



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Fernanda das Chagas Angelo da Silva

**Efeito do fotoperíodo no disco placentário e o impacto sobre o
fígado da prole**

**RECIFE
2010**

FERNANDA DAS CHAGAS ANGELO DA SILVA

**“EFEITO DO FOTOPERÍODO NO DISCO PLACENTÁRIO E O
IMPACTO SOBRE O FÍGADO DA PROLE”**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Biociência Animal. Área de
Morfofisiologia.**

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2010

FERNANDA DAS CHAGAS ANGELO DA SILVA

**“EFEITO DO FOTOPERÍODO NO DISCO PLACENTÁRIO E O
IMPACTO SOBRE O FÍGADO DA PROLE”**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biotecnologia Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares- UFRPE

Prof. Dr. Édson João da Silva- UFRPE

“Dedico este trabalho ao Grandioso Deus, aos meus amados pais, minhas irmãs e ao meu amado namorado por todo o apoio, compreensão e oração”.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amor, cuidado e toda a fidelidade. Força para vencer, sendo Ele o autor e consumidor de tudo que há em mim. A Ele seja a honra, a glória e o louvor. *“A quem Honra, honra” (Romanos 13:7);*

Aos meus pais Nilson Angelo da Silva e Alcidera Francisca de Souza pela torcida, esforço e dedicação que sempre fizeram para me proporcionar o melhor durante toda a minha vida, e por serem autoridades de Deus, pessoas a quem muito amo e representam a fortaleza da minha vida;

A minha irmã Marcela, e aos amados Gilberto Malta e Paula Patrícia pelo companheirismo, força e estímulo. A minha linda sobrinha Maria Eduarda pela alegria e por todo carinho que tem comigo tornando os meus dias mais felizes;

Ao meu amado namorado Bruno Mendes Tenório, por todo seu amor, carinho, cuidado, apoio, compreensão, e por todo o auxílio dado durante esses anos;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela oportunidade dispoendo assim, do local para a realização deste trabalho;

À Coordenação e aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo;

Aos professores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira pela oportunidade, confiança, companheirismo, amizade e amor, além do exemplo de pessoas e profissionais que levarei comigo por toda a vida;

Ao meu tio Norton Angelo por todo carinho, preocupação e apoio em me ajudar sempre que precisava;

Aos tios Luis e Nair pelo grandioso amor e cuidado que sempre tiveram comigo;

Aos Tios Iralice e Gonçalves, e aos primos e primas: Daeme, Lane, Adimes, Geórgia, Mésus, Suellen, Geames e Karla pela torcida, força e amizade;

Aos amigos: Maria Carolina Nunes, Joyce Marinho, Lourival Batista, Priscila Mayrelle, Francisco Gabriel e Thyago Almeida, pela amizade e pela torcida , considerando-os meus verdadeiros amigos;

Aos queridos amigos do Laboratório de Histologia: Ana Claudia Carvalho, Franklin Magliano, Alicely Araújo que sempre caminharam lado a lado comigo, dando força e apoio. À Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos que viveu em dois anos, junto a mim, todas as alegrias e aflições, sempre se prontificando a ajudar e colaborar com este projeto. À ela todo meu carinho e amor;

Sou grata também a minha grande mãe na fé e amiga Ana Lúcia Freire pela ajuda de toda a sua experiência na área sendo ela Bióloga e por ser uma das grandes pessoas que me estimulou a lutar pela área que escolhi trabalhar;

Ao amoroso Professor Nicodemos Teles de Pontes Filho e aos amigos Heitor Barros e Suelem Brayner;

Ao amigo Marcos André do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE que sempre ajudou e muito contribuiu para este projeto.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos da interferência do fotoperíodo sobre a morfologia da placenta de ratas e a histogênese hepática fetal. Foram utilizadas 40 ratas albinas, que foram divididas em quatro grupos. Grupo I - ratas mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 horas por 60 dias (controle) e acasaladas em seguida; Grupo II - ratas mantidas em ausência de luz por 60 dias e acasaladas em seguida; Grupo III - ratas mantidas em iluminação constante por 60 dias e acasaladas em seguida; Grupo IV - ratas mantidas em iluminação constante por 60 dias, e acasaladas em seguida e tratadas com melatonina. A ausência de luz foi obtida utilizando-se uma sala de aproximadamente 3m², totalmente vedada para não permitir a entrada de luz. O estímulo luminoso foi em torno de 400 lux. A melatonina foi administrada na água na dosagem de 400 mg de melatonina em 1 mL de etanol absoluto. Os resultados mostraram vacuolização das células do trofospongio no grupo II, camada do labirinto mais vascularizada e células trofoblásticas gigantes bastante desenvolvidas, com núcleos volumosos assumindo um caráter hipertrófico no grupo III. As características morfológicas do grupo IV foram semelhantes ao grupo I. A análise histoquímica não revelou alterações nos parâmetros fibras colágenas, elásticas, reticulares e glicosaminoglicanas ácidas (GAGs). A análise estatística da morfometria das placentas dos animais do grupo III diferiram significativamente dos outros grupos experimentais, na área total do disco placentário, nos trofoblastos sinciciais e vascularização materna e fetal na região do labirinto e no número de células trofoblásticas gigantes. Na camada de trofospongio, as células trofoblásticas e trofoblastos sinciciais não diferiram nos grupos experimentais. Não houve alteração histológica e histoquímica nos fígados dos neonatos, porém o número de células de Kupffer foi maior nos animais do grupo II quando comparado com o grupo I e o grupo III. Em conclusão, a ausência de luz mimetiza uma situação próxima do parto em decorrência da degeneração do trofospongio, enquanto a iluminação constante promove alterações morfológicas e morfométricas na placenta de ratas, porém sem afetar a histogênese hepática nos neonatos.

Palavras-chave: Placenta, Melatonina, Pineal, Histogênese hepática, Reprodução

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the possible effects of the interference photoperiodic on the morphology of the rat placenta and fetal liver histogenesis. Used 40 albino rats, which were divided into four groups. Group I - rats maintained in light / dark cycle of 12/12 hours for 60 days (control) and then mated, Group II - rats maintained in the dark for 60 days and then mated, Group III - rats maintained in light constant for 60 days and then mated, and Group IV - rats maintained in constant illumination for 60 days and then mated and treated with melatonin. The absence of light was obtained using a room of approximately 3m², totally fenced to not allow light to enter. The light stimulus was around 400 lux. Melatonin was administered in water at a dose of 400 mg of melatonin in 1 ml of absolute ethanol. The results showed vacuolization of trofospongio in Group II, most layer of the vascular labyrinth trophoblast giant cells and well developed, with large nuclei assuming a character in the hypertrophic group III. The morphological characteristic of the group IV was similar to group I. The histochemical analysis revealed no alterations in the collagen and elastic fibers, reticular and acidic glycosaminoglycans (GAGs). Statistical analysis of the placentas of animals in group III differed significantly from the other groups in the area of the hard placental syncytial trophoblast and in maternal and fetal vasculature in the labyrinth and the number of trophoblast giant cells. In trofospongio layer, the trophoblast cells and syncytial trophoblast did not differ between groups. There were histological and histochemical changes in the livers of newborns, but the number of Kupffer cells was higher in group II compared with group I and group III. In conclusion, The Absence illumination mimics a close to birth as a result of degeneration of trofospongio while the constant light promotes morphological and morphometric changes in the placenta of rats that did not affect the hepatic histogenesis in newborns.

Keywords: Placenta, Melatonin, Pineal gland, liver Histogenesis, Reproduction

SUMÁRIO

Capítulos		Pág.
I	INTRODUÇÃO.....	10
	REFERÊNCIAS.....	15
II	Efeito da iluminação constante sobre a placenta de ratas: um estudo morfológico, morfométrico e histoquímico.....	19
	RESUMO.....	19
	INTRODUÇÃO.....	20
	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
	RESULTADOS.....	24
	DISCUSSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	28
III	Efeito da iluminação constante e/ou ausência de luz sobre a histogênese hepática em ratos.....	38
	RESUMO.....	38
	INTRODUÇÃO.....	39
	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
	RESULTADOS.....	43
	DISCUSSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	48

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A pineal é uma glândula endócrina que age sob ritmos endógenos sincronizados, especialmente no ciclo claro-escuro (REITER, 1986). Tem um importante papel no controle neuroendócrino da fisiologia reprodutiva, além de regular ou tomar parte de numerosas funções no organismo (ALEANDRI; SPINA; MORINI 1996). Embriologicamente, esta glândula se origina de um adelgaçamento e evaginação da lâmina do teto do diencéfalo, sendo constituída por dois tipos celulares: os pinealócitos ou células principais, que constituem 95%, e as células intersticiais ou astrócitos, que constituem 5% do órgão (REITER, 1983).

