



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

PAULO MATEUS ALVES LOPES

**LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA EM
DIFERENTES IDADES EMBRIONÁRIAS DE PREÁ (*GALEA SPIXII* WAGLER,
1831)**

MOSSORÓ-RN

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

PAULO MATEUS ALVES LOPES

**LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA EM
DIFERENTES IDADES EMBRIONÁRIAS DE PREÁ (*GALEA SPIXII* WAGLER,
1831)**

Dissertação de Mestrado em Ciência Animal
apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal
Rural do Semi-Árido como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de
Oliveira - UFERSA.

MOSSORÓ-RN

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

L8641 LOPES, PAULO MATEUS ALVES .
LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE
MELATONINA EM DIFERENTES IDADES EMBRIONÁRIAS DE
PREÁ (GALEA SPIXII WAGLER, 1831) / PAULO MATEUS
ALVES LOPES. - 2019.
84 f. : il.

Orientador: MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2019.

1. Imunofluorescência. 2. Morfologia. 3.
Microscopia. 4. Órgãos. 5. Roedores. I. OLIVEIRA,
MOACIR FRANCO DE, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

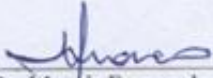
PAULO MATEUS ALVES LOPES

**LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA EM
DIFERENTES IDADES EMBRIONÁRIAS DE PREÁ (*Galea spixii* Wagler, 1831).**

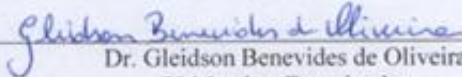
Dissertação de Mestrado em Ciência Animal
apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal
Rural do Semi-Árido como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Defendida em:

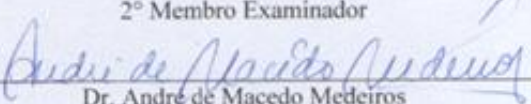
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira
Presidente da Banca
Orientador



Dr. Gleidson Benevides de Oliveira
2º Membro Examinador



Dr. André de Macedo Medeiros
3º Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO MATEUS ALVES LOPES nasceu no dia 11 de outubro de 1994 na cidade de Fortaleza-CE. Coursou o ensino médio na Escola Nunes Moraes (em PACAJUS-CE), concluindo no ano de 2012. Em 2012, iniciou o ensino superior em Medicina Veterinária na Faculdade Terra Nordeste. Em 2014, transferiu para a Universidade Federal Rural do Semi-Árido, concluindo o curso em 2017. Em 2018, ingressou na Pós-Graduação pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Atualmente é discente (mestrado) do curso em Ciência Animal sob orientação do prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira.

Ao meu tio **Francisco José** (*in memorian*) que está ao lado de Deus rezando por mim e que contribuiu para minha conquista. Saudades eternas.

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ser essencial na minha vida, por ser autor do meu destino, por ter me dado forças para superar todos os momentos difíceis e por tudo o que eu consegui e ainda irei conseguir durante minha vida.

Aos meus pais, **Paulo César Monteiro Lopes** e **Aurenice Alves da Costa Lopes**, que me concederam a vida, e estão sempre ao meu lado, sem medir esforços para me proporcionar o melhor, além de serem as pessoas mais importantes na minha vida; aos meus irmãos, **Paulo Emanuel Alves Lopes** e **Paula Emanuella Alves Lopes**, à minha namorada **Elisa da Silva Sousa**, e à toda minha família que sempre esteve me apoiando.

Ao meu professor orientador professor **Moacir Franco de Oliveira**, o qual não mediu esforços para me orientar, repassando conhecimentos muito importantes para minha vida, além de ter contribuído com sua amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a **DEUS**, por minha vida, por ser meu guia, por me conceder saúde, alegria, paz, humildade e força para poder superar todas as dificuldades encontradas na minha vida, além de permitir a realização dos meus sonhos.

À minha mãe, **Aurenice Alves da Costa Lopes**, pelo o amor e pela confiança depositada em mim. Sempre fazendo o melhor para mim, e sempre comigo em todos os momentos. Te amo.

Ao meu pai, **Paulo César Monteiro Lopes**, pelo seu carinho, amor, dedicação, sempre trabalhando muito para me dar todo o suporte e para contribuir com minha formação. Obrigado por tudo.

À minha namorada, **Elisa da Silva Sousa**, pelo grande apoio, motivação, carinho e companheirismo que sempre me proporcionou e por contribuir com meu sonho.

Aos meus irmãos, **Paulo Emanuel** e **Paula Emanuella**, por sempre estarem presentes na minha vida, sendo meus companheiros, pois sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e torcendo por minhas conquistas.

Aos meus avós, **Cícero José da Costa**, **Aurinete Alves da Costa** e **Maria Monteiro Lopes (in memorian)**, que sempre torceram e vêm acompanhando toda minha trajetória.

Aos meus tios, **Aurineide Alves de Paula**, **Audenizio Alves da Costa**, **Aurileide Alves da Costa**, **Francisco José Alves filho (in memorian)**, **Rizelda Monteiro Lopes**, **Rodrigo Monteiro Lopes**, **Francisco de Assis de Paula**, **Francisco de Assis**, **Lucicleide Alves da Costa**, **Valdilene Alves da Costa**, por tudo que já fizeram por mim até hoje, sempre me tratando com muito carinho, cuidado e amor, além de terem sido peças fundamentais e grandes incentivadores na minha vida acadêmica.

Aos meus primos, **Luana Vitória Alves de Paula, Antônio Anderson Alves da Costa, Emerson Alves da Costa, Pedro Henrique Alves da Costa, Arthur Fonseca e Heitor Fonseca** e aos demais, pelo carinho, pelo o apoio e por contribuírem de alguma forma na minha formação.

Ao meu primo **Victor Monteiro Nunes** por todo o companheirismo e por te me ajudado bastante no desenvolvimento dessa dissertação.

Ao meu amigo, **João Arthur**, por dividir moradia durante toda minha pós-graduação e sempre ser companheiro. Obrigado pela amizade, meu amigo.

Aos meus amigos que conquistei durante minha graduação e pós-graduação que são pessoas importantes pra mim, **Carlos Eduardo Ferreira de Sousa, Antônio Igor Viera Holanda, Ícaro Coutinho Cosmo, Lucas José da Silva Santos, João Arthur, John Lenon Vasconcelos Fonteles, Francisco Marques Dantas Neto, Higor Gomes, Jerson Marques Cavalcante, Rayr César de Sousa Gois, Hélio Noberto de Araujo Júnior, Bruna Holanda Duarte, Uri Vanille Raiol, Katyanne Barros de Araujo**, e a todos os outros que vivenciaram comigo nesse período. Um agradecimento de coração pela amizade, carinho e momentos inesquecíveis.

Ao meu amigo, **Alexandre Ferreira Lima**, que conheci na Faculdade Terra Nordeste e com os qual até hoje possuo importante vínculo de amizade.

Aos meus amigos do laboratório, **Hélio Noberto de Araújo Júnior, Herson da Silva Costa, Igor Renno Guimarães Lopes, Radan Elvis Matias de Oliveira, Moises Dantas Tertulino, Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra, Gleidson Benevides de Oliveira, Ana Caroline Freitas Caetano, João Vitor de Oliveira Gurgel, Carlos Eduardo Vale Rebouças** pela amizade e pela contribuição na produção do meu trabalho.

Ao meu orientador e professor **Moacir Franco de Oliveira**, por toda paciência, por todas as conversas, por todo ensinamento que me passou durante minha graduação e pós graduação.

Aos **demais professores** que contribuíram para a minha formação, transmitindo seus conhecimentos e experiências de vida.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA.

Aos funcionários do CEMAS, **Antônio Almeida dos Santos e Manoel Messias do Santos (Cuscuz), Francisco das Chagas Souza, Robson** pela contribuição nas coletas dos materiais.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar a essa conquista.

**LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA
EM DIFERENTES IDADES EMBRIONÁRIAS DE PREÁ (*GALEA SPIXII*
WAGLER, 1831)**

LOPES, P. M. A. RECEPTORES DE MELATONINA EM EMBRIÕES DE PREÁ (*Galea spixii* Wagler, 1831). 2019. XXXf. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi – Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2019.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar a localização e distribuição dos receptores de melatonina em diferentes idades embrionárias de preá (*Galea spixii* wagler, 1831), com base em microscopia de luz e de imunofluorescência. Para desenvolvimento deste estudo, foram utilizados 9 preás fêmeas, adultas, com as quais foram formados três grupos com três fêmeas, obtidas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEMAS/UFERSA). Para experimentação, os animais foram eutanasiados seguindo o protocolo preconizado para roedores, após a aprovação pelo ICMBio e pela CEUA. As coletas dos embriões foram realizadas aos 20, 25, 30 dias de gestação, sendo coletados três embriões por idade gestacional, e esses embriões foram destinados ao processamento de microscopia de luz e imunofluorescência. Em todos os órgãos estudados, encéfalo, pulmão, coração, fígado e rim, observou-se marcação para os receptores de melatonina MT1 e MT2, apresentando marcações de diferentes intensidades entre as idades gestacionais e entre órgãos. Com relação ao encéfalo observou-se marcação nas diferentes estruturas que o compõem, além disso a estrutura que apresentou maior marcação para os receptores de melatonina foi o plexo coroide. Com relação ao pulmão, observou-se que a marcação dos receptores de melatonina ocorria principalmente nos brônquios e bronquíolos. Quanto ao coração, o miocárdio foi a região em que houve maior marcação de receptores de melatonina, porém de forma difusa. No fígado a marcação foi intensa em todas as idades gestacionais e as células que sofreram maior marcação foram os hepatócitos. No rim, independente da idade gestacional, a região tubular foi a que apresentou a maior intensidade de marcação. No que se refere à densidade de marcação imunofluorescente dos receptores de melatonina nos embriões de preá, observou-se que em órgãos como encéfalo, coração e rim houve variação significativa na densidade de receptores quando comparamos as diferentes idades gestacionais avaliadas, já no fígado

e pulmão não se observou variância significativa entre as idades. Baseado nos resultados obtidos e discutidos pode-se concluir que os receptores de melatonina estão distribuídos por todos os órgãos estudados, sendo o fígado o órgão que apresentou a marcação mais intensa e maior densidade de marcação dos receptores de melatonina independente da idade gestacional.

Palavras-chave: Imunofluorescência, Morfologia, Microscopia, Órgãos, Roedores.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Via biossintética da melatonina. Representação da via de síntese de melatonina, desde do triptofano até a formação da melatonina. Adaptado de Reiter et al. (2000)..... 22

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2 - Vistas da entrada do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres. Fonte: Bezerra (2014).....31

Figura 3 - Fotografia do preá: Fonte: Rebouças (2017).....32

Figura 4 - Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerava-se o primeiro dia de gestação. Em A, espermatozoides de preá. Objetiva de 100X. Barra = 10 µm.....34

CAPÍTULO 1:

Figura 1 - Fotomicrografia do encéfalo de embriões de preás. Imagens de A a F representam 20 dias de gestação, de G a M representam 25 dias de gestação e de N a P representam 30 dias de gestação. Em A, observa-se uma vesícula telencéflica (região circunscrita), o diencéfalo ([]) e o mesencéfalo ({}). Em B, observa-se o metencéfalo (região circunscrita) com o plexo coroide no seu interior. Em C, observa-se intensa fluorescência na vesícula telencéflica. Em D, observa-se marcação moderada dos receptores de melatonina na região cortical do diencéfalo. Em E, observa-se uma região do mesencéfalo com marcação fluorescente moderada. Em F, observa-se marcação intensa dos receptores MT1 e MT2 no plexo coroide. Em G, observa-se o telencéfalo. Em H, observa-se o diencéfalo com um vesícula central (+). Em I, observa-se mesencéfalo com grande concentração de células. Em J, observa-se o metencéfalo com o plexo coroide (região circunscrita) no seu interior. Em K, observa-se a porção nervosa da hipófise com intensa marcação. Em L, observa-se o mesencéfalo com fluorescência moderada. Em M, notou-se intensa fluorescência do plexo coroide. Em N, tecido nervoso mais compacto do encéfalo. Em O, observa-se o tecido nervoso do diencéfalo. Em P, observa-se marcação fluorescente do mesencéfalo..... 60

Figura 2 - Fotomicrografia do pulmão de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se a presença de bronquíolos terminais (BT) em um estroma abundante. Em C, observa-se brônquios (b) e bronquíolos (BT) rodeados por tecido conjuntivo. Em E, observa-se a presença de

brônquios (b) e bronquíolos (BT) em um estroma bem reduzido. Em B, D e E observa-se a marcação para os receptores de melatonina.....62

Figura 3 - Fotomicrografia do coração de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se um túbulo com septo (*) ainda não formado com a presença de bastante células sanguíneas no seu interior. Em C, observa-se a presença do átrio primitivo (AP) e ventrículo primitivo (VP). Em E, observa-se a região ventricular com presença da trabécula septomarginal (TS). Observa-se também a presença da válvula bicúspide (VB). Em B, D e F evidencia-se a marcação que ocorreu de forma difusa nas regiões , embora tenha marcado em diferentes intensidade.....65

Figura 4 - Fotomicrografia do fígado de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se o parênquima hepático repleto de células, tais como hepatoblastos (seta), além disso, observou-se micro região de células sanguíneas (*) em processo de maturação. Em B, D e F observa-se intensa marcação nas células que compõem o parênquima hepático. Em C, observa-se a presença de hepatoblastos (seta), vasos sanguíneos (Vs) e grande quantidade de hepatócitos. Em E, parênquima hepático.....67

Figura 5- Fotomicrografia do rins de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 30, 25, 20 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se um parênquima renal bem compacto com a presença túbulos renais (seta preta). Em B, D e E observa-se a marcação mais intensa na região dos túbulos . Em C, observa-se o parênquima renal com a presença de vários túbulos (seta). Em E, observa-se o rim na qual fica evidenciado a região cortical (CTX) e região medular (M) e outras estruturas que compõem o rim : túbulo (seta preta) e glomérulo renal (seta vermelha) e também o hilo renal (H).....70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

Tabela 1: Densidade da marcação dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em diferentes órgãos dos embriões e diferentes idades gestacionais. Valores estão expressos em percentual.	71
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
MT1	Receptor de Melatonina Tipo 1
MT2	Receptor de Melatonina Tipo 2
MT3	Receptor de Melatonina Tipo 3
MEL1a	Receptor membranar de melatonina do subtipo 1a
MEL1b	Receptor membranar de melatonina do subtipo 1b
MEL1c	Receptor membranar de melatonina do subtipo 1c
mEq	Miliequivalente
kDa	Kilodaltons
g	Gramas
kg	Kilogramas
mg	Miligrama
μ	Micrometro
RZR	Receptor Z para retinóide
ROR	Receptor órfão para retinóide

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PRÉA (<i>Galea spixii</i>)	20
2.2 PINEAL	21
2.3 MELATONINA:.....	21
2.4 CICLO CIRCADIANO:	24
2.5 MECANISMOS DE AÇÃO E RECEPTORES DE MELATONINA:.....	25
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL:	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM:	31
4.2 ESPÉCIE ESTUDADA	32
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:	33
4.4 CITOLOGIA VAGINAL:	33
4.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO:.....	34
4.6 COLETA DO MATERIAL:	35
4.7 MICROSCOPIA DE LUZ:	35
4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA:	36
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA:	38
REFERÊNCIAS	39
5 CAPÍTULO 1- RECEPTORES DE MELATONINA EM EMBRIÕES DE PREÁ (<i>Galea spixii</i> Wagler, 1831).....	51
INTRODUÇÃO	53
MATERIAIS E MÉTODOS	54
RESULTADOS.....	57
DISCUSSÃO	72
CONCLUSÃO	75
MANUFACTURERS	76
REFERENCES.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os roedores possuem grande capacidade de adaptação ao meio ambiente, habitam variados climas e altitudes, como consequência de suas condições de adaptações fisiológicas. São mamíferos que possuem placentação variável, além disso, possuem tamanho e forma de dentição características, pois são desprovidos de caninos e possuem espaços entre incisivos e molares bem definidos (MOOJEN, 1952). Segundo Carleton e Musser (2005), os dentes incisivos destes animais estão em constante crescimento e, geralmente, possuem cinco e quatro molares em cada lado da maxila e da mandíbula, respectivamente, além de possuírem livre movimentação da mandíbula para frente, para trás e para os lados.

O preá (*Galea spixii*) é um roedor pertencente à subordem Hystricomorpha, família Caviidae e subfamília Cavinae. Possui o corpo alongado, cabeça e os olhos grandes, orelhas curtas e arredondadas, é desprovido de cauda e apresenta uma pelagem de cor uniforme, sendo a superfície dorsal cinza escura e o ventre branco. Cabe destacar, sobre esse animal, que o mesmo possui características biológicas favoráveis à domesticação, como a reprodução em cativeiro, hábito gregário, poligamia e prolificidade, além de possuir uma carne saborosa, apreciada por parte da população sertaneja. Além disso, são roedores com hábitos noturnos, vivendo em grupos estruturados hierarquicamente que se alimentam de folhas, ramos e frutos de plantas rasteiras, raízes, tubérculos e casca de árvores (MENDES, 1987; PINHEIRO et al., 1989; BONVICINO et al., 2008, JÚNIOR et al., 2016).

