sincronizador circadiano mais potente e pode exercer alterações drásticas no ritmo circadiano. (Mirick & Davis, 2008).

Neste sentido, avaliou-se também neste trabalho, se a dirupção do ritmo circadiano pode alterar a expressão do gene da ANAT, em fêmeas e machos. Para tal, um grupo de ratos foi exposto à luz constante (LL) e outro a escuridão constante (EE). A análise dos resultados baseou-se nas diferenças de expressão entre o grupo sujeito às condições descritas anteriormente e o grupo controlo exposto a um fotoperíodo normal (12 horas de escuro e 12 horas de luz). Foi então verificado que a exposição quer a EE ou LL não afetou a expressão do gene da ANAT quer em fêmeas quer em machos. Resultados distintos destes foram observados num estudo efetuado em células de hipocampo, em que a produção de melatonina após exposição à luz ou escuridão constantes sofria uma drástica redução (Mueller et al., 2011). As diferenças observadas entre o nosso estudo e outros já publicados podem ser devidas ao número reduzido de ZTs analisado, uma vez que a recolha de PCs só foi efetuada a uma hora (neste caso ZT1; 08:00). Tendo em conta que no plexo, não se verificaram efeitos causados pela dirupção, é possível que este funcione de modo a repor os níveis de melatonina, quando a pineal sofre alguma alteração com a dirupção do ritmo circadiano.

A DA é a patologia neurodegenerativa mais comum, sendo a sua principal causa a deposição de placas de péptido AB em várias regiões do cérebro (Lin et al., 2013). Deste modo o interesse na *clearance* do péptido AB tem aumentado (Mulder et al., 2014). Existem várias proteínas sequestradoras do péptido AB, que podem ser divididas em dois grupos de enzimas: as proteolíticas do péptido amilóide (IDE e ACE) e as proteínas de ligação e transporte do péptido amilóide que interagem de modo a modular a sua solubilidade, transporte, *clearance*, degradação e formação de fibrilhas (GLS, TTR, ApoJ e MT2).

A melatonina aparenta ter efeitos benéficos na DA, maioritariamente pela sua elevada capacidade antioxidante, uma vez que o *stress* oxidativo está envolvido no mecanismo desta patologia (Srinivasan et al., 2006). Estudos também demonstraram que a melatonina é capaz de reduzir os agregados de AB, *in vivo* e *in vitro* (Lin et al., 2013).

O efeito da melatonina, na expressão relativa dos genes das proteínas *scavenger* do A β (IDE, ACE, Gls, TTR, ApoJ e MT2) em explantes de PC foi estudado com recurso à técnica de PCR em tempo real.

Os explantes foram sujeitos ao tratamento com três concentrações diferentes de melatonina ($10^{-5}M$, $10^{-6}M$ e $10^{-8}M$) durante 24h a 37°C. O tratamento com melatonina no caso das proteínas ACE e ApoJ não resultou em alterações estatisticamente significativas na expressão dos genes destas moléculas. Por outro lado, os genes da IDE, MT2, TTR e GLS apresentaram alterações estatisticamente significativas, quando os explantes foram estimulados com a concentração de melatonina mais elevada ($10^{-5}M$).

Apesar de não haver estudos que relacionem a melatonina e os A β *scavenger*, vários outros estudos foram efetuados em células do cérebro incubadas com a melatonina. Estes estudos demonstraram que esta apresenta efeitos benéficos na patologia de Alzheimer. Esta hormona inibe danos mitocondriais, induzidos pelo péptido A β , em neurónios jovens em células do hipocampo (Dong et al., 2010). Noutro estudo, também no hipocampo, provaram que a melatonina diminui a toxicidade induzida pelo A β (Ionov et al., 2011). Sabe-se ainda que a melatonina tem a capacidade de diminuir a taxa de apoptose em células que tiveram contacto com o péptido A β (Jang et al., 2005) e de estimular a síntese de outras enzimas com capacidade antioxidante (Mayo et al., 2002).

VI. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a realização deste trabalho provou-se a presença das enzimas da via de síntese de melatonina em PC de rato. Para além disso, utilizando a técnica de HPLC, foi possível verificar a presença de melatonina e serotonina em meio de cultura das CPEC. Verificou que a expressão de ANAT, em CPEC e PC de ratos fêmea, apresenta uma oscilação rítmica. Após a disrupção do ritmo circadiano, por exposição a luz ou escuridão constante, não foi observada qualquer alteração nos níveis de expressão da ANAT.