A melatonina é um neurohormônio, sintetizado pela glândula pineal e é secretado ritmicamente (PABLOS et al., 1996). No entanto, segundo Lanoix et al. (2008), há evidências de que ocorra síntese e liberação de melatonina nos órgãos do trato gastrointestinal, nos rins, em células do sistema imune, no fígado e em algumas regiões do cérebro. A ritimicidade da produção circadiana da melatonina é captada via retina-hipotálamo em direção aos pinealócitos da pineal, sendo este hormônio uma indolamina lipofílica. Seu principal precursor de biossíntese é o aminoácido triptofano (LANOIX et al., 2006).

Os pinealócitos captam o triptofano do sangue ao mesmo tempo em que a noradrenalina interage com receptores adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos e desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares. O triptofano é convertido para serotonina através da hidroxilação via triptofano 5-hidroxilase e descarboxilação via aminoácido aromático descarboxilase. A serotonina é então convertida em N-acetil-serotonina pela enzima arilalquilamina N-acetil transferase. Por fim, a N-acetil-serotonina é metilada para a forma de melatonina pela enzima hidroxindole-O-metil transferase (HIOMT) (TAMURA, et al., 2008).

A melatonina tem mostrado papel chave na função reprodutiva de mamíferos, incluindo regulação da produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade funcional e crescimento ovariano,

redução do estresse oxidativo em folículos ovarianos, proteção dos oócitos contra radicais livres e diminuição de gonadotrofinas (GnRH) que regulam a concentração de FSH e LH. Além disso, a melatonina exibe propriedades oncostática, antienvhecimento e imunomodulatória (DEVOTO et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2002; GRAHAM et al., 2004).

Em adição, ela é capaz de mediar alguns desses efeitos por meio de duas classes de receptores. A primeira classe é o grupo de receptores de membrana da família de proteína-G acoplada designado de MT1 (Mel1a) e MT2 (Mel1b). A expressão de MT1 tem sido observada na pituitária, núcleo supraquiasmático do hipotálamo e em outras regiões do cérebro bem como em tecidos periféricos e na placenta durante o período de gestação (LEE et al., 2003). O receptor MT2 é expresso na retina humana, em células de coriocarcinomas, adipócitos humanos, folículo ovariano, próstata, rins, sistema imune e nas células trofoblásticas no primeiro trimestre da placenta humana (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; EKMEKCIOGLU, 2006).

A segunda classe é constituída por receptores nucleares pertencentes à subfamília de receptores RZR/ROR, o qual inclui o produto de três genes: RORalfa, RORbeta, RORgama (SMINORV, 2001). O receptor RORalfa é expresso em um largo número de tecidos incluindo testículo, rins, cérebro, linfócitos B, e têm sido reportado por regular respostas do sistema imune e desenvolvimento do sistema nervoso central (SMIRNOV, 2001; NAJI et al., 2004; POZO et al., 2004). Foi identificado ainda um terceiro receptor denominado de MT3, que é um homólogo da quinona redutase 2 em humanos, porém, pouco é sabido sobre este (NOSJEAN et al., 2000).

Em rato (*Rattus norvegicus albinus*), um reprodutor não sazonal, o pico de melatonina, tal qual em humanos, é alcançado durante a primeira metade da fase de escuro (em torno da meia noite), seguido por uma redução gradual na produção desse hormônio, na segunda metade da noite (REITER, 1983). Porém, esta espécie tem a função reprodutiva influenciada pelo fotoperíodo, pela administração de melatonina e pela pinealectomia (ALEANDRI; SPINA; MORONI 1996; SANTOS, 1996; TEIXEIRA et al., 2002).

Admiti-se que a pinealectomia produz alterações morfológicas nos ovários e útero. Quando ratas são submetidas à iluminação constante ou pinealectomizadas, desenvolvem ovários policísticos. Já no útero, estudos morfológicos revelaram epitélio endometrial bastante hipertrófico, com áreas apresentando brotos celulares, o estroma compacto, não edematoso, rico em fibras colágenas, e contendo poucas glândulas, as quais na maioria apresentam áreas de estratificação (DROBNIK; DABROWSKI, 1996; TEIXEIRA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2003; PRATA-LIMA, et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004).

Várias pesquisas têm demonstrado que os níveis de melatonina no plasma aumentam durante a gestação, atingindo valores elevados no final desse período, sugerindo que esse hormônio desempenhe um importante papel na manutenção da gestação (KIVELÄ 1991; BISHNUPURI; HALDAR 2000, 2001; NAKAMURA et al., 2001). Nos mamíferos placentários, a implantação é considerada o ponto crítico da gravidez, pois o sucesso da gestação requer o desenvolvimento de uma interação sincronizada entre o endométrio e o blastocisto para o desenvolvimento da placenta (APLIN 1991; RAMSEY 1983; CROSS; WERB; FISHER 1994).

A placenta é o primeiro órgão dos embriões de mamíferos (SIMMONS; CROSS 2005), o qual mantém a prenhez promovendo a sobrevivência e o crescimento do embrião no útero da mãe (CHOI et al., 2005; SIMMONS; CROSS, 2005). Além disso, facilita as trocas respiratórias e a transferência seletiva de muitas moléculas durante o período de tempo em que é mantida a integridade dos organismos maternal e fetal (ENDERS; BLANKENSHIP 1999).

Sua matriz extracelular é formada por uma complexa rede molecular que determina a histoarquitetura do tecido, desde células com função formadora até células com sinais de polarização, migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação. Essa matriz entra em contato com especializações de membrana como desmossomos, junções gap, zônula oclusiva e hemidesmossomo, sendo constituída por proteínas como proteoglicano de heparansulfato, laminina e integrina (MALASSINE; CRONIER, 2005; APLIN et al., 2009). Muitas das moléculas estruturais da matriz extracelular, bem como o colágeno, são proteínas que exercem diferentes funções biológicas (RUEHL, 2005).

Estudos bioquímicos demonstram que os colágenos do tipo I e III estão presentes no endométrio de ratas prenhas e que o colágeno tipo V é expresso após a decidualização (SPIESS; TEODORO; ZORN 2007). No córion da placenta existe colágeno tipo I, III, IV, V, VI e XV. O colágeno do tipo XV está relacionado com a formação das estruturas vasculares ou processos de fibrose. Os tipos I e III são estruturais e funcionalmente muito similares, mas geneticamente e imunologicamente distintos (GRIMAUD et al., 1980; YAMAMOTO et al., 1984). Já o colágeno do tipo V é responsável pela compatibilização, estabelecimento e modulação da ação dos fatores de crescimento, além de promover a regulação do diâmetro das fibras de colágeno, através da formação de fibras heterotípicas, constituídas mais freqüentemente pelo tipo I/V e III/V (LINSENMAYER, 1991).