O preá possui curto período gestacional, alta prolificidade e elevado grau de desenvolvimento de filhotes, características reprodutivas que fazem do mesmo roedor com potencial para modelo experimental voltado a estudos com reprodução (OLIVEIRA et al., 2008). Os crescentes estudos com modelos reprodutivos de roedores têm se tornado uma ferramenta interessante para o conhecimento da biologia reprodutiva das espécies, favorecendo, consequentemente, a preservação e manutenção em cativeiro com vistas à domesticação. Além disso, permitem o desenvolvimento de estudos comparativos e mesmo podem favorecer que estas espécies tornem-se modelos para diversos tipos de pesquisas, tais como aqueles voltados à produção de células tronco embrionárias e mesmo para o entendimento de afecções que acometem fetos na vida pré-natal, como descreve Carter (2007).

Estudos sobre a preservação e a exploração de animais silvestres nativos (PINHEIRO; ANDRADE; DA CUNHA, 2002), sobre a placentação (OLIVEIRA et al., 2008), origem e distribuição dos nervos isquiáticos (OLIVEIRA et al., 2010) foram realizados em preás. Porém, verifica-se que, na literatura, não há estudos referentes à importância da melatonina e de seus receptores em preás.

A melatonina é um hormônio produzido em diferentes regiões do organismo animal tais como glândula pineal, trato gastrointestinal e retina, sendo a pineal a região responsável por desencadear o pico noturno de melatonina circulante (PÉVET, 2003; HARDELAND et al., 2011; TOSINI et al., 2012; WIECHMANN, 1986). Esse hormônio é responsável pela regulação do ciclo circadiano através da placenta. Na fisiologia do embrião, ele é passado da mãe para o embrião, regulando o ciclo circadiano, reduzindo a secreção de cortisol pela glândula adrenal do feto e causa inibição das contrações das artérias cerebrais do feto. Além disso, quanto ao desenvolvimento embrionário, ele atua no controle das apoptoses de células embrionárias, inibindo a expressão de genes pró-apoptóticos e aumentando a expressão de genes anti-apoptóticos (CHAKIR et al., 2015; TORRES-FARFAN et al., 2004; SIMONNEAUX, 2011). Estas ações da melatonina sobre o embrião no período implantacional coincidem com a expressão dos receptores de melatonina nas células embrionárias (SHANG; ZHDANOVA, 2007). De acordo com Lacost et al. (2015), em mamíferos a melatonina produzida pela pineal e pelos diversos órgãos e tecidos possui ação em receptores que estão localizados tanto no sistema nervoso central quanto nos órgãos periféricos.

As ações fisiológicas da melatonina são mediadas pela estimulação de dois receptores acoplados à proteína G de alta afinidade, MT1 e MT2 (DUBOCOVICH, 2005). Ainda existe outro tipo de receptor, o MEL1C descrito em anfíbios, aves e peixes (VANECEK, 1998).

Assim, considerando a escassez de informações sobre melatonina na espécie e sabendo da importância desta e de seus receptores, durante o desenvolvimento embrionário, tanto no que se refere ao sucesso implantacional quanto ao desenvolvimento dos órgãos em relação ao ciclo circadiano materno e ainda sobre as características reprodutivas do preá, cujo conhecimento da fisiologia do preá pode potencializar pesquisas para que este se torne modelo experimental, avaliou-se neste estudo a

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PRÉA (*Galea spixii*)

Segundo Riggs et al. (2009), a ordem *Rodentia* é apontada como a maior entre os mamíferos, tendo exemplares encontrados em todo o mundo, excetuando-se a Antártica e pequenas ilhas, onde a ordem não foi registrada. Simpson (1945) relatou que a ordem *Rodentia* é subdividida em três grupos, de acordo com a osteologia craniana, as especializações do músculo masseter, e as relações dessa estrutura com o conduto infraorbitário, que denominou estes grupos em *Sciuromorpha*, *Myomorpha* e *Hystricomorpha*. Segundo Wilson e Reeder (2005) a subordem *Sciuromorpha* engloba esquilos e outros animais constituindo assim 62 espécies, a ordem *Myomorpha* inclui ratos-saltadores, ratos, hamsters e camundongos totalizando 1559 espécies, enquanto a subordem *Hystricomorpha* inclui porcos-espinhos, capivaras, entre outros totalizando 290 espécies. Os *Hystricomorfos* apresentam uma estrutura que é característica desse grupo que é a presença de subplacenta. Dessa forma, tendo como base essas características relatadas acima, o préa é um roedor pertencente à subordem *Hystricomorpha*.

O préa (*Galea spixii*) é um roedor da família *Caviidae* de corpo alongado, superfície dorsal cinza escura e ventre branco e cujos olhos são delimitados por um anel de pelos brancos (OLIVEIRA et al., 2010). De acordo com Percequillo et al. (2007) o crânio desse roedor possui um forâmen infraorbital grande e também dentes incisivos de coloração amarela, um pré-molar e três molares. São encontrados em regiões que apresentam a caatinga como o principal bioma, tendo como predileção de habitat regiões de capinzais e serrotes de pedra (MOOJEN, 1952). Alimenta-se de ramos e frutos de plantas rasteiras, folhas, raízes e cascas de árvores (MENDES, 1987). Santos (2012), descreve que o préa apresenta um período de gestação de 48 dias e, de acordo com Eisenberg e Redfor (1989), a reprodução nessa espécie pode ocorrer em qualquer período do ano, tendo as fêmeas predileção por fazer ninhos em locais que sejam protegidos por pedras ou vegetação. Além disso, concebem em média dois filhotes, por gestação, que são bem identificados e apresentam pelos em todo seu corpo (OLIVEIRA et al., 2008).

2.2 PINEAL

A glândula pineal, estrutura também conhecida como epífise cerebral, é uma pequena glândula endócrina presente no cérebro dos vertebrados, que secreta um hormônio derivado da serotonina responsável por modular os padrões de sono nos ciclos circadianos e sazonais.

Guyton e Hall (2006), em seu tratado de fisiologia, descreve que a pineal é uma estrutura pequena em forma de cone com peso de 0,5 g que possui em seu interior uma massa e que se estende a partir da região posterior do diencéfalo formando o teto do terceiro ventrículo. De acordo com Junqueira e Carneiro (2003), a pineal apresenta um núcleo central composto de lobos (parênquima) e uma superfície periférica (estroma) característico de glândula endócrina. Já Vollrath (1985) define a pineal como uma estrutura formada por uma agregação de tecido conjuntivo, glandular, vasos e nervos. Nessa glândula são encontrados dois tipo celulares, que compreendem os astrócitos e pinealócitos, sendo este último, o tipo celular que ocupa maior parte do parênquima da pineal de mamíferos e que possui maior papel na síntese de melatonina.

Comumente a pineal ou epífise cerebral é morfológicamente dividida em porções nas diferentes espécies. Moller (1992) descreve que em roedores a mesma está dividida em três porções distintas que são elas, a pineal profunda, o pendúculo pineal e a pineal superficial. Moller e Baeres (2002) descreveram que no parênquima da glândula pineal de mamíferos estão localizados os pinealócitos responsáveis pela produção hormonal, células intersticiais e fagócitos perivasculares.

2.3 MELATONINA:

A melatonina é o hormônio produzido pela glândula pineal que tem como funções básicas a indução ao sono e regulação do metabolismo diário dos animais, ou seja, é o hormônio que regula o ciclo biológico de quase todos os animais quando dormindo ou em atividade, o que se denomina de ritmo circadiano.

A melatonina é amplamente distribuída em plantas, organismos unicelulares, algas, bactérias, invertebrados e vertebrados (IRITI et al., 2010; STEHLE et al., 2011). Dada a sua ampla distribuição e influência sobre o fenótipo das espécies, a mesma é considerada uma substância com funções pleiotrópicas. JUNG-HYNES et al. (2010) e PARADIES et al. (2010) afirmam que esse hormônio, por ser amplamente distribuído nas espécies, corresponde a uma substância que possui diversas ações em diversos

órgãos. Reiter et al. (2013) justificam que a capacidade que a melatonina apresenta de atravessar facilmente as membranas celulares e barreiras fisiológicas é umas das explicações para sua ampla distribuição em órgãos, tecidos e fluidos.

A melatonina é um hormônio comum em todos os vertebrados. Esse hormônio foi isolado inicialmente a partir de extratos de glândula pineal bovina em 1958, segundo cita LERNER et al. (1958). Este é classificado fisiologicamente como um neuro-hormônio indolaminérgico com peso molecular de 232kda, produzido principalmente pela glândula pineal, mas também pelo corpo ciliar da íris, glândulas lacrimais e harderianas, retina, linfócitos, intestino grosso, fígado, testículos e ovários, sendo a glândula pineal que, de forma exclusiva, é responsável pelo ritmo circadiano da melatonina no sangue (PONTES et al., 2006; CRUZ, 2016).

As fontes extrapineais da melatonina possuem importância significativa para a ação autócrina e/ou parácrina desse hormônio, embora tenha contribuição mínima para a concentração plasmática da melatonina (CLAUSTRAT, BRUN, CHAZOT, 2005).

Sua síntese pela pineal é influenciada significativamente pelo ciclo diário de luz e escuro, tem como base as mudanças de duração do fotoperíodo ambiental e sua secreção é proporcional a duração do período de escuridão, conforme relata Reiter (2005).

A melatonina é sintetizada exclusivamente à noite, iniciando com a conversão de triptofano em 5 hidroxitriptofano por meio da ação da enzima 5-triptofano hidroxilase. A medida que ocorre a conversão do triptofano os pinealócitos passam a capturar o 5-hidroxitriptofano do sangue e o convertem em serotonina, que é convertida em N-acetilserotonina por ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase. Finalmente, a hiroxindol-O-metiltransferase atua sobre a N-acetilserotonina convertendo-a em melatonina (TAMURA et al., 2009; NETO, 2008) (Figura 1).

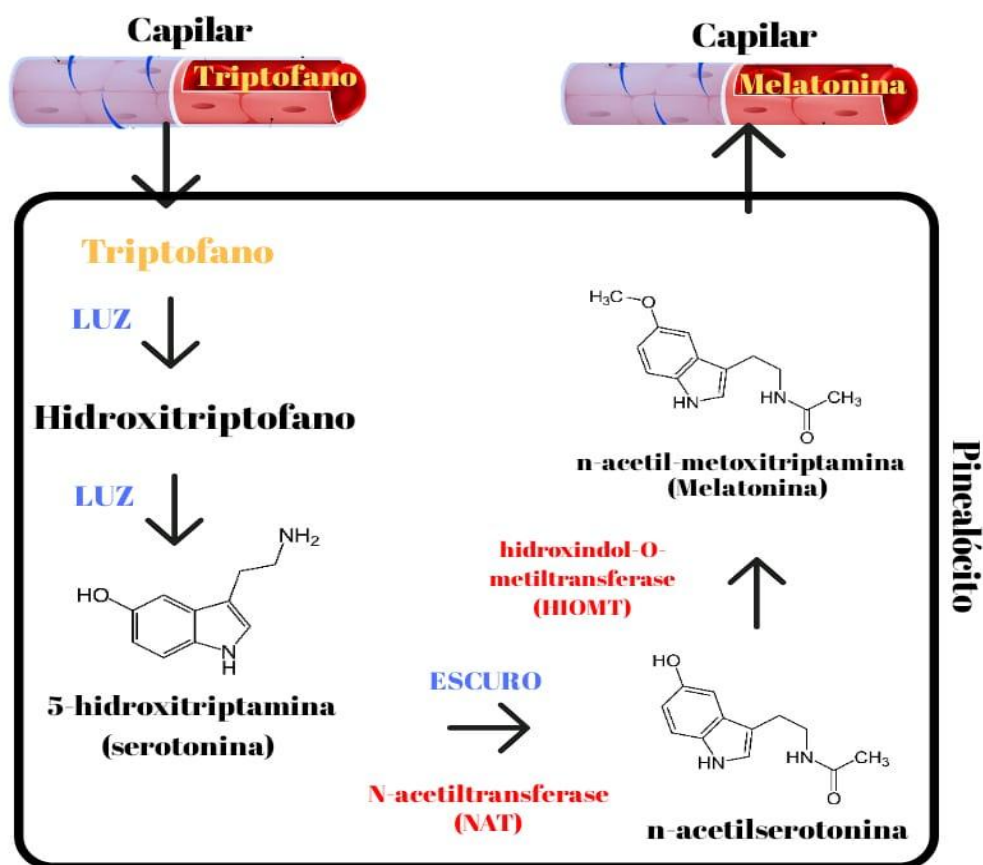


Figura 1 - Via biossintética da melatonina. Representação da via de síntese de melatonina, desde do triptofano até a formação da melatonina. Adaptado de Reiter et al. (2000).

Ao mesmo tempo em que a melatonina vai sendo sintetizada, vai se difundindo na corrente sanguínea e, em função dos gradientes de concentração, vai atravessando as paredes dos capilares e membranas de órgãos afins. De acordo com Reiter et al., (2013), a melatonina difunde-se facilmente entre as membranas celulares e barreiras fisiológicas, a exemplo da barreira hematoencefálica, aspecto que segundo os pesquisadores explica sua abundante distribuição em órgãos, tecidos e fluidos.

A melatonina está envolvida numa variedade de processos neuroendócrinos, neurofisiológicos e celulares, desempenhando papel fundamental na regulação dos ritmos circadianos, no envelhecimento, na fisiologia gastrointestinal, regulação do ciclo sono-vigília, do sistema imunológico, cardiovascular, regulação de temperatura corporal, no crescimento tumoral, no metabolismo de lipídeos e carboidratos. Além disso, também está envolvida nos processos reprodutivos (HIRIART et al., 2012). Nos sistemas reprodutivos, esse hormônio está envolvido mecanismos relacionados à sazonalidade, como pode ser observado em ovelhas, no bisão, no ferret, no cavalo, no

hamster e ratos selvagens (ARENDT et al., 1995). Além disso, no caso da fêmea do hamster sírio, pode causar depressão nos níveis do hormônio folículo estimulante (FSH), o que diminui o desenvolvimento folicular desencadeando anestro nesta espécie, levando a uma característica de sazonalidade reprodutiva.

2.4 CICLO CIRCADIANO:

O ciclo circadiano ou ritmo circadiano corresponde ao período de tempo em que determinado indivíduo alterna um conjunto de atividades fisiológicas. Por exemplo, as atividades de digestão de alimentos, o estado de vigília e sono, o processo de renovação das células e o controle da temperatura do organismo. O controle fisiológico do ciclo circadiano tem origem no sistema nervoso central (SNC), no núcleo supraquiasmático. Este núcleo gera um ciclo circadiano intrínseco e independente de períodos de iluminação que dura cerca de 24 horas. Devido à falta de precisão e a pouca variação deste controle do ciclo circadiano, ocorreram mudanças durante o processo evolutivo, tornando-o sincronizado aos níveis e variações de luz durante o dia (SAPER, 2013; SLAT; FREEMAN; HERZOG, 2013).

O ritmo circadiano é controlado a partir do SNC, que responsável pela sinalização, aos tecidos periféricos por meio do sistema nervoso autônomo (SNA). Durante um período de 24 horas, na periferia, o SNA é responsável por regular as alterações na fisiologia das células a nível molecular. Dependendo do tipo de célula, até 20% dos genes podem apresentar independência deste sistema de sincronização. Sendo assim, para que a expressão dos demais genes seja ideal, o ritmo circadiano deve ser regulado com precisão pelo SNC. Por isso, quando há alteração nos períodos de luz durante o dia, os ritmos celulares também são afetados de forma negativa em sua fisiologia (AKHTAR et al., 2002; PANDA et al., 2003).

Embora o ciclo circadiano seja controlado pelo SNC, o mesmo também é regulado pela ação da melatonina secretada pela glândula pineal, conforme já explicitado. Este ciclo é um mecanismo universal, ocorrendo em todos os vertebrados (STANKOV; REITER, 1990). Possivelmente, o controle do ciclo circadiano por um hormônio, no caso da melatonina, necessita da presença de receptores. Há pelo menos dois receptores de membrana conhecidos para melatonina, MT1 e MT2, que estão

amplamente distribuídos no corpo animal (HARDELAND et al., 2012; SLOMINSKI et al., 2012).

2.5 MECANISMOS DE AÇÃO E RECEPTORES DE MELATONINA:

A melatonina é uma molécula que possui vários mecanismos de ação, pelo fato de ser uma molécula com ampla conservação ao longo da cadeia evolutiva e por deter diversos efeitos endócrinos e parácrinos (SHIDA et al., 1994). A ação da melatonina nas células dos mamíferos, para Macchi e Bruce (2004), pode ocorrer quando a mesma se liga à proteínas intracelulares como a calmodulina ou por sequestro de radicais livres ou por ligações a receptores nucleares da família orphan, bem como por meio de ligação a receptores de melatonina presentes à membrana plasmática.

Várias tentativas de purificação de receptores de membrana para a melatonina foram realizadas com material a partir de fontes consideradas ricas em proteínas receptoras de melatonina (cérebro de lagarto, cérebro de frango, ovelha e rato) sendo todas mal sucedidas. O primeiro receptor de melatonina de alta afinidade isolado com sucesso foi clonado usando uma biblioteca de cDNA construída de melanóforos dérmicos de *Xenopus* e de uma estratégia de clonagem de células mamíferas que expressavam os receptores (Ebisawa et al., 1994). Este cDNA de receptor de melatonina derivado do *Xenopus* codifica uma proteína de 420 aminoácidos com sete regiões transmembranas, consistentes com a classificação deste tipo de receptor dentro da superfamília de receptores acoplados a proteína G (Ebisawa et al., 1994). A Identificação de uma sequência do receptor *Xenopus* permitiu a homologia de métodos de triagem, levando à identificação subsequente de três tipos de receptores de melatonina de vertebrados (Reppert et al. 1996).