Por PCR em tempo real, concluiu-se que a melatonina aumenta a expressão de mRNA de algumas moléculas sequestradoras do péptido AB. Posteriormente, seria importante quantificar estas proteínas no PC e no meio de cultura, por Western blot.

De forma a garantir que o PC tem a capacidade de produzir melatonina, seria essencial a realização de um estudo *in vivo*. Neste estudo seriam utilizados animais sujeitos a uma pinealectomia e um outro grupo controlo (sem remoção da glândula pineal) com o mesmo número de animais e da mesma idade. Após o sacrifício destes animais proceder-se-ia à quantificação de melatonina por HPLC e à análise da expressão da enzima ANAT no PC. A atividade das enzimas ANAT e HIOMT também seria comprovada. Deste modo, poder-se-ia provar que o PC é efetivamente um tecido extra-pineal produtor de melatonina, em que a sua síntese é regulada pelo ritmo circadiano

VII. Bibliografía

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., ... Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(16), 2997-3025. doi:10.1007/s00018-014-1579-2
- Borjigin, J., Zhang, L. S., & Calinescu, A.-A. (2012). Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), 13-9. doi:10.1016/j.mce.2011.07.009
- Calero, M., Rostagno, A., & Ghiso, J. (2012). Search for amyloid-binding proteins by affinity chromatography. *Amyloid Proteins*, 1-10. doi:10.1007/978-1-61779-551-0_15
- Cardinali, D. P., Pagano, E. S., Scacchi Bernasconi, P. a, Reynoso, R., & Scacchi, P. (2013). Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Hormones and Behavior*, 63(2), 322-30. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.020
- Chattoraj, A., Liu, T., Zhang, L. S., Huang, Z., & Borjigin, J. (2009). Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 10(4), 237-43. doi:10.1007/s11154-009-9125-5
- Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 11-24. doi:10.1016/j.smrv.2004.08.001
- Claustrat, B., & Leston, J. (2015). Melatonin: Physiological effects in humans. *Neuro-Chirurgie*. doi:10.1016/j.neuchi.2015.03.002
- Coomans, C. P., Ramkisoensing, A., & Meijer, J. H. (2015). The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37(November), 29-42. doi:10.1016/j.yfrne.2014.11.002
- De Almeida, E. A., Di Mascio, P., Harumi, T., Spence, D. W., Moscovitch, A., Hardeland, R., ... Pandi-Perumal, S. R. (2011). Measurement of melatonin in body fluids: standards, protocols and procedures. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 27(6), 879-91. doi:10.1007/s00381-010-1278-8
- Dong, W., Huang, F., Fan, W., Cheng, S., Chen, Y., Wenguang Zhang, ... Hongwen, A. (2010). Differential effects of melatonin on amyloid- b peptide 25 - 35-induced mitochondrial dysfunction in hippocampal neurons at different stages of culture. *Journal of Pineal Research*, (complex IV), 117-125. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00734.x
- Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 60(3), 97-108. doi:10.1016/j.biopha.2006.01.002
- Espino, J., Pariente, J. a, & Rodríguez, A. B. (2012). Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 670294. doi:10.1155/2012/670294