De acordo com Kobayashi et al., (1999) e Slominski; Wortsman; Tobin (2005) os receptores da melatonina estão presentes nos fibroblastos e medeiam a ação fenotípica na proliferação e diferenciação celular, sugerindo que há alterações na concentração de colágeno durante a gravidez. Devemos mencionar ainda que a melatonina materna está envolvida nas funções fetais, pois atravessa a placenta, influenciando assim o fotoperíodo pré-natal através de seus receptores em diversos tecidos e mediando às interações fisiológicas fetais, principalmente o status hormonal em neonatos (YELLON; LONGO 1988; McMILLEN; NOWAK 1989; HOUGHTON et al., 1993; HELLIWELL; WILLIAMS 1994; GOLDMAN, 2003)

Sabe-se que a melatonina é um potente agente antioxidante que regula vários processos fisiológicos no fígado além de inibir o crescimento de hepatocarcinomas (OKATANI et al., 2003; GONG et al., 2003; BLASK et al., 2004; CARRILLO-VICO et al., 2005; OHTA et al., 2003). Estudos relatam a presença de receptores da melatonina tanto na membrana plasmática, como na carioteca das células hepáticas (PABLOS; AGAPITO; GUTIERREZ 1995; NAJI et al. 2004). Durante a gestação o fígado media a secreção de ânions orgânicos endógenos e exógenos, bem como sulfato de esteroides, onde a placenta facilita a transferência desses solutos do feto para a circulação materna (SERRANO et al., 2002; St-PIERRE et al., 2004). Assim, considerando que os estudos sobre a informação da transferência materna fotoperiódica em mamíferos indicam que o fotoperíodo diário percebido pela mãe, durante a gestação ou lactação, é comunicado ao feto pela placenta ou pelo leite a

presente pesquisa testou a hipótese de que o fotoperíodo interfere na morfologia e morfometria da placenta e na histogênese hepática dos neonatos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALEANDRI, V.; SPINA, V.; MORINI, A. The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update*, V. 2, N° 3, p.225-235, 1996.
- APLIN, J.D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation mechanistic: evidence in vivo and in vitro. *J. Cell.Sci.* V.99, N°4, p. 681-692, 1991.
- APLIN, J.D.; JONES, C.J.P.; HARRIS, L.K. Adhesion molecules in human trophoblast- A review I. Villous trophoblast. *Placenta*. V. 30, p. 293-298, 2009.
- BISHNUPURI, K.S.; HALDAR,C. Profile of organ weights and plasma concentrations of melatonin, estradiol and progesterone during gestationand post-partirition periods in female indian palm squirrel *Funambulus pennanti*.*Indian J. Exp. Biol.* V. 38, N°10, p. 974-981, 2000.
- BISHNUPURI, K.S.; HALDAR, C. Maternal transfer of melatonin alters tho growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Biol. Signais Recent.* V. 10, N°5, p. 317-325, 2001.
- BLASK, D. E.; DAUCHY, R. T.; SAUER, L. A.; KRAUSE, J. A. Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. *Carcinogenesis*, v. 25, n. 6, p. 951-960, 2004
- CARRILLO-VICO, A.; CALVO, JR.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; CHOI; W.S.; CHO, G.J.; WON, C.K.; KOH, P.O. Expression of melatonin growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy. *J. Vet. Science.* V.6, N°3, p. 179-183, 2005.
- CHOI; W.S.; CHO, G.J.; WON, C.K.; KOH, P.O. Expression of melatonin growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy. *J. Vet. Science.* V.6, N°3, p. 179-183, 2005.
- CROSS, J.C.; WERB, Z.; FISHER, S.J- Implantation and placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science.* V.266, p. 1508-1518, 1994.
- DEVOTO, L.; KOHEN, P.; VEJA, M.; CASTRO, O.; GONZALEZ, R.R.; RITAMALES, I.; CARVALHO, P.; CHRISTENSON, L.K.; STRAUN, J.F. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* V.186, p. 137-141, 2002.
- DROBNIK, J.; DABROWSKI, R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios*, V.85, p.51-58, 1996.
- DUBOCOVICH, M.L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* V. 27, p. 101-110, 2005.
- EKMEKCIOGLU, C. Melatonin receptors in human: Biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother.* V. 60, p. 97-108, 2006.
- ENDERS, A.C.; BLANKENSHIP, T.N. Comparative placental structure. *Elsevier Science.* V.38, p. 3-15, 1999.
- FUJIMOTO, A.; OSUGA, Y.; FUJIWARA, T.; YANO, T.; TSUTSUMI, O.; MOMOEDA, M.; KUGU, K.; KOGA, K.; MORETA, Y. Human chorionic gonadotrophin combined with progesterone for luteal suport improves pregnancy rate in patients with low late

midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J. Assist. Reprod. Genetic.* V. 19, p. 550-554, 2002.

GOLDMAN, B.D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. *Sciences's STKE.* V. 192, p. 29-31, 2003.

GONG, L. H.; REN, D. H ; XIONG, M.; LU, Z. Q.; WANG, X. M. Melatonin in in vitro apoptosis of H22 hepatocarcinoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*; v. 25, n. 6, p.550-554, 2003.

GRAHAM, L.H; SWANSON, W.F; WILAT, D.E; BROWN, J.L. Influence of oral melatonin on natural and gonadotrophin- induced ovarian function in the domestic cat. *Theriogenology.* V. 61, p. 1061- 1076, 2004.

GRIMAUD, J.A.; DRUGNET, M.; PEYROL, S.; CHEVALIER, D.; HERBAGE, D.; BADRAWY, N. *Cytochemic. J. Histochemic.* V. 28, p 1145-1156, 1980.

HELLIWEL, R.J.A; WILLIAMS, L.M. The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. *J. endocrinol.* v 142, p. 175-181, 1994.

HOUGHTON, D.C.; WALKER, D.W., YOUNG, I.R.; McMILLEN, I.C. Melatonin and the light-dark cicly separately influence daily behavioral and hormonal rhytms in the pregnant ewe and sheep fetus. *Endocrinology.* V 133, p. 90-98, 1993.

KIVELA, A.- Serum melatonin during human pregnancy. *Acta Endocrinol(Copenh).* v.124, N°3, p. 233-237, 1991.

KOBAYASHI, H.; SUN, G.W.; TANAKA, Y.; KONDO, T.; TERAQ, T. Serum hyaluronic acid levels during pregnancy and labor. *Obstet Gynecol.* v. 93, p. 480-484, 1999.

LANOIX, D.; OWLLETTE, R.; VAILLANCOURT, C. Expression of melatoninerpic receptor in human placenta choriocarcinoma cell lines. *Human Reprod.* v. 21, p. 1981-1989, 2006.

LANOIX, D.; BEGHADADI, H.; LAFOND, J.; VAILLANCOURT, C. Human placental trophoblast synthesize melatonin and expression it's receptors. *J. Pineal Res.* v. 45, p. 50-60, 2008

LEE, C.K; MOON, D.M; SLIN, C.S; KIM, H.; YOON, Y.D. Circadian expression of Mel 1a e PL-II gene in placenta: effect of melatonin on the PL-II gene expression in the rat placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 200, p. 57-60, 2003.

LINSENMYER, T.F. Collagen in: hay ed. *Biology of extracellular matrix.* v. 2, p. 7-43, 1991.

MALASSINE, A.; CRONIER, L. Involvement of gap junctions in placental function and development. *Biochem Biophys Acta.* v.17, p. 24-117, 2005.

McMILLEN, I.C.; NOWAK, R. Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasm melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J. endocrinology.* V 120, p. 159-161, 1989.

MEDEIROS, J. P.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; EVÊNCIO NETO, J. Ultrastructural analisis of pinealectomy and lack of light influence over collagen in the endometrium of rats. *International Journal of Morphology.* v. 21, n. 3, p.230 - 235, 2003.

- NAJI, L.; CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J. M.; CALVO, J. R. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci*; v. 74, n. 18, p. 2227-2236, 2004.
- NAKAMURA, Y. TAMURA, H.; KASHIDA, S.; TAKAYAMA, H.; YAMAGATA, Y.; KARUBE, A.; SUGINO, N.; KATO, H.- Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *J. Pineal Res.* v.30, N°1, p. 29-33, 2001.
- NOSJEAN, O.; FENO, H.; COGE, F. Identification of melatonin binding site MT3 as the quinone reductase-2. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 31311-31317, 2000.
- OHTA, Y.; KONGO, M.; KISHIKAWA, T. Therapeutic effect of melatonin on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. *Adv Exp Med Biol*; v. 527, p. 559-565, 2003.
- OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; REITER, R. J.; ENZAN, H.; MIYAHARA, Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol*, v. 469, n. 1-3, p. 145-152, 2003.
- PABLOS, M.I.; AGAPITO, M.T.; GUTIERREZ, R. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res.*, v. 19, p. 111-115, 1995.
- PABLOS, M.I.; AGAPITO, M.T.; GUTIERREZBARAJA, R.; REITER, R.J.; RECIO, J.M. Effect of calcium on melatonin secretion in chick pineal gland I. *Neuroscience*, v. 2, N° 3, p. 161-164, 1996.
- POZO, D.; GARCIA-MAURENO, S.; GUERRERO, J.M. RNA expression of nuclear receptor RZR/ROR α , melatonin membrane receptor MT, and hydroxyindole-o-methyltransferase in different population of human immune cells. *J. Pineal Res.* v. 37, p. 48-54, 2004.
- PRATA LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 37, n. 7, p. 987-995, 2004.
- RAMSEY, E.M. *The placenta human and animal*. New York: Praeger, 1983.
- REITER, R.J. The Pineal Gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. *Psychoneuroendocrinology*, v. 8, p. 34-40, 1983.
- REITER, R.J. The pineal gland: an important link to the environment. *Physiol. Sci.*, v.1, p. 202-205, 1986.
- RUEHL, M. The Elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. v. 280, n. 5, 2005.
- SERRANO, M.A.; BAYÓN, J.E.; PASCOLO, L.; TIRIBELLI, C.; OSTROW, J.D.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; MARIN, J.J.G. Evidence for Carrier-mediated Transport of Unconjugated Bilirubin Across Plasma Membrane Vesicles from Human Placental Trophoblast. *Placenta*. v. 23, n. 7, p. 527-535, 2002.
- SANTOS, J.M. Aspectos morfológicos do endométrio de ratas em estro permanente ou ooforectomizadas, tratadas com estrogênio e/ou dexametasona. São Paulo, 1996. [Tese de Mestrado- Escola Paulista de Medicina]