De acordo com Aguiar (2002) três subtipos de receptores de melatonina de alta afinidade (Mel_{1a} , Mel_{1b} e Mel_{1c}) foram clonados, sendo o primeiro destes Mel_{1c} isolado a partir de melanóforos de *Xenopus laevis*, logo em seguida foram isolados os subtipos Mel_{1a} , Mel_{1b} em mamíferos. Estes receptores, foram inicialmente, divididos em duas classes e denominados como ML-1 e ML-2, com base em diferentes cinéticas de ligação e de afinidade em ensaios realizados com 2-[125I]-iodo melatonina, entre outros ligantes como Luzindol e 4P-PDOT (TAMURA, 2009).

Os receptores do tipo ML-1 são aqueles com alta afinidade à melatonina e que se caracterizam por ser encontrados em todos os tipos de vertebrados. Eison e Mullins (1993), citam que o primeiro receptor desse tipo foi encontrado na retina de coelhos, mas que também são encontrados nas artérias mesentéricas caudais de ratos, no núcleo supraquiasmático, *pars tuberalis*, entre outras estruturas. Já o ML-2 são receptores de melatonina de baixa afinidade, descritos inicialmente em cérebro de hamster (EISON E MULLINS, 1993) e, posteriormente, em cérebro de galinha por Dubocovich et al. (1995).

Posteriormente esses receptores tiveram suas nomenclaturas mudadas, o receptor ML1 passou a ser dividido em MT1, MT2 e Mel 1c e o receptor ML-2 em MT3. Até o momento em mamíferos são retratados dois tipos de receptores acoplados a proteína G, o MT1 e o MT2. Os receptores de melatonina apresentam estruturas moleculares, localizações cromossômicas e características farmacológicas (SLAUGENHAUPT et al., 1995; REPPERT et al., 1996; DUBOCOVICH et al., 1997). Em relação à estrutura molecular, os receptores MT1 e MT2 possuem 7 hélices transmembranares hidrofóbicas e são formados por grandes cadeias de aminoácidos, apresentando respectivamente 350 e 362 aminoácidos em suas constituições, conferindo aos mesmos um peso molecular de 39 kDa e 40 kDa, respectivamente (SONG et al., 1997; RIVERA-BERMUDEZ et al., 2004; NAVAJAS et al., 1996). Deupi et al. (2007) relatam que ambos os receptores de melatonina pertencem a classe dos receptores acoplados à proteína G e que a homologia de sequencia entre os receptores ocorre principalmente nos domínios transmembranares. Além disso, segundo Petit et al. (1999) esses receptores promovem a inibição da adenililciclase e conseqüentemente a diminuição dos níveis de AMPc.

Os receptores de melatonina MT1 e MT2 já foram identificados no hipotálamo de ratos (WU et al., 2013 LACOSTE et al., 2015) e em outras áreas do cérebro (DREW et al., 2001; LACOSTE et al., 2015; REPPERT et al., 1995). De acordo com Masana et al. (2002), os receptores MT1 são inicialmente encontrados em células de músculo liso vascular, enquanto que os receptores MT2 são encontrados tanto em células endoteliais, quanto em células de musculo liso vascular.

No estudo referente à expressão dos receptores MT1 e MT2 em tecidos de ratos de linhagem Sprague-Dawley, os autores afirmam que os mRNAs dos receptores de melatonina MT1 e MT2 são encontrados no hipotálamo, retina e intestino delgado fígado e nó sinoatrial do coração, sendo expresso abundantemente no hipotálamo (SALLINEN et al., 2005).

De acordo com Ekmekcioglu et al. (2003), no que se refere ao sistema cardiovascular, o receptor MT1 já foi encontrado em artérias coronárias humanas, enquanto que o receptor MT2 foi descrito no coração humano e artérias coronárias e aorta. O receptor MT1 também foi relatado em coração de ratos e em artéria caudal de ratos, respectivamente, por (ABETE et al., 1997) e (VISWANATHAN et al., 1990).

Através de ensaios de ligação com 2- [125 I] iodomelatonina revelados por autorradiografia realizada em cérebro de tartaruga pintada (*Chrysemys picta*), verificou-se que os receptores de melatonina possuem distribuição densa e estão espalhados nas áreas visuais do cérebro e na glândula pineal (LARSON-PRIOR et al., 1996).

Em estudos com ratos da linhagem Long Evans foi verificada a presença dos receptores MT1 disseminados pelo sistema nervoso central (SNC) e parte do quiasma óptico, e quanto aos receptores MT2 não foi identificado a presença deles no SNC (WALY e HALLWORTH, 2015). Estudos realizados por Hunt et al. (2001) com hipotálamo de ratos demonstrou a expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 no SNC por autorradiografia com 2- [125I] iodomelatonina e por hibridização *in situ*.

De acordo com Fujieda et al. (1999) em trabalho referente a expressão de receptor de melatonina MT1 em retina de Ratos Wistar, o receptor MT1 foi localizado imunocitoquimicamente nas camadas plexiforme interna e externa da retina, sendo que em embriões de duas semanas identificou maior marcação na camada externa. Este mesmo autor e Colaboradores, em 2000, identificaram a presença do receptor MT1 em células neuronais da retina de porquinho da índia. Já em estudo com Ratos Sprague-Dawley, Yang et al. (2011) relataram a expressão do receptor de melatonina MT2 nos gânglios e células bipolares da camada nuclear interna da retina.

Estudos feitos na parte tubular da adenohipófise de hamster europeu revelaram através de hibridização *in situ* a expressão do mRNA de MT1 em toda a extensão rostro-caudal (DARDENTE et al., 2003).

Estudando a glândula pituitária de machos e fêmeas de rato Wistar, Klosien et al. (2002) detectaram a expressão do receptor MT1 na pars tuberalis (parte tubular) da hipófise e também identificaram a expressão desse receptor na parte rostral da pars distalis (parte distal) da hipófise.

Utilizando camundongos transgênicos, Adamah-Biassi et al. (2014) relataram a expressão do receptor de melatonina MT1 em diversas regiões do cérebro, incluído o órgão subcomissural, algumas regiões do epêndima que reveste os ventrículos, o hipocampo, o cerebelo, parte tubular da hipófise, a habênula e sua comissura, e

também no aqueduto cerebral. Imbesi et al. (2008) descreveram em cérebro de camundongos, a expressão do receptor MT1 no cerebelo, hipotálamo, gânglios da base, hipocampo e no sistema nervoso central (SNC).

Naji et al. (2004) em estudos com camundongos suíços, utilizando PCR relataram a expressão de receptores de melatonina MT1 no cérebro, fígado e rim, e expressão do receptor MT2 apenas no cérebro. Nesse mesmo estudo, utilizando a técnica de Southern blot foi identificado a presença dos receptores MT1 no coração e pulmão, enquanto que a expressão dos receptores MT2 ficou restrita ao pulmão.

Os receptores de melatonina também são encontrados no sistema imune. Pozo et al. (1997), em estudos com ratos, identificaram a presença do receptor MT1 no timo, baço e também nas células CD4, CD8 e B. Já os receptores MT2 não foram expressos em nenhum destes tipos de células. Estudos realizados em camundongos por CARRILLO-VICO et al. (2003) revelaram a presença de receptores MT1 no timo e no baço e do receptor MT2 apenas no timo.

Silva (2014), no estudo referente à localização do receptor Mel1a em embrião e retinas de *Kinosternon Scorpoides* utilizando imunohistoquímica, relatou que esse receptor está presente em embriões de 21 dias, em regiões da maxila e mandíbula, na íris, no contorno externo do olho, na fissura coroide, no pescoço, nos membros anteriores e posteriores, na carapaça e também na cauda em brotamento. Por meio de autorradiografia, mostrou-se a ligação específica 125I-iodomelatonina no corpo íris-ciliar de coelhos defendendo assim a presença de receptores de melatonina nessa região (OSBORNE e CHDLOW, 1994).

A melatonina possui importante função no desenvolvimento embrionário, principalmente por seus efeitos ligados a apoptose do embrião durante os processos de implantação (DAI et al., 2008). Estas ações estão ligadas aos genes BAX, caspase-3 e Bcl-2, onde a melatonina atua diminuindo a expressão dos dois primeiros, que são genes pró-apoptóticos e aumentando a expressão do Bcl-2 que atua de forma anti-apoptótica nas células embrionárias. O papel antioxidante da melatonina é evidenciado pelo aumento nos níveis de glutathione intracelular, redução da produção de espécies reativas de oxigênio, melhorando os processos que antecedem a implantação, bem como promove a eficiência do processo implantacional (REITER et al., 2009; GAO et al., 2012; MOHSENI et al., 2012). Durante o período de gestação há passagem de melatonina materna para o embrião por meio das trocas placentárias, fazendo com que o ritmo circadiano da melatonina materna esteja ligado à geração dos ritmos circadianos

no feto, como é observado principalmente na glândula adrenal fetal (SIMONNEAUX, 2011). Ligada a esta informação tem-se que a melatonina materna diminui a produção de cortisol na glândula adrenal fetal em uma espécie de macaco (TORRES-FARFAN, 2004) e que em ovelhas esta promove efeitos inibidores sobre as contrações das artérias cerebrais do feto, que são estimuladas pela noradrenalina, também produzido pela adrenal, que além de inibir a liberação de glicerol pelo tecido adiposo multilocular promove a redução da secreção de cortisol pela adrenal fetal (MILLER et al., 2005).

Variações nos níveis de melatonina na circulação materna devido às alterações no período de luz foram relatadas em ovinos (YELLON, 1987) e ratos (DEGUCHI, 1972). De acordo com os autores estas variações podem causar danos consideráveis ao embrião, tendo em vista que o período de implantação embrionária coincide com a expressão dos receptores de melatonina nas espécies mamíferas em geral (SHANG; ZHDANOVA, 2007), especialmente os receptores MT1 e MT2 que atuam por inibição da adenilatociclase (DUBOCOVICH, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a localização e distribuição dos receptores de melatonina em diferentes idades embrionárias de de preá (*Galea spixii* Wagler, 1831).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Descrever a morfologia embrionária do preá, a fim de estabelecer um padrão para a identificação dos receptores de melatonina;
- b) Localizar os receptores de melatonina nas diferentes idades gestacionais por meio da técnica de Imunofluorescência; e
- c) Avaliar a densidade de receptores de melatonina nos diferentes sistemas e em diferentes idades embrionárias (20, 25 e 30 dias) no preá.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM:

O material destinado ao estudo dos receptores de melatonina (MT1 e MT2) em embriões de preá (*Galea spixii* Wagler, 1831) foi obtido do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (Figura 2) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, criado pela portaria ESAM Nº 154/89 em 29 de setembro de 1989 e registrado junto ao IBAMA como criadouro científico sob número 1478912. O mesmo está situado na cidade de Mossoró-RN entre as coordenadas geográficas 5°11'S e 37°20'W Gr, com altitude ao redor de 16 m acima do nível do mar e ocupando uma área de 20 ha. Este possui como objetivo fomentar pesquisas voltadas a preservação e manutenção de espécies silvestres em cativeiro, especialmente daquelas que tenham interesse sócio-econômico.

Previamente às coletas, o projeto foi submetido ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) para aprovação.



Figura 2 - Vistas da entrada do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres.
Fonte: Bezerra (2014).

4.2 ESPÉCIE ESTUDADA

O preá (Figura 3), conhecido como preá do campo nas regiões do seridó e oeste do estado do Rio Grande do Norte, é um pequeno roedor de orelhas pequenas, desprovido de cauda e com peso médio de 500 g e que possui pele com coloração dorsal mesclada de cinza e amarelo. Além disto, circundando a região orbicular do olho observa-se uma discreta faixa de pelos brancos. Suas patas anteriores apresentam quatro dígitos e as posteriores três dígitos (BONVICINO et al., 2008). Possuem hábito terrestre e são ativos em pequenos intervalos do início e final do dia e habitam a caatinga, campos cultivados e lajeiros (STREILEIN, 1982).

Quanto a sua taxonomia o preá foi descrito por Mojem (1952) como pertencente ao:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Mammalia

Ordem: Rodentia

Subordem: Hystricomorpha

Família: Caviidae

Subfamília: Cavinae

Gênero: Galea

Espécie: *Galea spixii*, Wagler, 1831.



Figura 3 - Fotografia do preá: Fonte: Rebouças (2017)

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

Após autorização da execução do projeto pelo ICMBio (SISBIO – 66001-1) e pelo CEUA/UFERSA – 07/2018 foram selecionados aleatoriamente três grupos de preás com três fêmeas e um macho, que foram mantidos em recintos distintos com dimensões de 5 m², onde foram alimentados com ração para roedores da marca (Campestre) contendo (umidade (Máx) 120g/kg, proteína bruta (Min) 140g/kg, extrato etéreo (Min) 20g/kg, fibra bruta (Máx) 200g/kg, cálcio (Máx) 15g/kg, cálcio (Min) 12,75g/kg, matéria mineral (Máx) 140g/kg, fósforo (Mín) 3.000mg/kg, fibra em detergente ácido 150g/kg), frutos, grãos de soja, milho e água *ad libitum*, de modo que cada grupo tivesse o mesmo manejo alimentar.

Para identificação dos animais, as fêmeas foram marcadas com tintura capilar de cor preta (Wella Koleston - Espuma Color Intense - Preto Azulado 28) tingindo diferentes regiões anatômicas: torácica, pélvica, lateral e dorso. Para tanto, cada fêmea recebia uma identificação única de modo a não haver repetições entre os animais de um mesmo grupo.

Identificadas as fêmeas, em cada grupo, foi adicionado um macho de forma a possibilitar a cópula e consequente fecundação. Para que houvesse o controle do dia em que os animais copulavam foram realizadas, diariamente, citologia vaginal.

4.4 CITOLOGIA VAGINAL:

Para identificação do dia em os animais copulavam foi realizado diariamente o exame colpocitológico das fêmeas de cada grupo por meio de esfregaços em lâmina de vidro confeccionados a partir do fluido vaginal coletado por meio de swab estéril. Para isto os animais eram contidos manualmente, higienizados na região vulvar com auxílio de algodão embebido em solução salina 0,9% e swabs lubrificados na mesma solução, que eram introduzidos na vagina do animal em um ângulo de mais ou menos 45° seguido de movimentos circulares por toda a vagina de modo a coletar o fluido vaginal.

Após a coleta o material era distendido em lâmina de vidro e seco à temperatura ambiente. Em seguida era submetido a procedimento de coloração com a utilização do corante panótico rápido Instant-Prov (New Prov®) de acordo com as recomendações preconizadas pelo fabricante. Já coradas e secas as lâminas eram analisadas, quanto à

presença de espermatozoides, com o auxílio de microscópio de luz (Olympus CX 31 RBSFA).

Confirmada a presença de sêmen nas lâminas as fêmeas eram separadas do grupo, a fim de evitar erros na estimativa das idades de gestações caso as fêmeas viessem a repetir cio assim como descrito por Bezerra (2014). Foi considerado o dia zero da gestação aquele em que identificou-se a presença de espermatozoides ao exame das amostras colpocitológicas (Figura 4). Após, 15 dias da identificação da presença de espermatozoide nos esfregaços dos animais eram então realizado exame de palpação nos animais, para constatação da gestação.

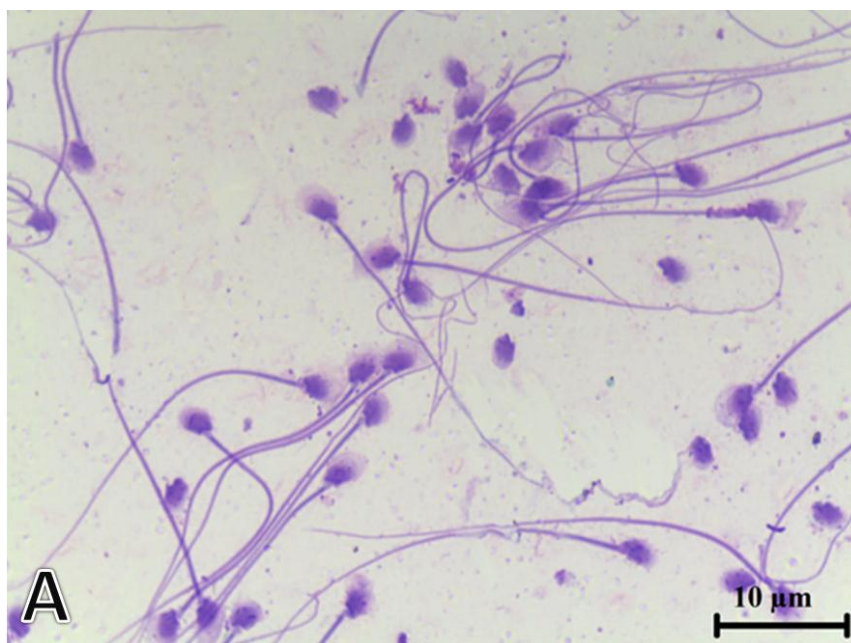


Figura 4 - Confirmação da cópula pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Após 24 horas, considerava-se o primeiro dia de gestação. Em A, espermatozoides de préa. Objetiva de 100X. Barra = 10 μ m

4.5 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO:

Os animais eram separados e no dia anterior a coleta eram submetidos a jejum sólido de doze horas e líquido de seis horas. No momento da coleta os animais eram pesados e submetidos a procedimento anestésico. Para tanto, era administrado como medicação pré-anestésica a associação de cloridrato de xilazina (Xilazin[®] 2% na dose de 1mg.Kg⁻¹, fabricante Syntec) e cloridrato de cetamina (Quetamina[®] 10% na dose de 15mg.Kg⁻¹, fabricante Vetnil) ambos por via intramuscular, após espera de tempo hábil

(10min.) era administrado o anestésico tiopental 1g (Tiopental sódico[®] 1g na dose de 25mg.Kg⁻¹, fabricante Richmond, DivisiónVeterinaria S.A.) por via endovenosa como fármaco indutor da anestesia. Atingido o plano anestésico seguia-se com a administração de Cloreto de Potássio (Cloreto de potássio[®] 19,1% na dose de 2,56 mEq.Kg⁻¹, fabricante Halexistar) também por via endovenosa, confirmando-se o óbito do animal após identificada parada cardiorrespiratória (BEZERRA, 2014).