- Frank, E., Sidor, M. M., Gamble, K. L., Cirelli, C., Sharkey, K. M., Hoyle, N., ... Hasler, B. P. (2013). Circadian clocks, brain function, and development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1306, 43-67. doi:10.1111/nyas.12335
- Gupta, S., Haldar, C., & Ahmad, R. (2015). Photoperiodic regulation of nuclear melatonin receptor ROR α in lymphoid organs of a tropical rodent *Funambulus pennanti*: role in seasonal oxidative stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 142, 141-53. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.11.013
- Hardeland, R. (2012). Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 640389. doi:10.1100/2012/640389
- Introduction, I. (2015). *Hormones*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-08-091906-5.00016-1
- IONOV, M., BURCHELL, V., KLAJNERT, B., A ABRAMOV, BRYSEWSKA, M., & ABRAMOV, Y. (2011). MECHANISM OF NEUROPROTECTION OF MELATONIN AGAINST BETA-AMYLOID NEUROTOXICITY. *Neuroscience*, 180, 229-237. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.045
- Itoh, M. T., Ishizuka, B., Kudo, Y., & Fusama, S. (1997). Detection of melatonin and serotonin N -acetyltransferase and hydroxyindole- O -methyltransferase activities in rat ovary, 136, 7-13.
- Jang, M., Jung, S., Lee, M., Kim, C., Oh, Y., Kang, I., ... Kim, E. (2005). Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neuroscience Letters*, 380, 26-31. doi:10.1016/j.neulet.2005.01.003
- Janssen, S. F., van der Spek, S. J. F., Ten Brink, J. B., Essing, A. H. W., Gorgels, T. G. M. F., van der Spek, P. J., ... Bergen, A. a B. (2013). Gene expression and functional annotation of the human and mouse choroid plexus epithelium. *PloS One*, 8(12), e83345. doi:10.1371/journal.pone.0083345
- Kerridge, C., Belyaev, N. D., Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2014). The AB-clearance protein transthyretin, like neprilysin, is epigenetically regulated by the amyloid precursor protein intracellular domain. *Journal of Neurochemistry*, 130(3), 419-31. doi:10.1111/jnc.12680
- Klein, D. C. (2007). Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4233-7. doi:10.1074/jbc.R600036200
- Klein, D. C., Bailey, M. J., Carter, D. a, Kim, J., Shi, Q., Ho, A. K., ... Coon, S. L. (2010). Pineal function: impact of microarray analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(2), 170-83. doi:10.1016/j.mce.2009.07.010
- Krzyzanowska, A., & Carro, E. (2012). Pathological alteration in the choroid plexus of Alzheimer's disease: implication for new therapy approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 3(May), 75. doi:10.3389/fphar.2012.00075
- Lacoste, B., Angeloni, D., Dominguez-Lopez, S., Calderoni, S., Mauro, A., Frascini, F., ... Gobbi, G. (2015). Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *Journal of Pineal Research*, 58(4), 397-417. doi:10.1111/jpi.12224
- Lanoix, D., Beghdadi, H., Lafond, J., & Vaillancourt, C. (2008). Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *Journal of Pineal Research*, 45(1), 50-60. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00555.x

- Lehtinen, M. K., Bjornsson, C. S., Dymecki, S. M., Gilbertson, R. J., Holtzman, D. M., & Monuki, E. S. (2013). The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(45), 17553-9. doi:10.1523/JNEUROSCI.3258-13.2013
- Liddelow, S. A. (2015). Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier, 9(March), 1-13. doi:10.3389/fnins.2015.00032
- Lin, L., Huang, Q.-X., Yang, S.-S., Chu, J., Wang, J.-Z., & Tian, Q. (2013). Melatonin in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14575-93. doi:10.3390/ijms140714575
- Liu, Y.-J., Zhuang, J., Zhu, H.-Y., Shen, Y.-X., Tan, Z.-L., & Zhou, J.-N. (2007). Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. *Journal of Pineal Research*, 43(3), 232-238. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00466.x
- Macchi, M. M., & Bruce, J. N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25(3-4), 177-95. doi:10.1016/j.yfrne.2004.08.001
- Manoso, Y., Carrasco, J., Comes, G., Adlard, P. a, Bush, A. I., & Hidalgo, J. (2012). Characterization of the role of the antioxidant proteins metallothioneins 1 and 2 in an animal model of Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(21), 3665-81. doi:10.1007/s00018-012-1045-y
- Masri, S., Cervantes, M., & Sassone-Corsi, P. (2013). The circadian clock and cell cycle: interconnected biological circuits. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), 730-4. doi:10.1016/j.ceb.2013.07.013
- Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Rodríguez, C. (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1706-1713.
- Merbitz-Zahradnik, T., & Wolf, E. (2015). How is the inner circadian clock controlled by interactive clock proteins?: Structural analysis of clock proteins elucidates their physiological role. *FEBS Letters*. doi:10.1016/j.febslet.2015.05.024
- Mirick, D. K., & Davis, S. (2008). Melatonin as a biomarker of circadian dysregulation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(12), 3306-13. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0605
- Mueller, A. D., Mear, R. J., & Mistlberger, R. E. (2011). INHIBITION OF HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS BY SLEEP DEPRIVATION IS INDEPENDENT OF CIRCADIAN DISRUPTION AND MELATONIN SUPPRESSION. *Neuroscience*, 193, 170-181. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.07.019
- Mulder, S. D., Nielsen, H. M., Blankenstein, M. a, Eikelenboom, P., & Veerhuis, R. (2014). Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia*, 62(4), 493-503. doi:10.1002/glia.22619
- Nakamura, T. J., Sellix, M. T., Kudo, T., Nakao, N., Yoshimura, T., Ebihara, S., ... Block, G. D. (2010). Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids*, 75(3), 203-12. doi:10.1016/j.steroids.2010.01.007

- Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., Kerridge, C., & Turner, A. J. (2014). Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(September), 235. doi:10.3389/fnagi.2014.00235
- Naranjo, M. C., Guerrero, J. M., Rubio, a., Lardone, P. J., Carrillo-Vico, a., Carrascosa-Salmoral, M. P., ... Molinero, P. (2007). Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(6), 781-790. doi:10.1007/s00018-007-6435-1
- Neuroscience, B., & Karatsoreos, I. N. (2014). Links between circadian rhythms and psychiatric disease, 8(May), 1-5. doi:10.3389/fnbeh.2014.00162
- Pala, D., Scalvini, L., Lodola, A., Mor, M., Flammini, L., Barocelli, E., ... Spadoni, G. (2014). Synthesis and characterization of new bivalent agents as melatonin- and histamine H3-ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 16114-33. doi:10.3390/ijms150916114
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J. M., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, 85(3), 335-53. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.04.001
- Quintela, T., Sousa, C., Patriarca, F. M., Gonçalves, I., & Santos, C. R. a. (2014). Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus. *Brain Structure & Function*. doi:10.1007/s00429-014-0720-1
- Redzic, Z. B. (2013). Studies on the human choroid plexus in vitro. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 10. doi:10.1186/2045-8118-10-10
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Galano, A. (2014). Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 29(5), 325-33. doi:10.1152/physiol.00011.2014
- Richards, J., & Gumz, M. L. (2012). Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(9), 3602-13. doi:10.1096/fj.12-203554
- Robinson, I., & Reddy, a B. (2014). Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS Letters*, 588(15), 2477-83. doi:10.1016/j.febslet.2014.06.005
- Rohr, U. D., & Herold, J. (2002). Melatonin deficiencies in women. *Maturitas*, 41, 85-104. doi:10.1016/S0378-5122(02)00017-8
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., ... Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. doi:10.1126/science.2448875
- Sakaguchi, K., Itoh, M. T., Takahashi, N., Tarumi, W., & Ishizuka, B. (2013). The rat oocyte synthesises melatonin. *Reproduction, Fertility, and Development*, 25(4), 674-82. doi:10.1071/RD12091
- Sarlak, G., Jenwitheesuk, A., Chetsawang, B., & Govitrapong, P. (2013). Effects of Melatonin on Nervous System Aging: Neurogenesis and Neurodegeneration. *Journal of Pharmacological Sciences*, 123(1), 9-24. doi:10.1254/jphs.13R01SR

- Schwerk, C., Tenenbaum, T., Kim, K. S., & Schroten, H. (2015). The choroid plexus – a multi-role player during infectious diseases of the CNS, 9(March), 1-11. doi:10.3389/fncel.2015.00080
- Singh, M., & Jadhav, H. R. (2014). Melatonin: functions and ligands. *Drug Discovery Today*, 19(9), 1410-8. doi:10.1016/j.drudis.2014.04.014
- Spector, R., & Johanson, C. E. (2013). Sustained choroid plexus function in human elderly and Alzheimer's disease patients. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 28. doi:10.1186/2045-8118-10-28
- Spector, R., Keep, R. F., Robert Snodgrass, S., Smith, Q. R., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 267, 78-86. doi:10.1016/j.expneurol.2015.02.032
- Srinivasan, V., Pandi-perumal, S. R., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. (2006). Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behavioral and Brain Functions*, 23, 1-23. doi:10.1186/1744-9081-2-15
- Stefulj, J., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wo, A., & Liebmann, M. (2001). Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat, 243-247.
- Tijmes, M., Pedraza, R., & Valladares, L. (1996). Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. *Steroids*, 61(2), 65-68. doi:10.1016/0039-128X(95)00197-X
- Tsang, A. H., Barclay, J. L., & Oster, H. (2014). Interactions between endocrine and circadian systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(1), R1-16. doi:10.1530/JME-13-0118
- Wood, S., & Loudon, A. (2014). Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *The Journal of Endocrinology*, 222(2), R39-59. doi:10.1530/JOE-14-0141
- Wu, Y.-H., & Swaab, D. F. (2007). Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease. *Sleep Medicine*, 8(6), 623-36. doi:10.1016/j.sleep.2006.11.010
- Yu, Y., Sun, X., Tang, D., Li, C., Zhang, L., Nie, D., ... Shi, G. (2015). Gelsolin bound β -amyloid peptides(1-40/1-42): Electrochemical evaluation of levels of soluble peptide associated with Alzheimer's disease. *Biosensors & Bioelectronics*, 68, 115-21. doi:10.1016/j.bios.2014.12.041
- Zawilska, J. B., Skene, D. J., & Arendt, J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports*, 61(3), 383-410. doi:10.1016/S1734-1140(09)70081-7