- SIMMONS, D.G.; CROSS, J.C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Elsevier Science*. v. 284, p. 12-24, 2005.
- SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; TOBIN, D.J. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: securing a place under the sun. *The FASEB Journal*. 2005.
- SMIRNOV, A.N. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)*. v.66, p. 19-26, 2001.
- SPIESS, K.; TEODORO, W.R.; ZORN, T.M. Distribution of collagen types I, III and V in pregnant mouse endometrium. *Connect Tissue Res*. v.48, n° 2, p 99-108, 2007.
- ST-PIERRE, M. V.; STALLMACH, T.; FREIMOSER GRUNDSCHOBER, A.; DUFOUR, J.-F.; SERRANO, M. A.; MARIN, J. J. G.; SUGIYAMA, Y.; MEIER, P. J. Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 287, p. 1505–1516, 2004.
- TAMURA, H; NAKAMURA, Y.; TERRON, H.P.; FLORES, L.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N.; REITER, R.J. Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology*. v. 25, p. 291-303, 2008.
- TEIXEIRA, A.A.C.; SIMÕES, M.J.; EVÊNCIO-NETO, J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Morphologic aspects of endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. *International Journal Morphology*. v. 20, n. 2, p. 145-149, 2002.
- TEIXEIRA, A.A.C.; SIMÕES, M.J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SOARES, JR.J.M. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the Constant illumination trats. *Int. J. Morphol*, v. 22, n. 3, p. 189-194, 2004.
- YAMAMOTO, M.; SUMIYOSHI, H.; NAKAGAMI, K.; TEHARA, E. *Acta Pathol*. v. 34, p. 77-86, 1984.
- YELLON S.M.; LONGO L.D. Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. *Biological Reproduction*. v 39, p. 1093–1099, 1988.

CAPÍTULO II

Efeito da iluminação constante ou ausência de luz sobre a placenta de ratas: um estudo morfológico, morfométrico e histoquímico

F.C.A. Silva^a; A.A.C. Teixeira^{a*}; V Wanderley Teixeira^a; A.J.J.M. Lemos^a

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br (AAC Teixeira)

Resumo

A presente pesquisa analisou o efeito da iluminação constante ou ausência de luz sobre a estrutura placentária de ratas, abordando parâmetros morfológicos, morfométricos e histoquímicos. 20 ratas albinas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 12hL/12hE por 60 dias, e acasaladas em seguida (GI); ausência de luz por 60 dias, e acasaladas em seguida (GII); iluminação constante por 60 dias, e acasaladas em seguida (GIII) e iluminação constante por 60 dias, acasaladas em seguida e tratadas com melatonina (GIV). O estímulo luminoso foi em torno de 400 lux. A melatonina foi administrada na água (400 mg/mL/etanol). Os resultados mostraram que no GII houve vacuolização das células do trofospongio, enquanto no GIII a camada do labirinto apresentou redução no número de trofoblastos sinciciais e maior vascularização materno-fetal, hiperplasia e hipertrofia das

células trofoblásticas gigantes, além de maior área do disco placentário. As placentas do GIV foram semelhantes às do GI. Histoquimicamente não houve alterações nas fibras colágenas, elásticas, reticulares e glicosaminoglicanas ácidas. Em conclusão, a iluminação constante promove alterações morfológicas e morfométricas na placenta de ratas podendo acarretar redução funcional e restrições ao crescimento fetal. Essas alterações são abolidas pela reposição oral de melatonina.

Palavras Chave: Pineal, reprodução, prenhez, roedores, fotoperíodo

1. Introdução

A melatonina é um neurohormônio, produzido pela glândula pineal que apresenta níveis séricos baixos durante o dia e elevados durante a noite, agindo assim, como um transdutor neuroendócrino de informações fotoperiódicas [1,2]. Nos mamíferos, incluindo o ser humano, o ritmo de secreção da melatonina é gerado, na fase de escuridão, por um relógio circadiano endógeno no núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo de onde partem fibras simpáticas eferentes para a glândula pineal, liberando norepinefrina, estimulando a sua síntese [3,4].

Nos mamíferos a melatonina tem mostrado um papel chave na função reprodutiva tanto em animais sazonais como nos não sazonais, caracterizando-se pela regulação na produção de estrógeno e progesterona, inibição da contratilidade uterina, regulação da atividade funcional e crescimento ovariano, redução do estresse oxidativo em folículos ovarianos e diminuição de gonadotrofinas (GnRH) que regulam a concentração de FSH e LH [5-7].

A literatura relata que tanto a pinealectomia como iluminação constante, após um período de três meses, produzem alterações morfológicas nos ovários e útero. Quando ratas são submetidas à iluminação constante ou pinealectomizadas, desenvolvem ovários policísticos. Já no útero, estudos morfológicos revelaram epitélio endometrial bastante

hipertrófico, com áreas apresentando brotos celulares, estroma compacto, não edematoso, rico em fibras colágenas, e contendo poucas glândulas, as quais na maioria apresentam áreas de estratificação [8-11].

Várias pesquisas têm demonstrado que os níveis de melatonina no plasma aumentam durante a gestação, atingindo valores elevados no final desse período, sugerindo que esse hormônio desempenhe um importante papel na manutenção da gestação [12-14]. Nos mamíferos placentários, a implantação é considerada o ponto crítico da gravidez, pois o sucesso da gestação requer o desenvolvimento de uma interação sincronizada entre o endométrio e o blastocisto para o desenvolvimento da placenta [15].

No trato reprodutivo das ratas, os receptores de melatonina foram encontrados nos ovários e no estroma antimesometrial uterino. À medida que a decidualização do estroma uterino durante a gravidez avança, os sítios de ligação da melatonina são progressivamente reduzidas e se limita ao estroma antimesometrial. Além disso, sabe-se que durante a gestação os estrogênios aumentam a síntese e a quantidade da matriz extracelular, principalmente no que diz respeito ao colágeno e às glicosaminoglicanas [16].

Alguns pesquisadores têm relatado que ratas pinealectomizadas ou submetidas à iluminação constante, quando acasaladas, apresentam redução no número de sítios implantados, relacionando tal efeito à interferência com o processo de ovulação [12,17,18]. Porém, não há relatos dos possíveis efeitos do fotoperíodo sobre o desenvolvimento placentário. Assim, testamos a hipótese de que a exposição a iluminação constante ou ausência de luz, antes e durante a prenhez, pode afetar a estrutura placentária de ratas, nos parâmetros morfológicos, morfométricos e histoquímicos.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, a quais foram divididas nos seguintes grupos: I - ratas mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 horas por 60 dias, e acasaladas em seguida (controle); II - ratas mantidas em ausência de luz por 60 dias, e acasaladas em seguida; III - ratas mantidas em iluminação constante por 60 dias, e acasaladas em seguida, e IV - ratas mantidas em iluminação constante por 60 dias, acasaladas em seguida e tratadas com melatonina.

2.1 Ausência de Luz

A ausência de luz foi obtida utilizando-se uma sala de aproximadamente 3m², totalmente vedada para não permitir a entrada de luz.

2.2 Estímulo Luminoso Constante

Foi obtido utilizando-se uma caixa de madeira com área 0,5 m², com frestas para permitir a ventilação, contendo duas lâmpadas fluorescentes, marca PHILLIPS, de 40 W, as quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 400 lux.