4.6 COLETA DO MATERIAL:

Após óbito do animal era realizada uma incisão longitudinal mediana pós-umbilical, de modo a expor o útero gravídico, que era então seccionado para retirada dos sacos gestacionais e posterior coleta de embriões.

As coletas dos embriões foram realizadas considerando-se os dias 20, 25 e 30 dias de gestação para o preá. Foram coletados três embriões por idade gestacional, sendo estes destinados a processamento para microscopia de luz convencional e imunofluorescência.

De cada embrião coletado foram obtidas secções medianas com o intuito de diminuir a área a ser processada e concentrar ao máximo nas regiões de interesses. Estas secções eram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponado com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4, quando destinados a processamento de microscopia de luz e reações de imunofluorescência.

4.7 MICROSCOPIA DE LUZ:

As amostras foram processadas no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada da UFERSA, utilizando-se a metodologia descrita por Tolosa et al. (2003), adaptando-a quando necessário devido a natureza do material.

Os embriões foram fixados por 48 h em solução de paraformaldeído 4% tamponado com solução de fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 e em seguida foram lavados em água corrente para retirada do excesso do fixador e submetidos ao processo de desidratação, sendo imersas em álcoois com concentrações crescentes, variando de 60 a 100%, por um período de uma hora em cada álcool. Após a desidratação, o material foi diafanizado. Para tanto, o material foi imerso em dois banhos de xilol (Xileno P.A. –

ACS; DINAMICA®) por uma hora cada e em seguida foi realizada a parafinização (inclusão) das amostras, eram imersas em dois banhos de parafina histológica (Synt®, granulada com ponto de fusão 58°C a 62°C, lote: 138199) em estufa a temperatura de 60°C, sendo o primeiro banho com duração de uma hora e o segundo por um período de doze horas, em parafinas distintas. Após esta parafinização, as amostras foram incluídas em uma nova parafina para confecção dos blocos.

Finalizada a parafinização e após completa solidificação da parafina foram obtidos cortes de cinco micrometros (5µ) de espessura (Micrótomo LEICA RM 2125 RT), que eram coletados em lâminas de vidro e levados a estufa a 60°C por até doze horas para desparafinização e aderência às lâminas. Posteriormente, as secções histológicas foram imersas em dois banhos de xilol por dez minutos cada, reidratadas em álcool (100%, 95%, 70%), durante três minutos em cada álcool e em seguida em água corrente, de modo a garantir total reidratação. Por último, as secções foram coradas segundo técnicas para Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas com Permount® (FISH-SP15-500). Finalmente, o material foi analisado e as imagens mais representativas foram fotomicrografadas em microscópio óptico (Olympus CX 31 RBSFA) com câmera acoplada (Leica ICC50 HD).

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA:

Para realização da técnica de imunofluorescência cortes de 5 µm de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (STAR FROST®) e levados a estufa a 60 °C por 12 horas, após esse período o material foi desparafinado em xilol, sendo imersos em três banhos de cinco minutos em cada em xilol (Xileno P.A. – ACS; DINAMICA®) e hidratado em álcool, sendo dois banhos em álcool 100% e dois banhos em álcool 90% todos com duração de quinze minutos, e em seguida em água deionizada por um minuto, sob agitação.

Realizada a hidratação, o excesso de líquido foi aspirado dos cortes seguindo-se a etapa da recuperação antigênica. Para tanto, os cortes histológicos foram submetidos a tratamento térmico em aparelho de micro-ondas (Eletrolux®, MEF-28) em potência máxima (60 Hz) com as lâminas imersas em tampão citrato 10 mM e pH 6.0, durante 10 min. Na sequência, com o material já em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas três vezes em água deionizada durante dois minutos cada em

lavagem para então, após aspiração do excesso de líquido dos cortes, realizar-se o bloqueio das ligações inespecíficas incubando as amostras com UltraCruz® Blocking Reagent (sc-516214) por 30 min em câmara úmida.

Passados 30 minutos as secções foram lavadas três vezes em PBS 0.1M e pH 7.2, durante cinco minutos cada lavagem, após aspirado o excesso de líquido foram incubadas com o anticorpo primário (MEL-1A/B-R (B-8): sc-398788) durante 12 horas em câmara úmida a 4 °C. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS 0.1M e pH 7.2 durante cinco minutos para cada lavagem e, após aspirado o excesso de líquido e foi realizada a incubação com anticorpo secundário ligado ao fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (m-IgGκ BP-FITC: sc-516140) por uma hora em câmara úmida. Por fim, as secções foram lavadas novamente em PBS conforme descrito anteriormente e em seguida foram montadas utilizando UltraCruz® Mounting Medium (sc-24941).

Para visualizar os fluorocromos, o tecido embrionário imunomarcado foi examinado com um sistema captador de imagens acoplado a microscópio apropriado (Olympus BX51). As regiões anatômicas de interesse foram escolhidas aleatoriamente para inspeção. De cada idade gestacional foram analisados três embriões. As imagens de 2048 x 2048 pixels foram registradas usando objetiva de imersão de óleo de 40x e 100x e um fator de zoom constante de 1. As configurações para a aquisição de imagem pelo programa de contagem de fótons eram constantes e usadas para obtenção de imagens da imunorreatividade do receptor de melatonina e a correspondente rotulação hormonal da mesma seção.

A avaliação semi-quantitativa da série de imagens foi realizada com o software de análise de imagem Fiji. Para análise, a marcação hormonal das células foi definido um limiar automático e ou um filtro médio de 5 pixels. Por um operador automatizado, as partículas foram localizadas na imagem binária e a coloração hormonal livre de demarcação dos núcleos foi determinada como regiões de interesse. A intensidade média de fluorescência da marcação do receptor de melatonina foi medida nestas regiões de interesse definidas para ter um indicador indireto para a densidade de receptores de melatonina. Os valores médios determinados pela coloração do receptor nas diferentes idades gestacionais foram analisados estatisticamente.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram analisados estatisticamente e expressos em média $\pm$ desvio padrão e avaliados pelo programa estatístico SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc®) versão 12.0. Todos os dados foram primariamente avaliados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e homocedasticidade, por Levene. Para evidenciar a diferença estatística entre os grupos experimentais, quando os dados foram paramétricos, utilizou-se o teste t para medidas independentes e Mann-Whitney quando não paramétricos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

REFERÊNCIAS

- ABETE, P., BIANCO, S., CALABRESE, C., NAPOLI, C., CACCIATORE, F., FERRARA, N, RENGO, F. Effect of melatonin in isolated rat papillary muscle. **FEBS Letters**. 1997; 412: 79-85.
- ADAMAH-BIASSI, E. B., ZHANG, Y., JUNG, H., VISSAPRAGADA, S., MILLER, R. J., DUBOCOVICH, M. L. Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 1, p. 70-84, 2014.
- AGUIAR, L. M. V. A. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos da melatonina em ratos submetidos à lesão estriatal com 6-ohda**. 2002. 167 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2002.
- AKHTAR, R. A., REDDY, A. B., MAYWOOD, E. S., CLAYTON, J. D., KING, V. M., SMITH, A.G., GANT, T.W., HASTINGS, M.H., KYRIACOU, C. P. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. **Current Biology**. 12, 540-550, 2002.
- ARENDT, J., DEACON, S., ENGLISH, J., HAMPTON, S., MORGAN, L. Melatonin and adjustment to phase shift. **Journal of sleep research**, v. 4, n. s2, p. 74-79, 1995.
- BEZERRA, F. V. F. **A subplacenta do préa *Galea spixii* Wagler, 1831**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Universidade Federal Rural do Semi-Árido/ Pró-reitoria de Pós-Graduação, 2014.
- BONVICINO, C. R., OLIVEIRA, J. A., D'ANDREA, P. S. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS**, v. 120, 2008.
- BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans. **New England journal of medicine**, v. 336, n. 3, p. 186-195, 1997.

CARLETON, M. D., MUSSER, G. G.; WILSON, D. E., REEDER, D. M. **Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference**. 3ª edição. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2:745–752, 2005.

CARRILLO-VICO, A., GARCIA-PERGANEDA, A., NAJI, L., CALVO JR, ROMERO, M. P., GUERRERO, J. M. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 10, p. 2272-2278, 2003.

CATZEFLIS, F., PATTON J., PERCEQUILLO, A., WEKSLER, M. Galea spixii. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T8825A22189453. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T8825A22189453.en>. Downloaded on 30 July 2019.

CHAKIR, I., DUMONT, S., PÉVET, P., OUAROOUR, A., CHALLET, E., VUILLEZ, P. Pineal melatonin is a circadian time-giver for leptin rhythm in Syrian hamsters. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 190, 2015.

CLAUSTRAT, B., BRUN, J; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep medicine reviews**, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

CRUZ, M. H. C. **Efeito da melatonina sobre a viabilidade e expressão gênica de oócitos suínos e células do cumulus maturados in vitro**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DAI, M., CUI, P., YU, M., HAN, J., LI, H., XIU, R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. **Journal of pineal research**, v. 44, n. 2, p. 121-126, 2008.

DARDENTE, H., MENET, J. S., POIREL, V. J., STREICHER, D., GAUER, F., VIVIEN-ROELS, B., & MASSON-PEVET, M. Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. **Molecular brain research**, v. 114, n. 2, p. 101-106, 2003.

DEGUCHI, T. A. J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. **Analytical biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 174-179, 1972.

DEUPI, X., DOLKER, N., LUZ LOPEZ-RODRIGUEZ, M., CAMPILLO, M., BALLESTEROS, J. A., PARDO, L. Structural models of class AG protein-coupled receptors as a tool for drug design: insights on transmembrane bundle plasticity. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 10, p. 991-998, 2007.

DREW, J. E., BARRETT, P., MERCER, J. G., MOAR, K. M., CANET, E., DELAGRANGE, P., MORGAN, P. J. Localization of the melatonin- related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. **Journal of neuroendocrinology**, v. 13, n. 5, p. 453-458, 2001.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. **Trends in pharmacological sciences**, v. 16, n. 2, p. 50-56, 1995.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. **Sleep medicine**, v. 8, p. 34-42, 2007.

DUBOCOVICH, M. L., MARKOWSKA, M. Receptores funcionais de melatonina MT 1 e MT 2 em mamíferos. **Endócrino** , v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.

DUBOCOVICH, M. L., MASANA, M. I., IACOB, S., SAURI, D. M. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 355, n. 3, p. 365-375, 1997.

EBISAWA, T., KARNE, S., LERNER, M. R., REPPERT, S. M. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 13, p. 6133-6137, 1994.

EISENBERG, J. F., & REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics**, Volume 3: Ecuador, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, 1989.

EISON, A. S; MULLINS, U. L. Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. **Life sciences**, v. 53, n. 24, p. PL393-PL398, 1993.

EKMEKCIOGLU, C., THALHAMMER, T., HUMPELER, S., MEHRABI, M. R., GLOGAR, H. D., HÖLZENBEIN, T & MARKTL, W. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. **J Pineal Res.** 2003; 35: 40-44.

FUJIEDA, H., HAMADANIZADEH, S. A., WANKIEWICZ, E., PANG, S. F., BROWN, G. M. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. **Neuroscience**, v. 93, n. 2, p. 793-799, 1999.

FUJIEDA, H., SCHER, J., HAMADANIZADEH, S. A., WANKIEWICZ, E., PANG, S. F., BROWN, G. M. Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: Immunocytochemical study of mt 1 melatonin receptor in guinea pig retina. **Visual neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 63-70, 2000.

GAO, C., HAN, H. B., TIAN, X. Z., TAN, D. X., WANG, L., ZHOU, G. B., LIU, G. S. Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. **Journal of pineal research**, v. 52, n. 3, p. 305-311, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica: Elsevier Brasil. 2006.

HARDELAND, R., CARDINALI, D. P., SRINIVASAN, V., SPENCE, D. W., BROWN, G. M., PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, 2011.

HARDELAND, R., MADRID, J. A., TAN, D. X., REITER, R. J. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. **Journal of pineal research**, v.52, n. 2, p. 139-166, 2012.

HIRIART, B. M., MORFFIS, Y. S., TORRES, K. U., MICHE, L. Y. D. T., SOSA, J. L. B. Hormona de la oscuridad. *Rev latinoamer patol clinica*. 2012; 59:222-232.

HUNT, A. E., AL-GHOUL, W. M., GILLETTE, M. U., DUBOCOVICH, M. L. Activation of MT2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n. 1, p. C110-C118, 2001.

IMBESI, M., UZ, T., DZITOYEVA, S., GIUSTI, P., MANEV, H. Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. **Brain research**, v. 1227, p. 19-25, 2008.

IRITI, M., VARONI, E. M., & VITALINI, S. Melatonin in traditional Mediterranean diets. **Journal of pineal research**, v. 49, n. 2, p. 101-105, 2010.

JUNG- HYNES, B., REITER, R. J., AHMAD, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. **Journal of pineal research**, v. 48, n. 1, p. 9-19, 2010.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. Basic Histology: Text & Atlas. 10th ed. Lange Medical Books Mc Graw-Hill, 2003.

KLOSEN, P., BIENVENU, C., DEMARTEAU, O., DARDENTE, H., GUERRERO, H., PÉVET, P., MASSON-PEVET, M. The mt1 melatonin receptor and ROR β receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 12, p. 1647-1657, 2002.

LACOSTE, B., ANGELONI, D., DOMINGUEZ- LOPEZ, S., CALDERONI, S., MAURO, A., FRASCHINI, F., GOBBI, G. Anatomical and cellular localization of melatonin MT 1 and MT 2 receptors in the adult rat brain. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 4, p. 397-417, 2015.

LARSON-PRIOR, L. J., SIUCIAK, J. A., DUBOCOVICH, M. L. Localization of 2-[125I] iodomelatonin binding sites in visual areas of the turtle brain. **European journal of pharmacology**, v. 297, n. 1-2, p. 181-185, 1996.

LERNER, A. B., CASE, J. D., TAKAHASHI, Y., LEE, T. H., MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.

MACCHI, M. M., & BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in neuroendocrinology*, v. 25, n. 3-4, p. 177-195, 2004.

MASANA, M. I., DOOLEN, S., ERSAHIN, C., AL-GHOUL, W. M., DUCKLES, S. P., DUBOCOVICH, M. L., & KRAUSE, D. N. MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. **J Pharmacol Exp Ther**. 2002; 302: 1295- 1302.

MENDES, B. V. **Plantas e animais para o Nordeste**. Rio de Janeiro: Globo, 1987. 167p.

MILLER, S. L., YAN, E. B., CASTILLO-MELÉNDEZ, M., JENKIN, G., WALKER, D. W. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. **Developmental neuroscience**, v. 27, n. 2-4, p. 200-210, 2005.

MOHSENI, M., MIHANDOOST, E., SHIRAZI, A., SEPEHRIZADEH, Z., BAZZAZ, J. T., GHAZI-KHANSARI, M. Melatonin may play a role in modulation of bax and bcl-2 expression levels to protect rat peripheral blood lymphocytes from gamma irradiation-induced apoptosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 738, p. 19-27, 2012.

MOOJEN, J., MOOJEN, J., SALVADO, S. **Os Roedores do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Livro, 1952.

MOLLER, M., & BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell and tissue research*, v. 309, n. 1, p. 139-150, 2002.

NAJI, L., CARRILLO-VICO, A., GUERRERO, J. M., CALVO, J. R. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. **Life sciences**, v. 74, n. 18, p. 2227-2236, 2004.

NAVAJAS, C., KOKKOLA, T., POSO, A., HONKA, N., GYNTHNER, J., LAITINEN, J. T. A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. **European journal of pharmacology**, v. 304, n. 1-3, p. 173-183, 1996.

NETO, J. A. S., e DE CASTRO, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. **Ver Bras Neurol**, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2008.

OLIVEIRA, G. B., RODRIGUES, M. N., SOUSA, E. S., ALBUQUERQUE, J. F. G., MOURA, C. E. B., AMBRÓSIO, C. E., MIGLINO, M. A. & OLIVEIRA, M. F. Origem e distribuição dos nervos isquiáticos do preá. **Ciência Rural**, 2010, 40.8: 1741-1745.

OLIVEIRA, M. F., MESS, A., AMBRÓSIO, C. E., DANTAS, C. A., FAVARON, P. O., MIGLINO, M. A. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 39, 2008.