2.3 Tratamento com melatonina

A melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) foi administrada à água dos bebedouros na dose de 5µg/mL em frascos âmbar, das 18:00 às 6:00 horas, aos animais do grupo IV, após confirmação do acasalamento. Durante o dia foi feita restrição à água [8,19].

Às ratas dos grupos GI, GII e GIII foram administrados a mesma concentração de solução de etanol na água dos bebedouros.

2.4 Acasalamento dos Animais e Diagnóstico da Prenhez

Após 60 dias do início do experimento as fêmeas de todos os grupos foram acasaladas na proporção de um macho para três fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã do dia seguinte sempre às 06:00h, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se com parâmetro a presença de espermatozóides nos esfregaços vaginais.

2.5 Análise Morfológica e Histoquímica das Placentas

Cinco fêmeas de cada grupo foram eutanasiadas no décimo quarto dia de gestação. Para tanto, as fêmeas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular. Os fragmentos da placenta foram fixados em Bouin, processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E), tricromico de Mallory (fibras colágenas), Orceína (fibras elásticas), Impregnação argêntica (fibras reticulares) e Alcian blue pH 2,5 (glicosaminoglicanas ácidas). As reações histoquímicas foram classificadas em intensa (++) , moderada (±) e fraca (+).

2.7 Análise Morfométrica das Placentas

Foi realizada através da captura de imagens por meio de câmera de Vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx50, e submetidas ao aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao do programa ImagemLab 2000 para Windows. Na

captura, foram utilizadas cinco lâminas de cada grupo, sendo medidos cinco campos em cada disco placentário. A análise dos elementos do disco placentário foi realizada segundo a metodologia de Souza et al. [20]. Em cada lâmina foram contados 10 campos aleatórios, com quatro repetições, perfazendo um total de 1000 pontos por lâmina, sendo quantificados os seguintes parâmetros: Na região do labirinto: 1-Trofoblasto sincicial, 2- Vasos fetais e 3- Vasos maternos. Na região do trofospongio/células trofoblásticas gigantes: 1-Células trofoblásticas, 2- Trofoblasto sincicial e 3-Células trofoblásticas gigantes.

2.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio de métodos não-paramétricos de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% de significância.

3. Resultados

3.1. Análise Morfológica e Histoquímica das Placentas

Na análise morfológica das placentas dos animais do grupo I observou-se a presença da região da decídua bastante vascularizada e a região do disco placentário bem desenvolvido, com as três camadas: camada do labirinto, região mais externa e a mais espessa, caracterizada pela presença de numerosas lacunas contendo vasos maternos e fetais. A camada do trofospongio na qual se observa trofoblastos indiferenciados. A última camada é formada pelas células trofoblásticas gigantes, as quais se misturam com a decídua (Fig. 1A, B, C, D).

No grupo II observou-se também a região da decídua vascularizada e no disco placentário, as regiões do labirinto e trofospongio apresentaram as mesmas características

observadas no grupo I. No entanto, foi observado vacuolização das células do trofospongio (Fig. 2A). No grupo III, de modo geral, as características morfológicas das placentas foram semelhantes aos grupos I e II, diferindo, no entanto, pelo fato do grupo III apresentar a camada do labirinto mais vascularizada, além das células trofoblásticas gigantes bastante desenvolvidas, com núcleos volumosos assumindo um caráter hipertrófico (Fig. 2B, C). As características morfológicas das placentas do grupo IV foram semelhantes às observadas no grupo I (Fig. 2D). A análise histoquímica não revelou alterações nos parâmetros fibras colágenas, elásticas, reticulares e glicosaminoglicanas ácidas (GAGs) (Tabela 1).

3.2. Análise Morfométrica das Placentas

A análise estatística das médias da área total do disco placentário mostrou que o grupo III apresentou a maior média diferindo significativamente dos outros grupos experimentais, os quais não diferiram entre si (Tabela 2). Nesse grupo também foram evidenciadas diferenças significativas nos parâmetros trofoblastos sinciciais e vascularização materna e fetal na região do labirinto (Tabela 3), além do aumento no número de células trofoblásticas gigantes (Hiperplasia) (Tabela 4). Na camada de trofospongio, as células trofoblásticas e trofoblastos sinciciais não diferiram nos grupos experimentais.

4. Discussão

A interrupção do período de escuridão pela luz suprime a produção de melatonina endógena em gestantes quando expostas frequentemente a luz noturna e pode provocar algumas complicações durante a gravidez, como por exemplo, o aborto [21]. Os resultados da presente pesquisa mostraram alterações apenas nos aspectos morfológicos e morfométricos nas placentas das ratas submetidas à iluminação constante antes e durante a prenhez, e que a

reposição oral da melatonina evita tais efeitos. No entanto, a ausência de luz produziu nas placentas uma acentuada vacuolização nas células do trofospongio indicando um processo degenerativo [18]. Isto implica que a exposição à ausência de luz antes e durante a gestação pode resultar em danos reprodutivos, pois o trofospongio durante a formação da placenta corioalantóica, localiza-se na parte externa da placenta em contato com o endométrio, dando origem a sinciciotrofoblasto e células trofoblásticas gigantes, as quais são importantes para crescimento e manutenção placentária [22-24]. Adicionalmente podemos mencionar ainda que o peso da glândula pineal e níveis de melatonina, que são elevados em fêmeas de ratas não prenhas, diminui acentuadamente durante o início da concepção, aumentando gradualmente até o final da gestação, e, em seguida, atingindo níveis bastante elevados na proximidade do parto. Este fato sugere o estabelecimento de uma relação inversa antes da gravidez, seguida por atividade moderada alta com uma correlação positiva durante a gravidez e súbito aumento na atividade da glândula pineal durante o parto [25]. Assim, podemos inferir que as fêmeas submetidas à ausência de luz, em decorrência dos níveis elevados de melatonina, pode ter mimetizado uma situação próxima ao parto, caracterizado pela degeneração do trofospongio e menor desenvolvimento das células trofoblásticas gigantes.

Os aspectos morfológicos e morfométricos observados nas células trofoblásticas gigantes das placentas dos animais do grupo III podem estar relacionados com o fato de que, quando ratas são submetidas à pinealectomia ou iluminação constante apresentam baixos níveis de melatonina na corrente sanguínea e conseqüentemente maior ação dos hormônios estrógenos e andrógenos [10,11], que estimulam a diferenciação morfológica e funcional do trofoblasto [26-28] durante a gestação, pois na ausência de luz, o aumento da melatonina na corrente sanguínea é responsável por inibir a sinalização de cAMP via receptor MT1 reduzindo assim, os níveis estrogênicos na placenta e conseqüentemente diminuindo o desenvolvimento das células trofoblásticas gigantes [29]. Neste contexto podemos também

supor que o aumento do número de células trofoblásticas gigantes poderia explicar a redução do número das trofoblastos sinciciais na camada do labirinto observado no grupo III, pois estas células estão envolvidas na formação das células trofoblásticas gigantes [30].

Com relação à evidência morfométrica da maior vascularização no labirinto do disco placentário das ratas do grupo III, sabe-se que o período peri-implantação em mamíferos é caracterizado por alterações morfológicas e funcionais no útero, acompanhadas de remodelação vascular denominada de angiogênese. Esse último evento é importante para os processos de proliferação no útero e é necessário para o desenvolvimento tanto da placenta quanto dos embriões, tendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como o principal responsável pela regulamentação de mudanças vasculares [31-35]. Estudos relataram que a melatonina em concentrações farmacológicas pode suprimir o RNAm do VEGF e conseqüentemente promover um declínio na produção desse fator [36,37], sugerindo que o hormônio da pineal pode controlar e agir como uma molécula anti-angiogênica natural.

Outra hipótese para o aumento da vascularização seria o estabelecimento da hipoxia placentária, pois a pinealectomia induz a uma hipóxia levando a um aumento do VEGF com um conseqüente aumento da permeabilidade vascular [38]. Isto é reforçado por estudos onde animais submetidos à ausência de luz, demonstraram uma supressão da expressão do RNAm do VEGF e uma diminuição do nível do fator indutor da hipoxia (HIF-1) [39].

Entre os trofoblastos sinciciais e as células endoteliais dos capilares maternos e fetais observou-se uma fina camada de matriz extracelular que não apresentou alterações histoquímicas indicando a preservação dos constituintes essenciais para manutenção dos mecanismos de barreira hemato-placentária e de regulação na transferência de substâncias entre os compartimentos materno e fetal [40].

Segundo Tamura et al. [21] a melatonina pode atuar durante a gestação por diversos caminhos, desempenhando funções como modulador do ritmo circadiano e endócrino, imunomodulador e antioxidante, fatores que parecem ser essenciais para uma gestação bem sucedida. Porém, em nosso estudo foi demonstrado que a exposição à iluminação constante promove aumento na espessura e vascularização da placenta, sugerindo um amadurecimento precoce desse órgão, pois na clínica humana o aumento da espessura e vascularização, dentre outros fatores, são indícios do amadurecimento placentário, como parte de um processo natural, porém devem ser distinguidas das patologias, pois modificações macroscópicas e microscópicas têm sido associadas a gestações complicadas, principalmente no parâmetro espessura, sugerindo uma relação entre a precocidade placentária e o declínio de sua função [41,42]. Assim, podemos concluir que a iluminação constante promove alterações morfológicas e morfométricas na placenta de ratas podendo acarretar redução funcional e conseqüentemente restrições ao crescimento fetal. Essas alterações podem ser abolidas pela reposição de melatonina.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Referências

- [1] Reiter RJ. The pineal gland: an important link to the environment. *Physiol Sci* 1986;1:202-5.
- [2] Pablos MI, Agapito MT, Gutierrezbaraja R, Reiter RJ, Recio JM. Effect of calcium on melatonin secretion in chick pineal gland I. *Neuroscience* 1996;217(2-3):161-4.

- [3] Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med* 1998;30(1):103–8. *J Pineal Res* 2005;38:217–22.
- [4] Reiter RJ, Dun-Xian T, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009;81(3):445–56.
- [5] Devoto L, Kohen P, Veja M, Castro O, Gonzalez RR, Ritamales I, et al. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186(2):137-41.
- [6] Fujimoto A, Osuga Y, Fujiwara T, Yano T, Tsutsumi O, Momoeda M, et al. Human chorionic gonadotrophin combined with progesterone for luteal support improves pregnancy rate in patients with low late midluteal estradiol levels in IVF cycles. *J Assist Reprod Genetic* 2002;19(12):550-4.
- [7] Graham LH, Swanson WF, Wilat DE, Brown JL. Influence of oral melatonin on natural and gonadotrophin- induced ovarian function in the domestic cat. *Theriogenol* 2004;61(6):1061-76.
- [8] Teixeira AAC, Simões MJ, Evêncio-Neto J, Wanderley-Teixeira V. Morphologic aspects of endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. *Int J. Morphol* 2002;20(2):145-9.
- [9] Medeiros JP, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC, Baratella-Evêncio L, Evêncio Neto J. Ultrastructural analysis of pinealectomy and lack of light influence over collagen in the endometrium of rats. *Int J Morphol* 2003;21(3):230-5.
- [10] Prata Lima MF, Baracat EC, Simões MJ. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(7):987-95.
- [11] Teixeira AAC, Simões MJ, Wanderley-Teixeira V, Soares Jr JM. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int J Morphol* 2004;22(3):189-94.

- [12] Bishnupuri KS, Haldar C. Profile of organ weights and plasma concentrations of melatonin, estradiol and progesterone during gestation and post-parturition periods in female Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. Indian J Exp Biol 2000;38(10):974-81.
- [13] Bishnupuri KS, Haldar C. Maternal transfer of melatonin alters the growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. Biol Signais Recent 2001; 10(5):317-25.
- [14] Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube A. et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. J Pineal Res 2001;30(1):29-33.
- [15] Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and placenta: Key pieces of the development puzzle. Science 1994;266(5190):1508-18.
- [16] Soares Jr JM, Masana MI, Ersahin C, Dubocovich ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. J Pharmacol Exp Ther 2003;306(2):694-702.
- [17] Soares Jr JM, Simões MJ, Oshima CT, Mora OA, De Lima GR, Baracat EC. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. Gynecol Endocrinol 2003;17(2):115-23.
- [18] Dair M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl_2 in cultured cancer cells. J Pineal Res 2008;44(2):121-6.
- [19] Trentini GP, Genazzani AR, Criscuolo M, Petraglia F, Gaetani C, Ficarra G. et al. Melatonin treatment delays reproductive aging of female rat via the opiate system. Neuroendocrinol 1992;56(3):364-70.

- [20] Souza GN, Cordioli E, Simões MJ, Souza E, Júnior LK, Camano L. Alterações morfológicas na contagem de fibras colágenas induzidas pela hialuronidase no colo de ratas prenhas. *Rev Bras Ginecol* 2003;25(4):249-54.
- [21] Tamura H, Nakamura Y, Pilar Terron M, Flores LJ, Manchester LC, Dun-Xian T, et al. Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol* 2008;25(3):291–303.
- [22] Carter AM, Enders AC Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2(46):1–15.
- [23] Carter AM. Sources for comparative studies of placentation I. Embryological collections. *Placenta* 2008;29(1):95-8.
- [24] Kanashiro C, Santos TC, Miglino MA, Mess AM, Carter AM. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7(57): 1-13.
- [25] Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino, N, et al. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinol* 1998;139(5):2432-42.
- [26] Haldar C, Yadav R. Melatonin, gestation and fetal development. *J Endocrinol Reprod* 2006;10(1):32-42.
- [27] Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A. Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 1999;20(8):669-76.
- [28] Natale A, Candiani M, Merlo D, Izzo S, Gruft L, Busacca M. Human chorionic gonadotrophin level as a predictor of trophoblastic infiltration into the tubal wall in ectopic pregnancy: a blinded study. *Fertil Steril* 2003;30(4):29-33.
- [29] Sutherland A. Mechanism of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Develop Biol* 2003;258(2):241-51.

- [30] Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002;309(1):151-62.
- [31] Borski RJ, Hyde GN, Fruchtman S. Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release. *Steroids* 2002;67(6):539–48.
- [32] Carvalho AF, Mançanares CAF, Pereira FTV, Ambrósio CEM, Miglino A. Imunolocalização de receptores de progesterona nas células trofoblásticas binucleadas na placenta de búfalo (*Bubalus bubalis*). *Biotemas* 2007;20(2):99-106.
- [33] Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114(2):521–32.
- [34] Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D’Amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med* 1997;3(4):443–6.
- [35] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626):671–4.
- [36] Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum Reprod Update* 1998;4(5):509–19.
- [37] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18(1):4–25.
- [38] Lopes FL, Desmarais J, Gévy NY, Ledoux S, Murphy BD. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* 2003;68(5):1926–33.
- [39] Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinol Lett* 2001;22(1):457.

- [40] Albrecht ED, Robb VA, Pepe GJ. Regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J Clin Endocrinol Metabol* 2009;89(11):5803-9.
- [41] Niklaus AL, Aberdeen GW, Babischkin JS, Pepe GJ, Albrecht ED. Effect of estrogen on vascular endothelial growth/permeability factor expression by glandular epithelial and stroma cells in the baboon endometrium. *Biol Reprod* 2003;68(6):1997-2004.
- [42] Resnik, R. Intrauterine growth restriction. *Am Coll Obstetric Gynecol.* 2002;99(3):490-6.