OSBORNE, N. N., CHIDLOW, G. The presence of functional melatonin receptors in the iris-ciliary processes of the rabbit eye. **Experimental eye research**, v. 59, n. 1, p. 3-9, 1994.

PANDA, S., PROVENCIO, I., TU, D. C., PIRES, S. S., ROLLAG, M. D., CASTRUCCI, A. M., Kay, S. A. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. **Science**, v. 301, n. 5632, p. 525-527, 2003.

PARADIES, G., PETROSILLO, G., PARADIES, V., REITER, R. J., RUGGIERO, F. M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **Journal of pineal research**, v. 48, n. 4, p. 297-310, 2010.

PERCEQUILO, A. R.; SANTOS, K. R. P.; CAMPOS, B. A. T. P.; SANTOS, R. G.; TOLEDO, G. A. C.; LANGGUTH, A. Mamíferos dos remanescentes florestais de João Pessoa, Paraíba. **Biologia Geral e Experimental**, v. 7, n. 2, p. 17-31, 2007.

PETIT, L., LACROIX, I., DE COPPET, P., STROSBURG, A. D., JOCKERS, R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 633-639, 1999.

PÉVET, P. Melatonin: From seasonal to circadian signal. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 4, p. 422-426, 2003.

PINHEIRO, M. J. P.; ANDRADE, S. A.; CUNHA, J. N. Preservação e exploração de animais silvestres nativos: preá, cutia e mocó. **Revista Caatinga**, v. 6, n. 1, p. 28-49, 2002.

PONTES, G. N., CARDOSO, E. C., CARNEIRO- SAMPAIO, M. M., MARKUS, R. P. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes)-melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of pineal research**, v. 41, n. 2, p. 136-141, 2006.

POZO, D. A. V. I. D., DELGADO, M., FERNANDEZ-SANTOS, J. M., CALVO, J. R., GOMARIZ, R. P., MARTIN-LACAVE, I., GUERRERO, J. M. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. **The FASEB journal**, v. 11, n. 6, p. 466-473, 1997.

REITER, R. J. Melatonin and human reproduction. **J Pineal Res**, 38:217-22, 2005.

REITER, R., ROSALES-CORRAL, S., MANCHESTER, L., TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 4, p. 7231-7272, 2013.

REPERT, S. M., WEAVER, D. R., GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends in pharmacological sciences**, v. 17, n. 3, p. 100-102, 1996.

REPERT, S. M., GODSON, C., MAHLE, C. D., WEAVER, D. R., SLAUGENHAUPT, S. A., GUSELLA, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 19, p. 8734-8738, 1995.

RIGGS, S. M. Guinea Pigs. In: MITCHELL, M.A.; TULLY Jr., T.N. Manual of Exotic Pet Practice. 1º edição. Missouri: Editora Saunders Elsevier, cap.17, p.456-468, 2009.

RIVERA-BERMUDEZ, M. A., MASANA, M. I., BROWN, G. M., EARNEST, D. J., DUBOCOVICH, M. L. Immortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express functional melatonin receptors. **Brain research**, v. 1002, n. 1-2, p. 21-27, 2004.

SALLINEN, P., SAARELA, S., ILVES, M., VAKKURI, O., LEPPÄLUOTO, J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. **Life sciences**, v. 76, n. 10, p. 1123-1134, 2005.

SANTOS, P. R., OLIVEIRA, M. F., SILVA, A. R., CAMARGO, C. M. O., ASSIS NETO, A. C. A microestrutura e o desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de preás (*Galea spixii*) criados em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 84-90, 2012.

SAPER, C. B. The central circadian timing system. **Current opinion in neurobiology**, v. 23, n. 5, p. 747-751, 2013.

SHANG, E. H.; ZHDANOVA, I. V. The circadian system is a target and modulator of prenatal cocaine effects. **Plo S one**, v. 2, n. 7, p. e587, 2007.

SHIDA, C. S., CASTRUCCI, A. M. D. L., & LAMY- FREUND, M. T. High melatonin solubility in aqueous medium. **Journal of pineal research**, v. 16, n. 4, p. 198-201, 1994.

SILVA, R. N. Localização do receptor de melatonina Mel1a e da enzima NRH: quinona redutase 2 em embrião e retinas inteiros de *Kinosternon scorpioides*. 2014.

SIMONNEAUX, V. Naughty melatonin: how mothers tick off their fetus. **Endocrinology**, V 152, n 5, P. 1734–1738, 2011.

SIMPSON, G. G. The principles of classification and a classification of mammals. **Bull. Amer. Museum Nat. History.**, v. 85, 1945.

SLAT, E., FREEMAN, G.M., HERZOQ, E.D. The clock in the brain: neurons, glia, and networks in daily rhythms. **Circadian clocks**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. P. 105-123.

SLAUGENHAUPT, S. A., ROCA, A. L., LIEBERT, C. B., ALTHERR, M. R., GUSELLA, J. F., REPPERT, S. M. Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). **Genomics**, v. 27, n. 2, p. 355-357, 1995.

SLOMINSKI, R. M., REITER, R. J., SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. OSTROM, R. S., SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Molecular and cellular endocrinology**, 351, 2, 152-166, 2012.

SOARES, J. M., MASANA, M. I., ERŞAHIN, Ç., DUBOCOVICH, M. L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 306, p.: 694-702, 2003.

STANKOV, B., REITER, R., J. Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses. **Life sciences**, v. 46, n. 14, p. 971-982, 1990.

STEHLE, J. H.; SAADE, A.; RAWASHDEH, O.; ACKERMANN, K.; JILG, A.; SEBESTÉNY, T., MARONDE, E. A survey of molecular details in the human pineal

gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **J. Pineal Res.**, 51(1):17-43, 2011.

STREILEIN, K. E. **Ecology of small mammals in the semiarid Brazilian Caatinga.** Carnegie Museum of Natural History, 1982.

TAMURA, E. K. **Efeito da melatonina sobre a produção endotelial de óxido nítrico in vitro e in vivo.** 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TOLOSA, E. M., RODRIGUES, C. J., BEHMER, O. A., FREITAS-NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **1ª edição, São Paulo: Edição Manole**, v. 2, 2003.

TORRES-FARFAN, C., RICHTER, H. G., GERMAIN, A. M., VALENZUELA, G. J., CAMPINO, C., ROJAS-GARCÍA, P., SERÓN-FERRÉ, M. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. **The Journal of physiology**, v. 554, n. 3, p. 841-856, 2004.

TOSINI, G., BABA, K., HWANG, C. K., & IUVONE, P. M. Melatonin: An unappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. **Experimental Eye Research**, v. 103, p. 82–89, 2012.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 687-721, 1998.

VOLLRATH, L. Mammalian pinealocytes: ultrastructural aspects and innervation. In: EVERED, D.; CLARK, S. **Photoperiodism, melatonin and the pineal.** London: Pittman, 1985. p. 9-22.

VISWANATHAN, M., LAITINEN, J. T., SAAVEDRA, J. M. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. **Proc Natl Acad Sci USA**, p. 6200-6203. 1990.

WALY, N. E., & HALLWORTH, R. Circadian pattern of melatonin MT1 and MT2 receptor localization in the rat suprachiasmatic nucleus. **Journal of circadian rhythms**, v. 13, 2015.

WEAVER, D. R.; REPPERT, S. M. Maternal melatonin communicates daylength to the fetus in Djungarian hamsters. **Endocrinology**, v. 119, n. 6, p. 2861-2863, 1986.

WIECHMANN, A. F. Melatonin : Pineal Gland and Retina in Pineal. **Experimental Eye Research**, n. 42, p. 507–527, 1986.

WILSON, D. E., & REEDER, D. M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. **JHU Press**, V. 1, 2005.

WU, Y.H., URSINUS, J., ZHOU, J.N., SCHEER, F.A., AI-MIN, B., JOCKERS, R., VAN HEERIKHUIZE, J., SWAAB, D.F. Alterations of melatonin receptors MT1 and MT2 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus during depression. **Journal of affective disorders**, v. 148, n. 2-3, p. 357-367, 2013.

YANG, X. F., MIAO, Y., PING, Y., WU, H. J., YANG, X. L., WANG, Z. Melatonin inhibits tetraethylammonium-sensitive potassium channels of rod ON type bipolar cells via MT2 receptors in rat retina. **Neuroscience**, v. 173, p. 19-29, 2011.

YELLON, STEVEN M.; LONGO, L. D. Melatonin rhythms in fetal and maternal circulation during pregnancy in sheep. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 252, n. 6, p. E799-E802, 1987.

5 CAPÍTULO 1- LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA EM DIFERENTES IDADES EMBRIONÁRIAS DE PREÁ (*GALEA SPIXII* WAGLER, 1831)

Localização e Distribuição dos Receptores de Melatonina em diferentes idades embrionárias de Preá (*Galea spixii* Wagler, 1831)

Location and distribution of melatonin receptors at different embryonic ages of Prea
(*Galea spixii* Wagler, 1831)

Paulo Mateus Alves Lopes¹, Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra¹, Igor Renno Guimaraes Lopes¹, Radan Elvis Matias de Oliveira¹, Carlos Eduardo Vale Rebouças¹, Hélio Noberto de Araújo Júnior¹, Joao Vitor de Oliveira Gurgel¹, Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa¹, Moises Dantas Tertulino¹ Moacir Franco de Oliveira¹

Article based on a dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Master's Degree. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Mossoró, RN, Brazil. 1 Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró. CORRESPONDENCE: P.M.A. LOPES [paulomateusalveslopes@hotmail.com - Tel.: +55 (85) 33481368]. Centro de Ciências Agrárias - UFERSA. Av. Francisco Mota n. 572. Bairro Costa e Silva. CEP 59.625-900 Mossoró, RN, Brazil.

ABSTRACT

Background: Wild animal research provides support for the preservation of species and their maintenance in captivity, as it generates data for taking measures to increase the chances of survival of these animals. Melatonin is very important for development because it acts to control embryonic cell apoptosis, inhibiting the expression of proapoptotic genes and increasing the expression of embryonic anti-apoptotic genes. Several studies on the morphology of cavities have been performed, but none cite melatonin receptors in embryos of this species.

Materials, Methods & Results: To develop this study, 9 adult female prey were used, with which three groups with three females were obtained, obtained from the Center for

Wild Animals Multiplication of the Federal Rural University of Semi-Arid (CEMAS / UFERSA). For experimentation, the animals were euthanized following the recommended rodent protocol, after approval by ICMBio and CEUA. Embryo collections were performed at 20, 25, 30 days of gestation, and three embryos were collected by gestational age. These embryos were destined for processing for light microscopy and immunofluorescence. In all the studied organs, brain, lung, heart, liver, kidney, markings were observed for MT1 and MT2 melatonin receptors, presenting markings of different intensities between gestational ages and between organs. Regarding the brain, the different structures that compose it were marked, and the structure that presented the highest mark for melatonin receptors was the choroid plexus. Regarding the lung, it was observed that the labeling of melatonin receptors occurred mainly in the bronchi and bronchioles. As for the heart, the myocardium was the region in which there was greater labeling of melatonin receptors, but diffusely. In the liver the marking was intense at all gestational ages and the cells that had the highest marking were the hepatocytes. In the kidney, regardless of gestational age, the tubular region presented the highest intensity of marking. Regarding the immunofluorescent labeling density of melatonin receptors in the cavy embryos, it was observed that in organs such as brain, heart and kidney there was a significant variation in receptor density when comparing the different gestational ages evaluated, already in the liver and lung no significant difference was observed between ages.

Discussion: Melatonin receptors were distributed in all organs studied at different gestational ages. As already described by other authors in the brain region, melatonin receptors in brain encephalons also showed wide distribution. In the heart its wide distribution may be related to the protective function of this hormone on the cardiac muscles. In the liver, the receptors were labeled more intensively, and the presence of

these receptors in the liver of mice has also been reported. Similar to that observed in guinea pig kidney, receptor labeling in the tubular region of the kidney also occurred in advance, with receptor labeling in the proximal tubules. Regarding the density of melatonin receptors, differences in labeling density were observed between gestational ages, and this difference was related to metabolic needs in different cell groups.

Keywords: Immunofluorescence, Morphology, Microscopy, Organs, Rodents.

Descritores: Imunofluorescência, Morfologia, Microscopia, Órgãos, Roedores.

INTRODUÇÃO

O preá (*Galea spixii*) é um roedor pertencente à subordem Hystricomorpha, família Caviidae e subfamília Cavinae. Possui orelhas pequenas, ausência de caudas e possui uma coloração dorsal mesclada de cinza com amarela [3]. Vale salientar, sobre esse animal, que o mesmo possui características biológicas favoráveis à domesticação, como a reprodução em cativeiro, hábito gregário, poligamia e prolificidade, além de possuir uma carne saborosa, apreciada por parte da população sertaneja [8,10].

A melatonina é um hormônio produzidos em vários locais no organismo animal dos quais podemos mencionar, trato gastrointestinal, olho, testículos, ovários, e em maior parte sua produção é de origem da pineal [15]. Esse hormônio é fundamental na regulação do ciclo circadiano, no desenvolvimento embrionário, no envelhecimento, na fisiologia gastrointestinal, do sistema imune, no metabolismo dos lipídeos e carboidratos, e do sistema cardiovascular [6]. As ações fisiológicas da melatonina são mediadas pela estimulação de dois receptores acoplados à proteína G de alta afinidade, MT1 e MT2 [5].

Assim, considerando a importância científica e também considerando a escassez de informações sobre melatonina no preá e diante da importância desta e de seus receptores, durante o desenvolvimento embrionário, tanto no que se refere ao sucesso implantacional quanto ao desenvolvimento dos órgãos em relação ao ciclo circadiano materno e ainda sobre as características reprodutivas do preá, cujo conhecimento da fisiologia do preá pode potencializar pesquisas para que este se torne modelo experimental, objetivou-se então, avaliar a localização e distribuição dos receptores de melatonina em diferentes idades embrionárias de preá (*Galea spixii* Wagler, 1831), assim como, descrever a morfologia de alguns órgãos para estabelecer um padrão para identificação dos receptores de melatonina e também avaliar densidade desses receptores em diferentes sistemas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O material para o presente estudo foi proveniente do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, licenciado junto ao IBAMA como criadouro científico (Registro nº 1478912). Foram utilizados 9 preás fêmeas adultas, na qual foram divididas em grupos de 3 animais, formando assim 3 grupos. Em cada grupo foi adicionado um macho para que houvesse a cópula e consequente ficassem gestantes. Foi realizado citologia vaginal para diagnosticar o dia da cópula, e foi considerado o dia zero da gestação aquele em que identificou-se a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais conforme processo nº 23091. 0131160/2018-90.

Procedimento anestésico e Coleta do Material

O material destinado ao estudo dos receptores de melatonina foi coletado em diferentes idades gestacionais, aos 20, 25 e 30 dias de gestação. Para isso os animais foram submetidos a jejum sólido e líquido, pesados e pré-medicados com a associação de cloridrato de xilazina¹ (1mg.kg⁻¹) e cetamina² (15mg.kg⁻¹) seguida da indução anestésica com tiopental sódico (25mg.kg⁻¹)³ e administração de cloreto de potássio⁴ 2,56mEq.kg⁻¹ ambos por via intravenosa. Constatada a morte do animal, realizou-se uma incisão longitudinal mediana pós-umbilical, de modo a expor o útero gravídico, que era então seccionado para retirada dos sacos gestacionais e posterior coleta de embriões

Microscopia de Luz

Os fragmentos coletados foram processados no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada da UFERSA, onde as amostras destinadas a microscopia de luz foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponado por 48h e transferidos para uma série de concentrações crescentes de álcoois (70-100%). Posteriormente, foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Synt®, granulada com ponto de fusão 58°C a 62°C, lote: 138199). O material foi cortado em cinco micrometros (5µ). Por fim foram corados segundo a técnica de hematoxilina e eosina (HE), sendo as imagens mais representativas fotomicrografadas em microscópio óptico (Leica ICC50 HD).