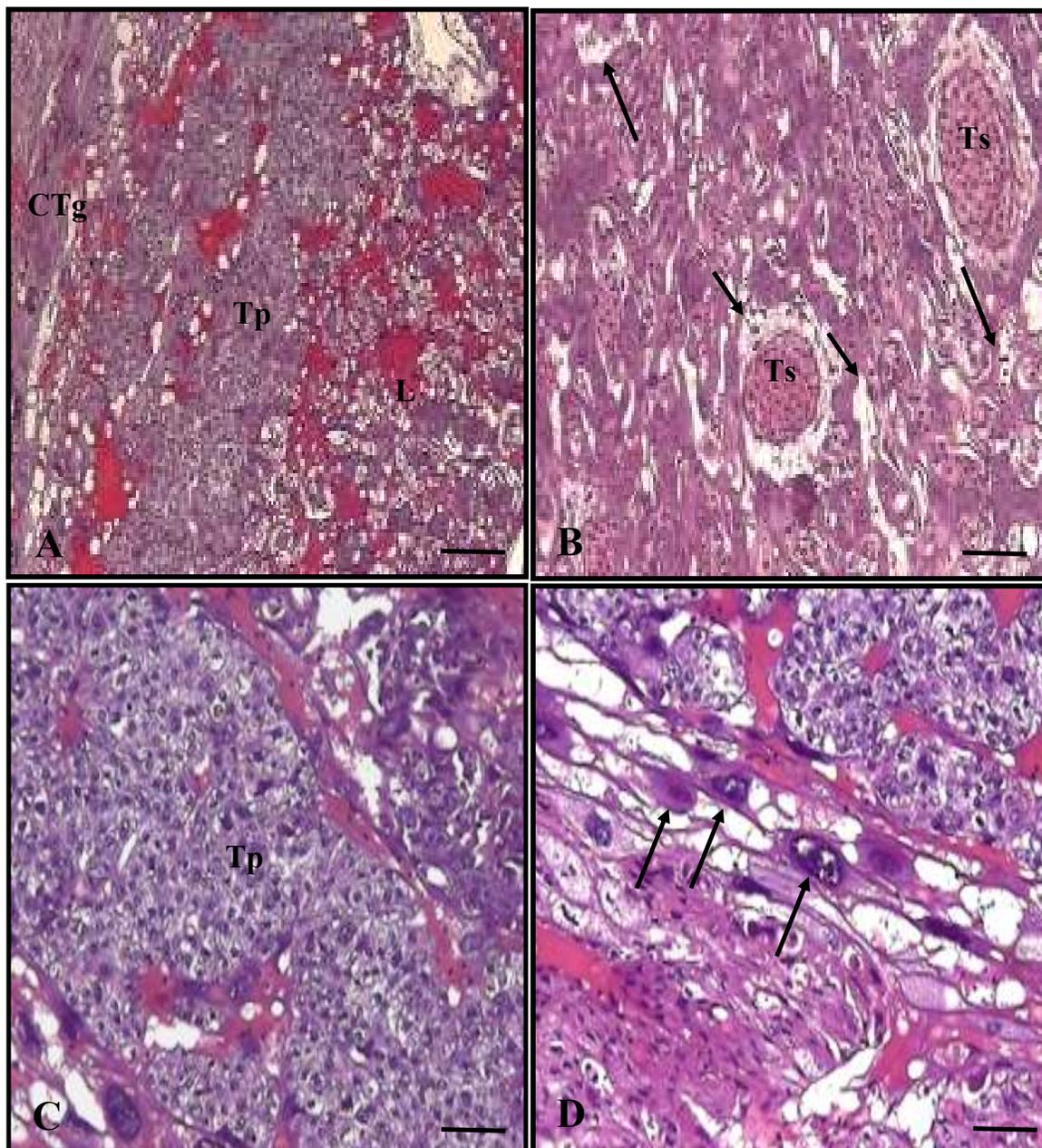


Fig1. A- Disco placentário de rata do grupo I: labirinto (L), trofospongio (Tg) e Célula trofoblástica gigante (CTg). Barra = 200 μ m. B- Labirinto contendo vasos maternos (setas curtas), vasos fetais (setas longas) e Trofoblasto sincicial (Ts). Barra = 100 μ m. C e D – Detalhe do Trofospongio (Tp) e células trofoblásticas gigantes (setas), respectivamente. Barras = 25 μ m. Coloração H.E.

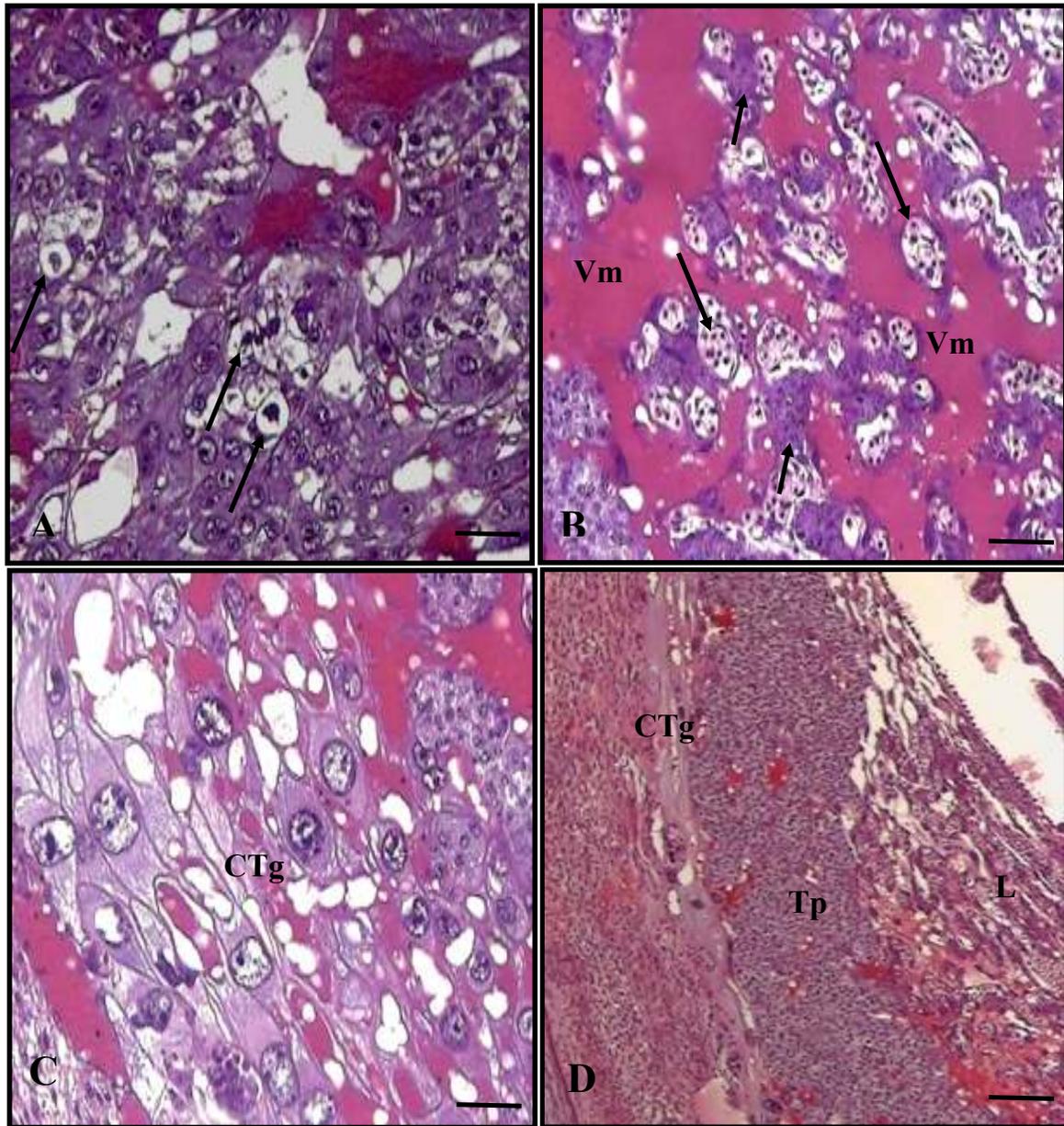


Fig. 2. A- Trofospongio (grupo II): células apresentando acentuada vacuolização (setas). Barra = 25 μ m. B- Labirinto (grupo III): vasos maternos (Vm), vasos fetais (setas longas) e Trofoblasto sincicial (Ts). Barra = 100 μ m. C- Células trofoblásticas gigantes (CTg) apresentando hipertrofia. Barra = 25 μ m. D- Disco placentário (grupo IV): labirinto (L), trofospongio (Tp) e células trofoblásticas gigantes (CTg) como morfologia semelhante ao controle. Barra = 200 μ m. Coloração H.E.

Tabela 1: Histoquímica do disco placentário nos grupos experimentais. Reação intensa (++) , moderada (±) e fraca (+).

	GI	GII	GIII	GIV
Fibras colágenas	++	++	++	++
Fibras elásticas	+	+	+	+
Fibras reticulares	±	±	±	±
GAGs ácidas	+	+	+	+

Tabela 2: Média (µm) e desvio padrão da área total do disco placentário nos grupos experimentais

GI	GII	GIII	GIV	F^P
694,45±26,87a	745,55±19,72a	871,40±56,31b	622,63±53,44a	5,402 ^{0,0029}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 3: Média e desvio padrão dos elementos constituintes da região do labirinto do disco placentário nos grupos experimentais.