Imunofluorescência

Para a identificação dos receptores de melatonina em preás realizou-se imunofluorescência em cortes de 5 µm de espessura foram aderidos a lâminas silanizadas (STAR FROST®) na sequência removeu-se a parafina e reidratou-se os cortes para a realização da recuperação antigênica por tratamento térmico em aparelho de micro-ondas (Eletrolux® MEF-28) com as lâminas imersas em tampão citrato 10

mM e pH 6.0, durante 10 min. Na sequência, realizou-se bloqueio das ligações inespecíficas incubando as amostras com UltraCruz® Blocking Reagent (sc-516214) por 30 min em câmara úmida. Para então incubar com o anticorpo primário (MEL-1A/B-R (B-8): sc-398788)⁵ — 12 horas em câmara úmida a 4 °C. No dia seguinte, era realizada a incubação com anticorpo secundário⁶ ligado ao fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (m-IgGκ BP-FITC: sc-516140) por uma hora em câmara úmida e por fim, as lâminas eram montadas utilizando UltraCruz® Mounting Medium (sc-24941) e analisadas em microscópio para fluorescência (Olympus BX51). As imagens de 2048 x 2048 pixels foram registradas. A avaliação semi-quantitativa da série de imagens foi realizada com o software de análise de imagem Fiji. Para análise, a marcação hormonal das células foi definido um limiar automático e ou um filtro médio de 5 pixels. Por um operador automatizado, as partículas foram localizadas na imagem binária e a coloração hormonal livre de demarcação dos núcleos foi determinada como regiões de interesse. A intensidade média de fluorescência da marcação do receptor de melatonina foi medida nestas regiões de interesse definidas para ter um indicador indireto para a densidade de receptores de melatonina. Os valores médios determinados pela coloração do receptor nas diferentes idades gestacionais foram analisados estatisticamente.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente e expressos em média $\pm$ desvio padrão e avaliados pelo programa estatístico SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc®) versão 12.0. Todos os dados foram primariamente avaliados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e homocedasticidade, por Levene. Para evidenciar a diferença estatística entre os grupos experimentais, quando os dados foram paramétricos, utilizou-se o teste t para medidas independentes e Mann-Whitney quando não paramétricos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

ENCÉFALO:

Aos 20 dias de gestação já foi possível observar no encéfalo de preás a presença de quatro distintas regiões que originarão o encéfalo adulto. Devido ao formato em “C” do embrião a região correspondente ao telencéfalo apresentava-se em uma porção ventral do encéfalo sendo caracterizada por uma vesícula telencefálica de parede espessa com aspecto de epitélio pseudoestratificado que era marcada mais intensamente que o tecido que a circundava (Figura 1 A e C). O diencéfalo e mesencéfalo (Figura 1 A) não apresentavam limites evidentes entre si e caracterizavam-se pela presença de grandes vesículas com paredes delgadas e com tecido de alta celularidade ao redor com moderada intensidade de marcação imunofluorescente (Figura 1 D e E). Já o metencéfalo (Figura 1 B) apresentava uma região cortical de maior celularidade e também de maior intensidade na marcação para receptores MT1 e MT2 para melatonina e um plexo coroide (Figura F) em desenvolvimento marcado intensamente para estes receptores.

Aos 25 dias de gestação o encéfalo de preás apresentava-se composto por quatro principais regiões distintas formadas por vesículas envoltas por tecido nervoso e caracterizadas principalmente por sua localização e organização celular e que eram marcadas de maneira distintas para os receptores de melatonina. A região mais cranial denominada de telencéfalo (Figura 1G) apresentava pequenas vesículas envoltas por tecido nervoso organizado de modo semelhante a um epitélio pseudoestratificado, que se marcava intensamente pela imunofluorescência as receptores de melatonina, em especial na região em contato direto com a luz da vesícula, e ao redor observava-se um tecido de moderada celularidade e com células espaçadas que apresentaram baixa expressão dos receptores MT1 e MT2. Depois o diencéfalo (Figura 1H) caracterizou-se

por apresentar uma grande vesícula central envolta por tecido nervoso que em sua porção ventral apresentava baixa celularidade que apresenta baixa expressão de receptores de melatonina, com exceção de uma região em seu assoalho onde se originará a porção nervosa da hipófise (Figura 1K) que apresenta uma marcação mais intensa, já em sua porção mais dorsal observou-se uma maior concentração celular evidenciada pela maior concentração de núcleos e em relação a distribuição dos receptores de melatonina estes eram mais evidentes na região cortical desta porção do encéfalo. O mesencéfalo apresentou morfologia semelhante ao observado para o diencéfalo, com fluorescência moderada por toda região (Figura 1I e L). Já o metencéfalo (Figura 1J) caracterizou-se pela presença do plexo coroide (Figura 1M) bastante evidente e apresentando intensa fluorescência quando comparado as demais regiões do tecido nervoso.

Aos 30 dias de gestação o encéfalo de preás apresentava-se como uma estrutura de morfologia mais contínua e compacta (Figura 1 N) sem a presença das características vesículas observadas aos 25 dias de gestação. Além disso, a marcação imunofluorescente para os marcadores de melatonina MT1 e MT2 concentraram-se na região do córtex. Na região do telencéfalo as pequenas vesículas dão lugar a uma única e grande vesícula de parede delgada que se marcava intensamente em comparação ao tecido que a envolvia. Já o diencéfalo (Figura 1 O) apresentou-se como uma região uniforme de baixa celularidade que é evidenciada pelo espaçamento entre os núcleos e de baixa expressão de receptores de melatonina, a não ser pela região de neuro-hipófise que apresentava mais intensa marcação imunofluorescente. O mesencéfalo mantinha a vesícula envolta por uma parede que era marcada moderadamente pela imunofluorescência para os receptores de melatonina e na sequência apresentava um tecido mais compacto em comparação ao diencéfalo e também mais fortemente

marcado (Figura 1 P). Por fim o metencéfalo apresentava morfologia aproximando-se a do cerebelo já desenvolvido com marcação mais intensa em sua região cortical e com presença de plexo coroide mais extenso e com sua marcação mantida em relação a idade anteriormente estudada.

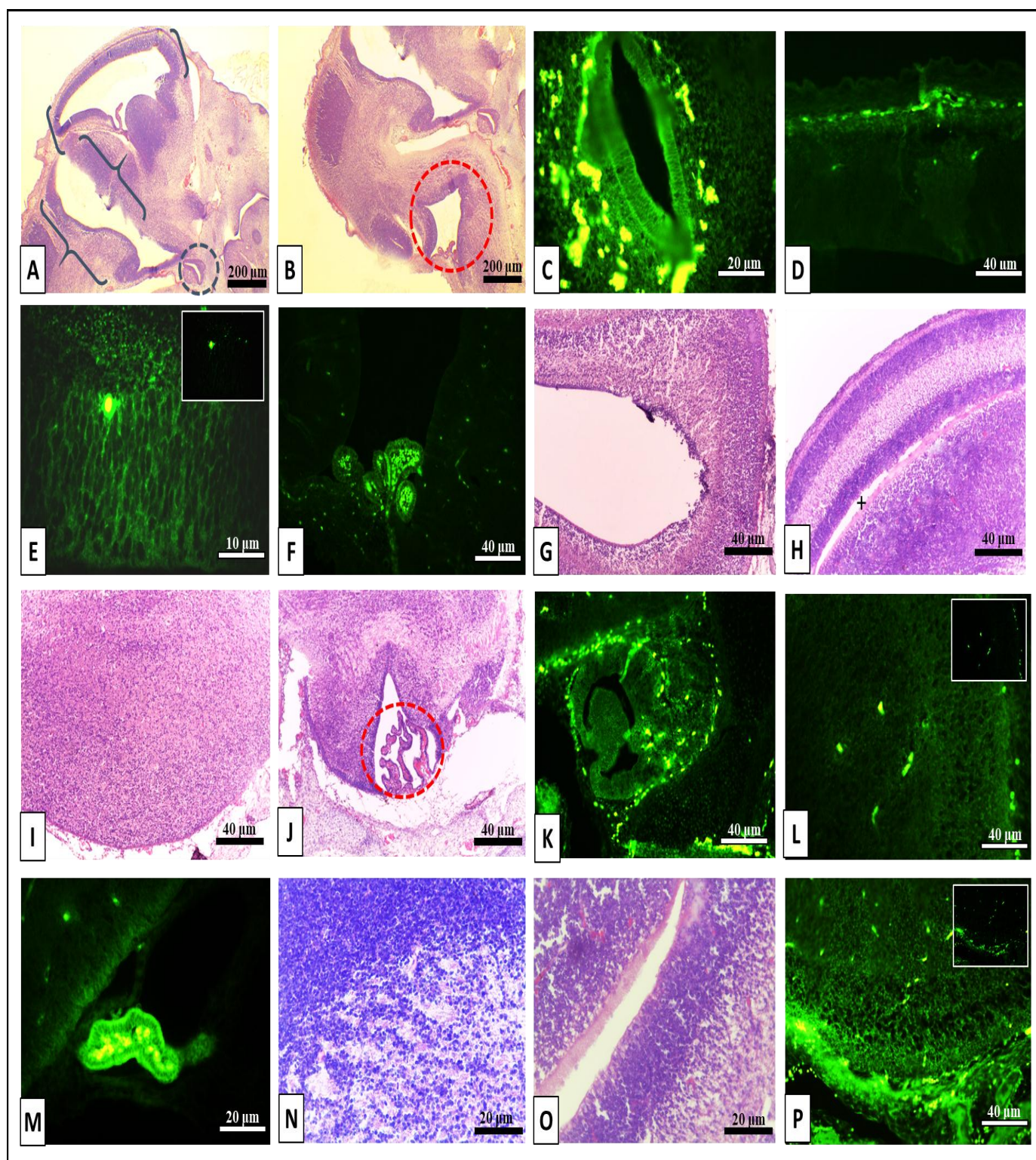


Figura 1 – Fotomicrografia do encéfalo de embriões de preás. Imagens de A a F representam 20 dias de gestação, de G a M representam 25 dias de gestação e de N a P representam 30 dias de gestação. Em A, observa-se uma vesícula telencéflica (região circunscrita), o diencefalo ([]) e o mesencefalo ({}). Em B, observa-se o metencefalo (região circunscrita) com o plexo coroide no seu interior. Em C, observa-se intensa fluorescência na vesícula telencéflica. Em D, observa-se marcação moderada dos receptores de melatonina na região cortical do diencefalo. Em E, observa-se uma região do mesencefalo com marcação fluorescente moderada. Em F, observa-se marcação intensa dos receptores MT1 e MT2 no plexo coroide. Em G, observa-se o telencéfalo. Em H, observa-se o diencefalo com um vesícula central (+). Em I, observa-se mesencefalo com grande concentração de células. Em J, observa-se o metencefalo com o plexo coroide (região circunscrita) no seu interior. Em K, observa-se a porção nervosa da hipófise com intensa marcação. Em L, observa-se o mesencefalo com fluorescência moderada. Em M, notou-se intensa fluorescência do plexo coroide. Em N, tecido nervoso mais compacto do encéfalo. Em O, observa-se o tecido nervoso do diencefalo. Em P, observa-se marcação fluorescente do mesencefalo.

PULMÃO:

O pulmão do preá aos 20 dias de gestação apresentavam bronquíolos terminais com tecido com aspecto de epitélio pseudoestratificado com núcleos apicais que coincidem com a região de maior intensidade na marcação para receptores de melatonina e o bronquíolo era circundado por uma camada de células delgadas concêntricas marcadas intensamente pela imunofluorescência para receptores MT1 e MT2 (Figura 2 A e B). No estroma observava-se um tecido compacto com células basofílicas que não se marcava pela imunofluorescência para receptores de melatonina e era permeado por capilares sanguíneos.

No pulmão aos 25 dias de gestação observou-se uma maior quantidade de brônquios e bronquíolos no estroma pulmonar, assim como observou-se distinção entre suas estruturas morfológicas, em especial no que se refere a altura do epitélio, onde nos brônquios principais observou-se um epitélio com aspecto pseudoestratificado constituído por células cilíndricas e com núcleos centrais, enquanto que nos bronquíolos terminais observou-se um epitélio com células mais cúbicas e núcleos basais. Não observou-se grande diferença na intensidade da marcação para receptores de melatonina em nestes diferentes bronquíolos, além disso ambos (brônquios e bronquíolos) eram circundados por uma camada de células achatadas e concêntricas que também eram responsivas a imunofluorescência (Figura 2 C e D). Essas estruturas estavam rodeadas por tecido conjuntivo embrionário que fazia a sustentação e ao contrário do que se observava na idade anterior eram visualizadas populações celulares distintas, no entanto não houve diferença na intensidade da marcação para receptores de melatonina.

Aos 30 dias de gestação observou-se uma considerável diminuição no espaço ocupado pelo estroma no tecido pulmonar sendo este espaço tomado por uma grande quantidade de bronquíolos com epitélio cúbico e com íntima relação com os capilares

sanguíneos anteriormente não observado, e estes pequenos bronquíolos evidenciaram-se por apresentarem uma marcação menos intensa para os receptores de melatonina em comparação aos bronquíolos maiores e compostos por células cilíndricas (Figura 2 E e F). Já no estroma deste órgão, mesmo reduzido, foi possível observar a presença de ilhas de células que se marcavam intensamente para os receptores de melatonina.

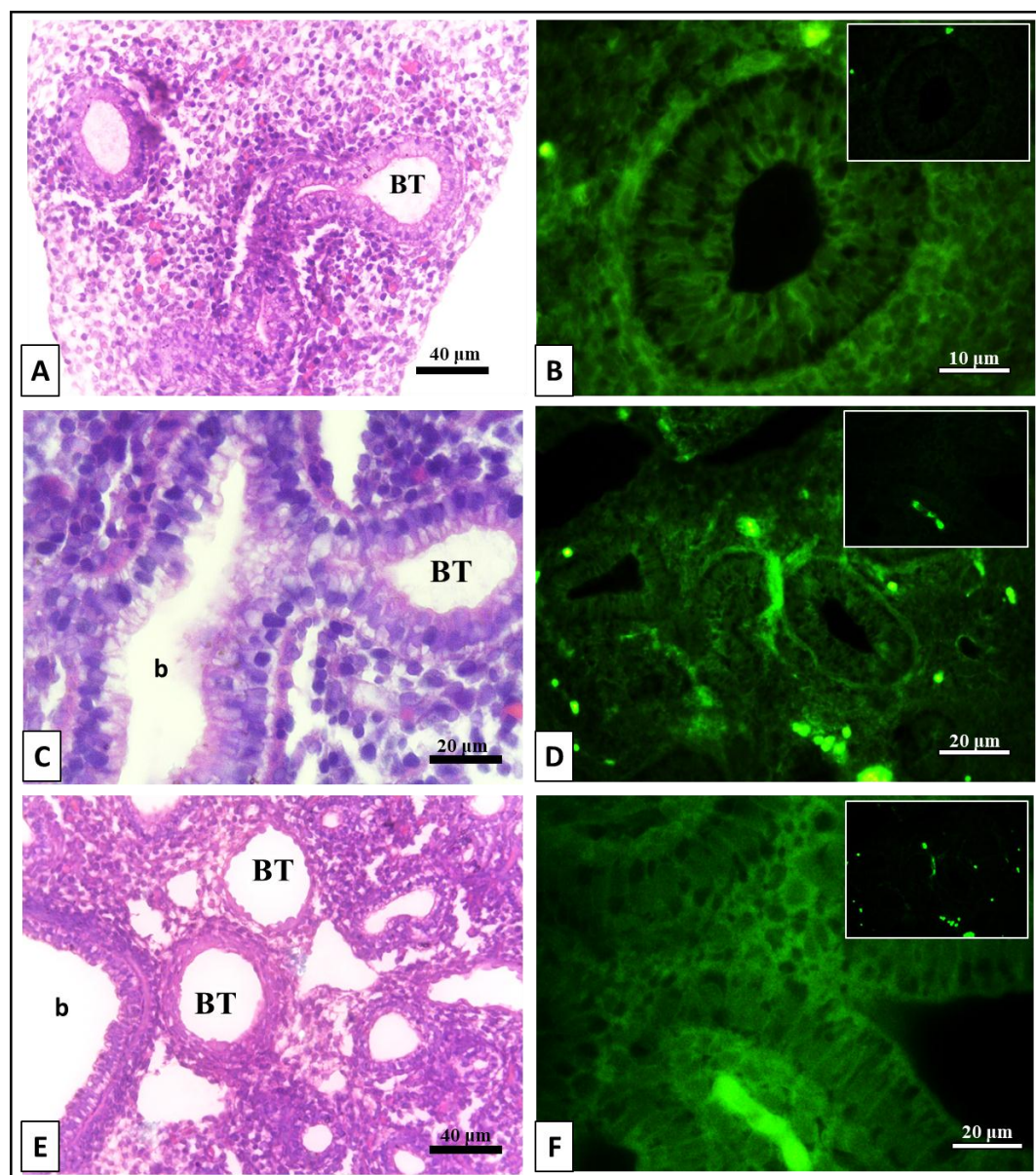


Figura 2 - Fotomicrografia do pulmão de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se a presença de bronquíolos terminais (BT) em um estroma abundante. Em C, observa-se brônquios (b) e bronquíolos (BT) rodeados por tecido conjuntivo. Em E, observa-se a presença de brônquios (b) e bronquíolos (BT) em um estroma bem reduzido. Em B, D e E observa-se a marcação para os receptores de melatonina.

CORAÇÃO

Aos 20 dias de gestação esse órgão apresentava-se ainda em processo de desenvolvimento com duas regiões tubulares distintas, uma com aspecto mais delgado com característica endotelial separado de um tubo muscular primitivo por tecido conjuntivo embrionário. Nesta idade gestacional não foi possível determinar a presença das câmaras, principalmente devido a comunicação presente entre essas regiões e os septos ainda não formados (Figura 3A). A imunofluorescência para os receptores de melatonina MT1 e MT2 apresentou-se uniforme em todo o órgão, marcando de forma difusa e moderada por toda a estrutura cardíaca primitiva (Figura 3B).

Aos 25 dias de gestação apresenta dois campos cardíacos (átrio primitivo) e (ventrículo primitivo) evidentes (Figura 3C), com a presença de um pericárdio de tecido conjuntivo que circunda toda a área cardíaca. Apresenta as três camadas já bem desenvolvidas epicárdio, miocárdio e endocárdio. Observou-se ainda que o ventrículo se apresenta como uma estrutura com bastante celularidade, enquanto que o átrio apresenta-se com vários espaços preenchidos por células sanguíneas típicas. Porém, em toda a extensão do miocárdio do ventrículo primitivo houve marcação dos receptores de melatonina com maior intensidade quando comparado com o de 20 dias, porém também uniforme (Figura 3D). Observou-se que no átrio houve a marcação de células de suas paredes, com menor intensidade do que a marcação que ocorreu na região ventricular.

Aos 30 dias de gestação o coração apresentava quatro câmaras cardíacas distintas, átrio direito e átrio esquerdo ainda em desenvolvimento, enquanto os ventrículos direito e esquerdo estavam já delimitados e encontravam-se separados pelo septo intraventricular (Figura 3E), também observamos histologicamente as três camadas do coração: pericárdio, miocárdio e endocárdio. Também foi observado a presença da válvula bicúspide. O pericárdio apresentava-se como uma camada composta por tecido

conjuntivo que revestia todo a superfície externa do coração e fracamente marcada pela imunofluorescência para receptores de melatonina. O epicárdio é a camada mais externa do órgão, e era composto por um epitélio pavimentoso simples e fazia contato com a superfície visceral do diafragma. O miocárdio era camada mais espessa e na sua composição estavam presentes fibras musculares cardíacas e alguns vasos de pequeno calibre espalhados por sua extensão, neste tecido os receptores de melatonina MT1 e MT2 expressavam-se de forma difusa, o que levou a uma marcação distribuída por toda a área (Figura 3F). O endocárdio era constituído por uma camada endotelial sustentada por um tecido conjuntivo frouxo que também se marcava fracamente.

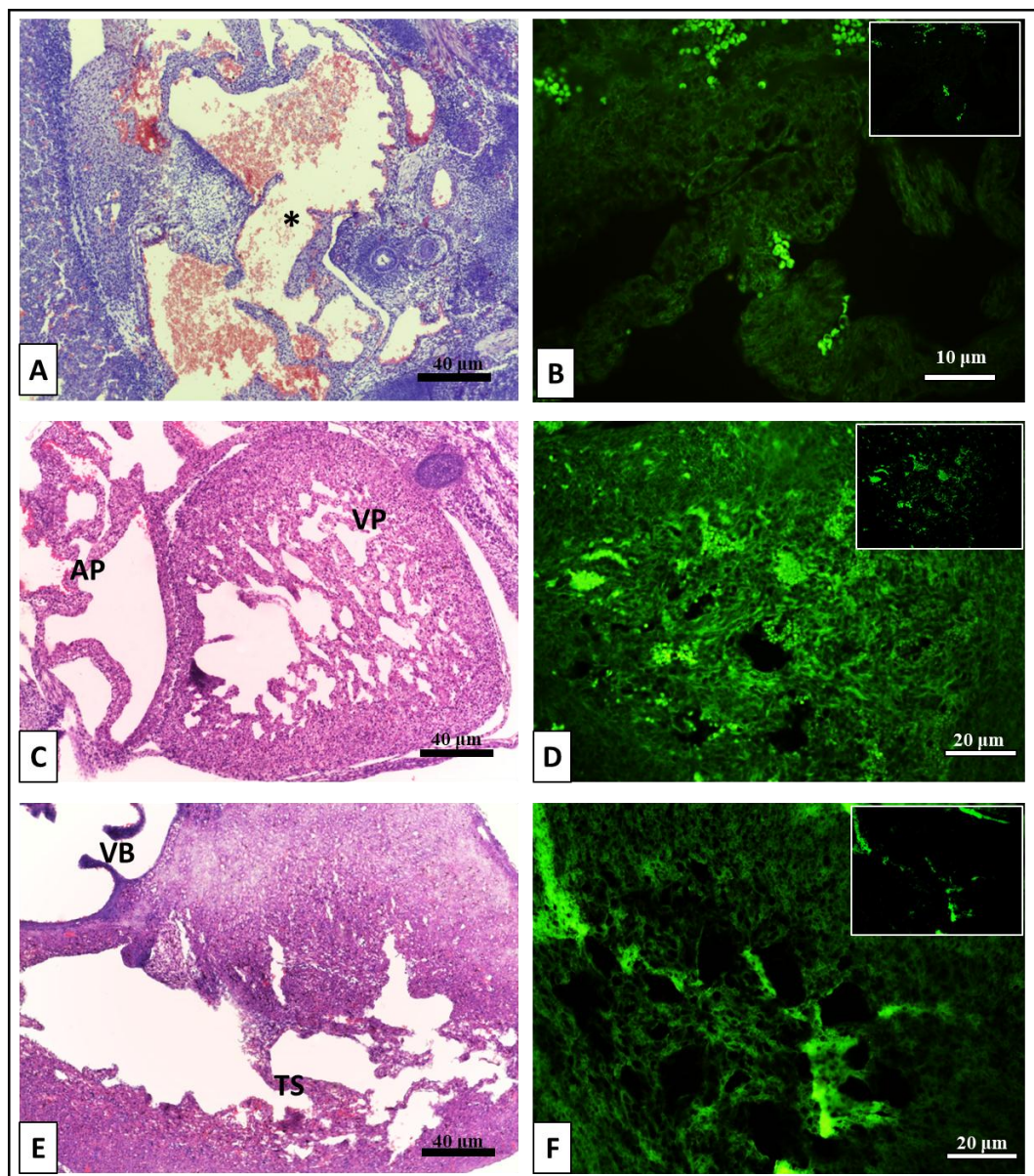


Figura 3 - Fotomicrografia do coração de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se um túbulo com septo (*) ainda não formado com a presença de bastante células sanguíneas no seu interior. Em C, observa-se a presença do átrio primitivo (AP) e ventrículo primitivo (VP). Em E, observa-se a região ventricular com presença da trabécula septomarginal (TS). Observa-se também a presença da válvula bicúspide (VB). Em B, D e F evidencia-se a marcação que ocorreu de forma difusa nas regiões, embora tenha marcado em diferentes intensidade.

FÍGADO

Aos 20 dias de gestação observou-se o fígado dos embriões apresentavam um parênquima hepático envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo embrionário, e seu

interior apresenta aspecto compacto, com células muito próximas umas das outras, sendo constituído principalmente por hepatócitos caracterizados por apresentarem formato variável desde células redondas à poliédricas com núcleo central e basofílico e citoplasma ligeiramente acidófilo ou ainda não corado em alguns poucos casos, também se observava a presença de hepatoblastos, células com núcleo grande e pouco citoplasma, todavia não observou-se diferença na marcação para receptores de melatonina nestes diferentes tipos celulares, sendo que a marcação no fígado ocorreu de maneira uniforme, com uma intensa marcação celular no parênquima hepático (Figura 4 A e B).

Aos 25 dias de gestação o parênquima hepático estava revestido por uma camada de tecido conjuntivo, e nele apresentavam-se vários hepatócitos de núcleo basofílico muito próximos uns aos outros e às vezes observava-se a formação de cordões celulares. Além disso, também foi observado hepatoblastos. Juntos dos hepatócitos entremeados por tecido conjuntivo, também identificou-se vasos sanguíneos (Figura 4 B). A marcação dos receptores de melatonina MT1 e MT2 no fígado ocorreu de forma intensa nos hepatócitos e também nos hepatoblastos, além disso, observou-se a delimitação dos vasos sanguíneos (Figura 4 D).

Aos 30 dias de gestação, observou-se no parênquima hepático vários lóbulos delimitados por septos de tecido conjuntivo e também se notou presença da veia centro lobular na região central de cada lóbulo, bem como, observou-se a presença hepatócitos de forma predominantemente poliédrica distribuídos por toda região parenquimatosa do órgão. Observou-se que a marcação dos receptores de melatonina MT1 e MT2 era de forte intensidade no citoplasma dos hepatócitos de forma homogênea e com distribuição uniforme, e em alguns locais houve fluorescência de cordões de hepatócitos. Os vasos

sanguíneos presentes no parênquima hepático também foram bem marcados (Figura 4 E e F).

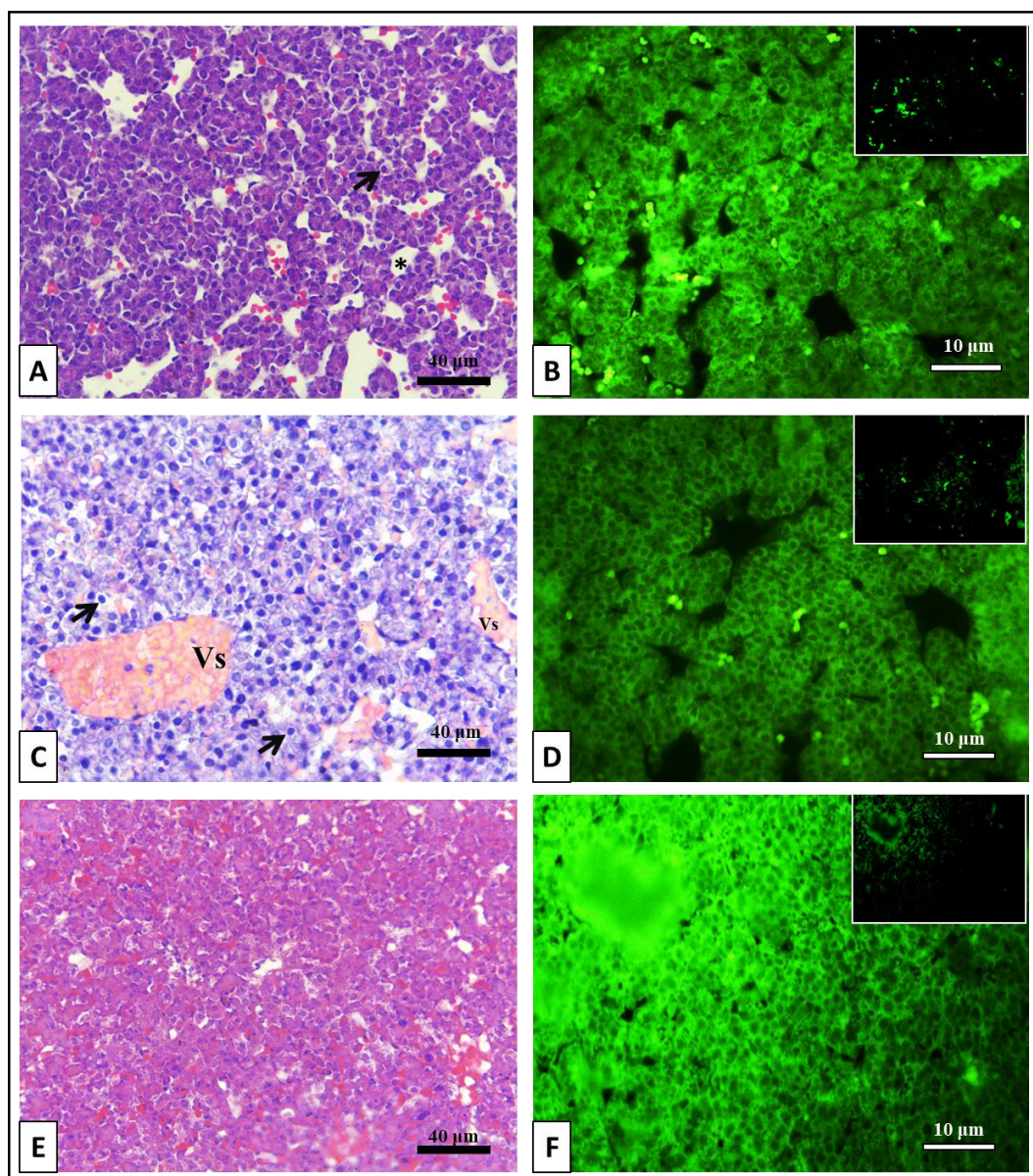


Figura 4 - Fotomicrografia do fígado de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se o parênquima hepático repleto de células, tais como hepatoblastos (seta), além disso, observou-se micro região de células sanguíneas (*) em processo de maturação. Em B, D e F observa-se intensa marcação nas células que compõem o parênquima hepático. Em C, observa-se a presença de hepatoblastos (seta), vasos sanguíneos (Vs) e grande quantidade de hepatócitos. Em E, parênquima hepático.

RIM

Aos 20 dias de gestação observou-se o rim como uma estrutura elíptica apresentando túbulos com epitélio cúbico, delimitados e na região central do órgão e

envolvidos por um estroma com células redondas e basofílicas. Não houve como delimitar região medular e região cortical. A estrutura estava recoberta por tecido conjuntivo embrionário com presença de células epiteliais simples pavimentosas (Figura 5A). No que se refere a marcação por imunofluorescência para receptores de melatonina neste órgão, observou-se marcação evidente na região de túbulos, além de algumas células marcadas na região do parênquima, e também na camada mais externa do rim que apresentava composta por tecido conjuntivo também houve marcação (Figura 5B).

Aos 25 dias de gestação o rim dos embriões estudados, apresentou-se como uma estrutura elíptica, na região parenquimatosa do órgão observou-se uma diferença na quantidade de células e também no tecido conjuntivo que fazia sustentação dessas células. Foi identificado a presença de túbulos em maior quantidade em relação idade anterior e que ocupavam uma região periférica, porém também se observava a presença de túbulos na região central apresentando lúmen menor (Figura 5C). Com relação a marcação para receptores MT1 e MT2, notou-se que a mesma foi forte na região tubular e também nos glomérulos em formação do órgão no qual apresentaram um citoplasma bem evidenciado (Figura 5D). A camada de tecido conjuntivo que reveste o órgão também apresentou marcação bem destacada.

Aos 30 dias de gestação o rim dos embriões estudados, apresentou formato ovalado, estava envolvido por uma capsula de tecido conjuntivo com a presença de uma camada de tecido epitelial simples pavimentoso (mesotélio), ficou evidenciada uma camada periférica com coloração basófila, o córtex, já a medula possui uma coloração menos basófila e estava localizada na região central. No córtex, observou-se corpúsculos renais formados pelos glomérulos renais (aglomerado de capilares) e o tecido epitelial, além disso, notou-se a presença de túbulo contorcido proximal e também túbulo contorcido distal. Na medula observou-se a presença de tecido

conjuntivo frouxo, próximo a região de limite com a medula notou-se a presença de vasos sanguíneos. Em direção ao centro da região medular identificou-se a presença da alça do néfron tanto porção descendente quanto a ascendente e na região central da medula evidenciou-se uma estrutura circular com tecido conjuntivo na luz proveniente da medula (Figura 5E). A expressão dos receptores de melatonina MT1 e MT2 foi determinada pela marcação de algumas regiões do órgão. A marcação por imunofluorescência foi evidenciada no epitélio dos glomérulos da região cortical que apresentaram intensa fluorescência. Na região central do órgão observou-se a marcação das células que compõem a alça de Henle ou alça do néfron. O tecido conjuntivo que apoia os túbulos do órgão também foi marcado, porém com menor intensidade do que as regiões tubulares (Figura 5F).

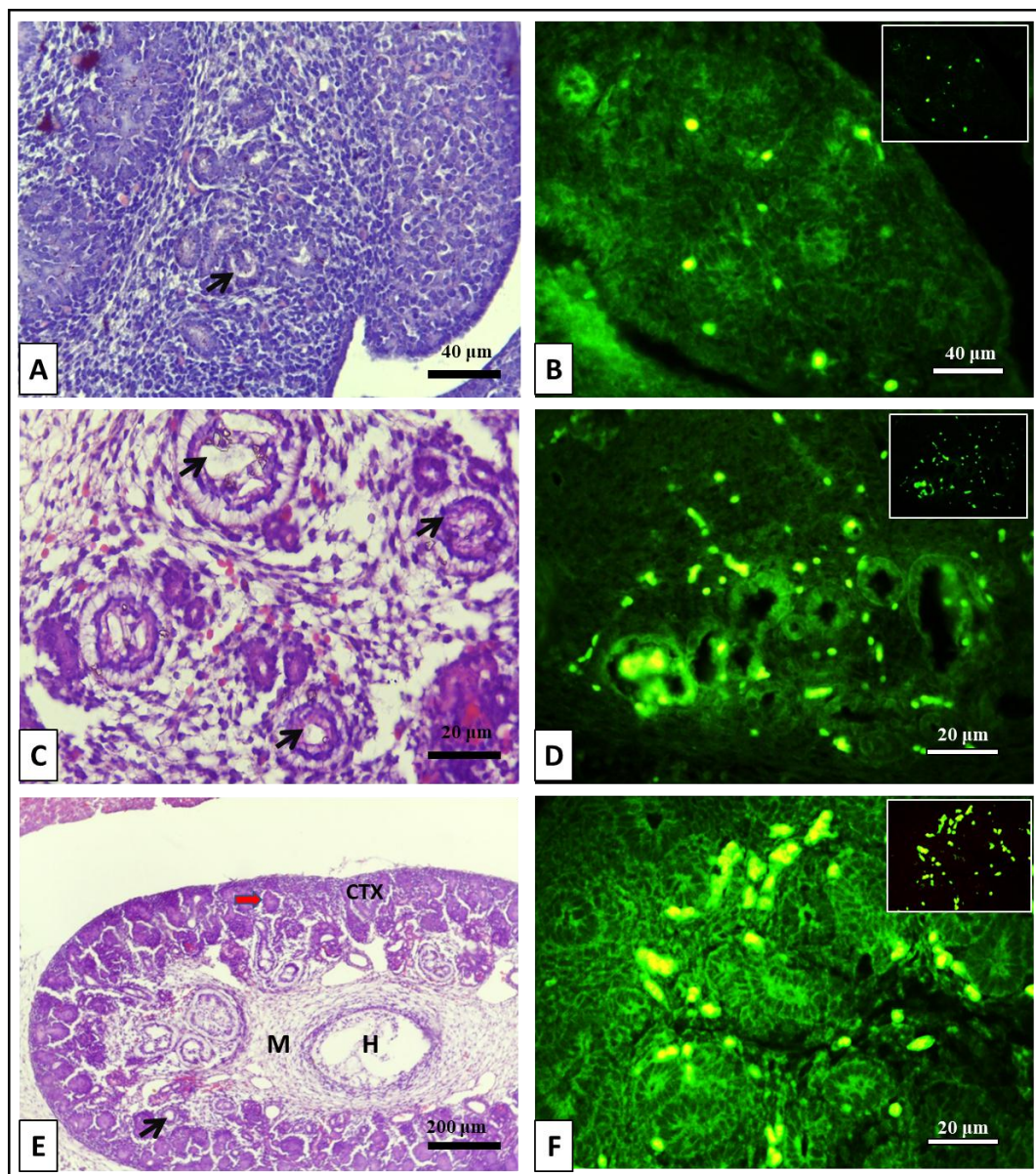


Figura 5- Fotomicrografia do rins de embriões de preás. Em A, C e E imagens de microscopia de luz representativas de coloração HE aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em B, D, F imagens de fluorescência representativas aos 20, 25, 30 dias de gestação, respectivamente. Em A, observa-se um parênquima renal bem compacto com a presença túbulos renais (seta preta). Em B, D e E observa-se a marcação mais intensa na região dos túbulos . Em C, observa-se o parênquima renal com a presença de vários túbulos (seta). Em E, observa-se o rim na qual fica evidenciado a região cortical (CTX) e região medular (M) e outras estruturas que compõem o rim : túbulo (seta preta) e glomérulo renal (seta vermelha) e também o hilo renal (H).

DENSIDADE DE MARCAÇÃO DOS RECEPTORES DE MELATONINA

Tabela 1: Densidade da marcação dos receptores de melatonina MT1 e MT2 em diferentes órgãos dos embriões e diferentes idades gestacionais. Valores estão expressos em percentual.

	ÓRGÃO	Encéfalo	Coração	Fígado	Rim	Pulmão
IDADE GESTACIONAL	20	20,4±0,27a	57,2 ±6,00a	65,5±23,0a	19,0±6,6 ^a	24,6±7,18a
	25	21,96±7,9a	40,33±2,3b	77,65±23,3a	18,8±7,6 ^a	21,3±6,4a
	30	26,9±9,32b	19,74±3,9c	68,3±26,1a	33,77±4,0b	27,1±4,4a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

No que se refere à densidade de marcação imunofluorescente dos receptores de melatonina nos embriões de preá, observou-se que em órgãos como encéfalo, coração e rim houve variação significativa na densidade de receptores quando comparamos as diferentes idades gestacionais avaliadas, já no fígado e pulmão não se observou diferença significativa entre as idades (Tabela 1). De maneira mais detalhada verificou-se que no encéfalo não houve diferenças significativas entre as densidades de marcação dos receptores nas idades de 20 e 25 dias de gestação, porém, quando comparamos as duas menores idades com a idade de 30 dias, observamos diferença significativa na densidade de receptores, sendo que a maior densidade foi observada na idade de 30 dias. Quando se comparou as idades gestacionais avaliadas neste estudo, observou-se que no coração houve diferença estatística para a densidade de marcação dos receptores MT1 e MT2 sendo que a maior densidade dos receptores de melatonina foi aos 20 dias de gestação e esta diminuiu progressivamente à medida que a idade avançava sendo que a diferença estatística foi observada em todas as idades avaliadas. O fígado foi o órgão que apresentou a maior densidade de receptores MT1 e MT2 para melatonina observada neste estudo, porém ao comparar-se a marcação no fígado entre as idades estudadas verificou-se que não havia diferenças estatísticas na densidade dos receptores em

estudo. Comportamento semelhante foi observado no pulmão onde também não se verificou diferença estatística entre as idades analisadas. Por fim, o rim foi o órgão que apresentou menor densidade dentre os órgãos avaliados e ao comparar-se as diferentes idades gestacionais verificou-se que não havia diferenças significativas entre as idades de 20 e 25 dias. Porém, aos 30 dias de gestação a densidade de marcação dos receptores foi maior quando comparado com as menores idades.

DISCUSSÃO

Os receptores de melatonina apresentaram-se distribuídos em todos os órgãos estudados nas diferentes idades gestacionais. Assim como já descrito por outros autores na região encefálica estes receptores distribuem-se amplamente nas regiões dorsomedial e ventromedial do núcleo hipotalâmico, região pré-óptica, núcleo paraventricular, hipocampo, área postrema, amígdala e córtex cerebral [15]. No preá observou-se ampla distribuição especialmente no córtex cerebral e por serem embriões não foi possível diferenciar regiões mais detalhadas. No córtex cerebral, região de maior evidência da fluorescência para MT1 e MT2 em embriões de preá, [1] estudando a distribuição dos receptores MT1 para melatonina em cérebro de camundongos relatam principalmente a presença de receptores MT1 no córtex cerebral, assim como observado em todas as idades embrionárias avaliadas neste estudo. Além disso, os autores citam importante distribuição dos receptores de melatonina na hipófise, em especial na *pars tuberalis*, a expressão destes receptores na hipófise foi observada também em preás, porém a região específica da hipófise, pois o órgão ainda estava em desenvolvimento nas idades gestacionais deste estudo.

No coração de preás, em todas as idades gestacionais estudadas a marcação para receptores de melatonina foi difusa e inespecífica. Neste contexto, [2] tratando das

funções da melatonina, relatam que esta apresenta funções ligadas a ação sobre locais de ligação pertencentes a família de receptores de transcrição nuclear (ROR/RZR) que podem levar a esta marcação difusa e inespecífica neste órgão. Além disso, [12] relatam a ação da melatonina ligada a seus receptores no miocárdio cardíaco, indicando uma função protetora deste hormônio sobre a musculatura cardíaca e, conseqüentemente, uma extensa distribuição dos receptores para melatonina neste tecido.

Com relação a marcação dos receptores ter ocorrido de forma difusa e inespecífica no coração do preá, corrobora com os resultados descritos por [21] que afirmam que os receptores de melatonina é expresso em todos os tecidos extra-pineais (timo, baço, fígado, rim e coração) de ratos Wistar, sem haver diferença de expressão por regiões. Em estudos com camundongos avaliando os efeitos da melatonina contra a lesão isquêmica, [7] relatam a presença de receptores de melatonina MT1 e MT2 no miocárdio detectados por imunofluorescência, resultados semelhantes aos obtidos no estudo com preá que também identificou a presença desses receptores no coração, sugerindo assim que como nos camundongos são importantes para cardioproteção, também podem ser importante no preá. Nossos resultados estão de acordo com [6] que relatou a presença de receptores de melatonina no sistema cardiovascular e também vai ao encontro de resultados obtidos por [18] em Hamster Sírio que relatam a presença de locais de ligação à para a melatonina no coração.

O fígado foi o tecido mais intensamente marcado para os receptores de melatonina MT1 e MT2 em todas as idades gestacionais estudadas nesta pesquisa. Não observou-se na literatura comparação no que diz respeito a intensidade ou quantificação de número de receptores para melatonina no fígado em relação a outras espécies, porém, [17] estudando a expressão de receptores de melatonina em órgãos periféricos relatam a abundante presença de receptores para melatonina no fígado de camundongos, inclusive

validando a presença tanto de receptores MT1 quanto de MT2, anteriormente ligado somente a tecido nervoso. Do mesmo modo, [19] relatam a presença de receptores MT2 em hepatócitos de ratos, Além disso, [9] estudando a distribuição de subfamílias de receptores para melatonina indicam que o fígado é um dos órgãos onde estes receptores preferencialmente são expressos, sendo essa uma possível explicação para a maior expressão dos receptores neste órgão em preás. Além disso, [4] sugerem que a melatonina atua como antiinflamatório endógeno para o fígado em situações de alto requerimento metabólico, sendo assim os processos de desenvolvimento embrionário ligados a produção de substâncias no fígado também podem causar essa maior expressão por este órgão. [24] relatou que a ação da melatonina no fígado é de grande importância, visto que, uma parte dos compostos que são apresentados a esse órgão podem ser tóxicos ou causar sobrecarga hepática, então a abundância dos receptores de melatonina nesse órgão do preá também pode está relacionado com a ação antioxidante e, conseqüentemente, carácter hepatoprotetor do hormônio. Nossos resultados, quanto à presença de receptores de melatonina no fígado de preá, corrobora com os descritos por Naji et al. (2004) que afirmam haver a expressão de receptores MT1 no fígado de camundongos. [13] relata em sua pesquisa que o receptor MT1 está presente no fígado sendo localizado principalmente na área pericentral dos lóbulos do órgão, resultado que corrobora com a pesquisa feito em preás que identificou marcação dos receptores de melatonina no fígado em todas as idades gestacionais do estudo. Corroborando nosso estudo, também já foram descritos a presença de receptores de melatonina no fígado em Rato Wistar [10], Rato Norvegicus [20] e Rato Suíço [16].

O pulmão e o rim do preá aos 20, 25 e 30 dias de gestação apresentaram comportamento semelhante em relação a marcação imunofluorescente para receptores de melatonina com marcação mais intensa especialmente na região tubular dos órgãos,

[22] estudando expressão de receptores para melatonina em rim de porquinho da índia evidenciaram a presença destes receptores na região basolateral das células dos túbulos renais e em especial nos túbulos proximais, isto foi observado em preás nos túbulos renais porém só foi possível diferenciar em túbulos proximais aos 30 dias de gestação. Identificamos a presença de receptores de melatonina no pulmão de preá, corroborando com os resultados relatados por [17] que afirma haver expressão tanto do receptor MT1 quanto do receptor MT2 no pulmão de camundongos.

Quanto a densidade de marcação dos receptores de melatonina em cada órgão observou-se que a maior densidade entre os órgãos em todas as idades foi encontrada no fígado assim como de modo geral a idade em que se observou maior densidade foi aos 25 dias de gestação. De acordo com [25], estudando a distribuição e densidade de receptores de melatonina em pâncreas, a diferença na densidade se dá devido as diferentes necessidades metabólicas nos distintos grupos celulares, assim como pela ação antioxidante da melatonina, sendo assim, pode-se dizer que órgãos com maior atividade tendem a apresentar maior densidade de receptores de melatonina, sendo assim, o fígado por apresentar alta atividade metabólica espera-se que apresente maior densidade de receptores de melatonina assim como observado neste estudo.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que os receptores de melatonina estão distribuídos por todos os órgãos estudados, sendo o fígado o órgão que apresentou a marcação mais intensa independente da idade gestacional.

Baseado nos dados discutidos supõe-se que o fígado é o órgão do embrião que apresenta a maior necessidade metabólica, por isso nesse estudo foi observado a maior densidade dos receptores de melatonina.

MANUFACTURERS

¹Xilazina – Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.

²Cetamina – Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brazil.

³Tiopental – Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP, Brazil.

⁴Cloreto de Potássio – Halexistar. Goiânia, GO, Brazil.

⁵Anticorpo primário – Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe.

⁶Anticorpo secundário – Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe.

Ethical Approval. Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com protocolo nº 23091.0131160/2018-90.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

1. Adamah-Biassi E.B., Zhang Y., Jung H., Vissapragada S., Miller R.J. & Dubocovich M. L. (2014). Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(1), 70-84.
2. Becker-André M., Wiesenberg I., Schaeren-Wiemers N., Andre E., Missbach M., Saurat J.H. & Carlberg C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28531-28534.
3. Bonvicino C.R., Oliveira J.D. & D'Andrea P.S. (2008). Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. *Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS*, 120.

4. **Demirtas C.Y., Pasaoglu O.T., Bircan F.S., Kantar S. & Turkozkan N. (2015).** The investigation of melatonin effect on liver antioxidant and oxidant levels in fructose-mediated metabolic syndrome model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(10), 1915-1921.

5. **Dubocovich M.L. & Markowska M. (2005).** Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), 101-110.

6. **Ekmekcioglu C., Thalhammer T., Humpeler S., Mehrabi M.R., Glogar H.D., Hölzenbein T. & Marktl W. (2003).** The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *Journal of pineal research*, 35(1), 40-44.

7. **Han D., Wang Y., Chen J., Zhang J., Yu P., Zhang R. & Xu M. (2019).** Activation of melatonin receptor 2 but not melatonin receptor 1 mediates melatonin-conferred cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of pineal research*, e12571.

8. **Hiriart B.M., Morffiz Y.S., Torres K.U., Michell Y.D.T. & Sosa J.L.B. (2012).** Hormona de la oscuridad. *ÍNDICE CONTENTS*.

9. **Hirose T., Smith R.J. & Jetten A.M. (1994).** ROR- γ : The Third Member of ROR/RZR Orphan Receptor Subfamily That Is Highly Expressed in Skeletal Muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, 205(3), 1976-1983.

10. **Ishii H., Tanaka N., Kobayashi M., Kato M. & Sakuma Y. (2009).** Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors. *The Journal of Physiological Sciences*, 59(1), 37.
11. **Júnior C.M.O., Bezerra F.V., Câmara F.V., do Vale A. M., de Oliveira G. B., da Silva, A.R. & Oliveira M.F. (2016).** Morfologia das glândulas salivares maiores em cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1766). *Pesq. Vet. Bras*, 36(3), 227-236.
12. **Lagneux C., Joyeux M., Demenge P., Ribuot C. & Godin-Ribuot D. (2000).** Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sciences*, 66(6), 503-509.
13. **Mathes, A.M. (2010).** Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(48), 6087.
14. **Mendes B.V. (1987).** *Plantas e animais para o Nordeste*. Globo.
15. **Morgan P.J., Barrett P., Howell H.E. & Helliwell R. (1994).** Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochemistry international*, 24(2), 101-146.
16. **Mühlbauer E., Gross E., Labucay K., Wolgast S. & Peschke E. (2009).** Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *European journal of pharmacology*, 606(1-3), 61-71.

17. **Naji L., Carrillo-Vico A., Guerrero J.M. & Calvo J.R. (2004).** Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life sciences*, 74(18), 2227-2236.

18. **Paul P., Lahaye C., Delagrangre P., Nicolasn J.P., Canet E. & Boutin J.A. (1999).** Characterization of 2-[125I] iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(1), 334-340.

19. **Poon A.M.S., Choy E.H.Y & Pang S.F. (2001).** Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on melatonin receptors in mouse hepatocytes. *Neurosignals*, 10(6), 367-379.

20. **Sallinen P., Saarela S., Ilves M., Vakkuri O. & Leppäluoto J. (2005).** The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life sciences*, 76(10), 1123-1134.

21. **Sánchez- Hidalgo M., Guerrero Montávez J. M., Carrascosa- Salmoral M.D.P., Naranjo Gutierrez M.D.C., Lardone P.J. & De La Lastra Romero C.A. (2009).** Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. *Journal of pineal research*, 46(1), 29-35.

22. **Song Y., Chan C.W., Brown G.M., Pang S.F. & Silverman M. (1997).** Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *The FASEB journal*, 11(1), 93-100.

23. **Tosini G., Baba K., Hwang C.K. & Iuvone P.M. (2012).** Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Experimental eye research*, 103, 82-89.
24. **Üstündağ, B., Cinkilinç, N., Halifeoğlu, I., Canatan, h., & Özercan, I. H. (2000).** Effect of melatonin on hepatic fibrogenesis, vitamin c and hydroxyproline levels in liver of ethanol-fed rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 30(4), 333-340.
25. **Zibolka J., Bazwinsky- Wutschke I., Mühlbauer E. & Peschke E. (2018).** Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. *Journal of pineal research*, 65(1), e12480.

ANEXOS A - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 27 de março de 2019.

PARECER 07/2019

O projeto intitulado “RECEPTORES DE MELATONINA (MT1 E MT2) EM EMBRIÕES DE PREÁ (*Galea spixii* Wagler, 1831) E PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758)”, processo n. 23091.0131160/2018-90 sob responsabilidade de Moacir Franco de Oliveira, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião no dia 26 de março de 2019 mediante resposta satisfatória ao solicitado no memorando CEUA 06/2018.

Vigência do projeto	Dezembro de 2018 a janeiro de 2019
Espécie/linhagem	<i>Galea spixii</i> e <i>Cavia porcellus</i>
N. de Animais	12 <i>G. spixii</i> e 15 <i>C. porcellus</i>
Peso/idade	Adultos
Sexo	Fêmeas
Origem	CEMAS/UFERSA

Emmanuelle Fontenele Rabelo
 Emmanuelle Fontenele Rabelo

Presidente CEUA-UFERSA

ANEXO B - AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA (ICMBio)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66001-1	Data da Emissão: 26/10/2018 12:07:35	Data da Revalidação*: 26/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: paulo mateus alves lopes	CPF: 062.957.593-27
--------------------------------	---------------------

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Material e processamento em laboratório	11/2018	01/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	Orientador	325.949.504-59	Brasileira
2	Ferdinando Vinicius Fernandes Bezerra	Co-orientador	068.828.364-00	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/rogen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0660010120181026

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66001-1	Data da Emissão: 26/10/2018 12:07:35	Data da Revalidação*: 26/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: paulo mateus alves lopes	CPF: 062.957.593-27
--------------------------------	---------------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	ufersa	Mossoró-RN	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Estadual

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Galea spixii	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cavia porcellus	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0660010120181026

Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66001-1	Data da Emissão: 26/10/2018 12:07:35	Data da Revalidação*: 26/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: paulo mateus alves lopes CPF: 062.957.593-27

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprévisita, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0660010120181026

Pagina 3/3