	GI	GII	GIII	GIV	F^P
VM	0,19 ± 0,16a	0,16 ± 0,18a	1,61 ± 1,16b	0,22 ± 0,25a	4,95 ^{0,0128}
VF	44,66 ± 4,4a	44,22 ± 3,40a	50,53 ± 7,75b	41,36 ± 4,38a	32,38 ^{0,0001}
TS	53,91 ± 4,32a	52,50 ± 2,93a	44,31 ± 4,27b	50,97 ± 1,03a	70,52 ^{0,0001}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

VM = vasos maternos; VF = vasos fetais e TS = trofoblasto sincicial.

Tabela 4: Média e desvio padrão dos elementos constituintes da região do trofospongio e células trofoblásticas gigantes.

	GI	GII	GIII	GIV	F^P
CT	10,91 ± 1,30a	9,58 ± 0,96a	10,34 ± 1,87a	8,85 ± 3,62a	2,615 ^{0,0869}
TS	0,82 ± 0,23a	0,95 ± 0,40a	1,08 ± 0,36a	1,23 ± 0,04a	6,101 ^{0,0657}
CTG	7,85 ± 0,40a	6,35 ± 3,60a	13,26 ± 0,25b	8,57 ± 2,17a	17,052 ^{0,0001}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

CT = células trofoblástica; TS = trofoblasto sincicial e CTG = célula trofoblástica gigante

CAPÍTULO III

EFEITO DA ILUMINAÇÃO CONSTANTE OU AUSÊNCIA DE LUZ SOBRE A HISTOGÊNESE HEPÁTICA EM RATOS

F.C.A. Silva^a; A.A.C. Teixeira^{a*}; V Wanderley Teixeira^a; A.J.J.M. Lemos^a

*^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Recife, Brasil*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br (AAC Teixeira)

Resumo

A presente pesquisa objetivou analisar o efeito do fotoperíodo por 60 dias, sobre a histogênese hepática em ratos neonatos. 20 ratas albinas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 12hL/12hE por 60 dias, e acasaladas em seguida (GI); ausência de luz por 60 dias, e acasaladas em seguida (GII); iluminação constante por 60 dias, e acasaladas em seguida (GIII) e iluminação constante por 60 dias, acasaladas em seguida e tratadas com melatonina (GIV). O estímulo luminoso foi em torno de 400 lux. A melatonina foi administrada na água (400 mg/mL de etanol). Os resultados demonstraram no fígado uma delgada cápsula de tecido conjuntivo, a presença de veias com diversos calibres, hepatócitos volumosos em torno da veia centro lobulares, além da presença de células hematopoéticas e

capilares sinusóides, características essas, comuns aos neonatos dos grupos I, II e III. Vale salientar, que as fêmeas do grupo IV não obtiveram sucesso na gestação. A reação pelo P.A.S. foi positiva nos fígados dos neonatos. Além disso, não houve diferenças estatísticas entre as médias do peso dos neonatos (PN). Em contra partida, a quantidade de células de Kupffer (CK) foi maior nos animais do grupo II quando comparado com o grupo I e o grupo III. Em conclusão, a iluminação constante ou a ausência de luz não promove alterações morfológicas no fígado de ratos neonatos

Palavras Chave: Pineal, Neonatos, prenhez, roedores, fotoperíodo

1. Introdução

O hormônio melatonina exerce importante função no fígado regulando vários processos fisiológicos nesse órgão, agindo como um antioxidante e eliminador de radicais livres (Elsokkary et al., 2000, 2002; Reiter et al., 2000), além de inibir o crescimento de hepatocarcinomas (Ohta et al, 2003; Okatani et al.,2003; Gong et al., 2003; Blask et al., 2004; Carrillo-Vico et al., 2005). Segundo Martins et al. (2009) a atividade antioxidante desse hormônio é devido a sua natureza lipofílica e hidrofílica, sua habilidade para passar todas as bio-barreiras com facilidade, e a sua disponibilidade para todos os tecidos e células.

Estudos relatam a presença de receptores da melatonina tanto na membrana plasmática, como na carioteca das células hepáticas (Pablos et al.,1995; Naji et al. 2004). Além disso, de acordo com Menendez-Pelaez et al. (1993), os receptores para melatonina são elevados especialmente no núcleo e nas mitocôndrias.

Sabe-se que a melatonina materna está envolvida nas funções fetais, pois atravessa a placenta, influenciando assim o fotoperíodo pré-natal através dos receptores deste hormônio em diversos tecidos e mediando às interações funcionais fisiológicas fetais, principalmente o status hormonal em neonatos (Yellon e Longo 1988; Mcmillen et al., 1989; Helliwell e

Williams 1994; Goldman, 2003), em um número variado de espécies como ratos, ovelhas, primatas e humanos (Bishinupuri e Haldar, 2001).

Durante a gestação, a mãe gera sinais que permitem que o feto perceba o comprimento do dia, assim como a fase do ciclo claro-escuro, pois estudos realizados em diversas espécies de mamíferos mostraram que, durante a vida fetal, o núcleosupraquiasmático (NSQ) materno funciona como um relógio biológico oscilando em fase de tempo com a luz ambiente (El-Sokkary et al., 2006). Além disso, Stetson et al. (2000) relatam que a condição fotoperiódica experimentada pela mãe, especialmente durante a gestação é comunicada ao feto estimulando ou inibindo a atividade da glândula pineal.

Zhao et al. (2002), em estudos com fêmeas de carneiros pinealectomizadas ou submetidas à iluminação constante demonstraram um atraso do crescimento corporal dos neonatos e aumento do estresse oxidativo, pois durante este período os filhotes estavam em déficit de melatonina materna, além do seu próprio ritmo de melatonina ainda não está estabelecida. Isso ocorre porque o ritmo de melatonina no feto é estabelecido após 1 semana ou 10 dias pós-natal. Devemos mencionar ainda que durante a gestação o fígado medeia a secreção de ânions orgânicos endógenos e exógenos, bem como sulfato de esteroides, onde a placenta facilita a transferência desses solutos do feto para a circulação materna (Serrano et al., 2002; St-Pierre et al., 2004).

Considerando que as pesquisas sobre a informação da transferência materna fotoperiódica em mamíferos indicam que o fotoperíodo diário percebido pela mãe, durante a gestação, é comunicado ao feto pela placenta a presente pesquisa investigou a hipótese de que ratas prenhas submetidas à iluminação constante ou ausência de luz por 60 dias, pode provocar alterações na histogênese hepática nos neonatos.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas 20 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 180 ± 200 g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As fêmeas foram mantidas em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 24^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40 W), que estabeleceu o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas.

Após um período de adaptação, foram colhidas as secreções vaginais para a determinação do ciclo estral. As fêmeas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram divididas, ao acaso, em quatro grupos: Grupo I - ratas mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12 horas por 60 dias, e acasaladas em seguida (controle); Grupo II - ratas mantidas em ausência de luz por 60 dias, e acasaladas em seguida; Grupo III - ratas mantidas em iluminação constante por 60 dias, e acasaladas em seguida; Grupo IV - ratas mantidas em iluminação constante por 60 dias, e acasaladas em seguida e tratadas com melatonina.

2.1 Ausência de Luz

A ausência de luz foi obtida utilizando-se uma sala de aproximadamente 3m^2 , totalmente vedada para não permitir a entrada de luz, onde as fêmeas permaneceram nas mesmas condições de temperatura do grupo controle.

2.2 Estímulo Luminoso Constante

Foi obtido utilizando-se uma caixa de madeira com área $0,5\text{ m}^3$, com frestas para permitir a ventilação, contendo duas lâmpadas fluorescentes, marca PHILLIPS, de 40 W, as

quais forneceram luminosidade adequada e suficiente, em torno de 400 lux. Esta caixa permaneceu durante todo o experimento dentro do biotério a uma temperatura de aproximadamente 22°C, contendo os animais dos grupos III e IV.

2.3 Tratamento com melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) foi administrada à água dos bebedouros em frascos âmbar, das 19:00 às 7:00 horas, aos animais do grupo IV. Durante o dia foi feita restrição hídrica (Trentini et al., 1992; Teixeira et al., 2002). A solução de melatonina foi preparada diariamente dissolvendo-se 400 mg de melatonina cristalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) em 1 mL de etanol absoluto, e esta solução diluída posteriormente em um litro de água de torneira. Às ratas dos grupos GI, GII e GIII foram administrados a mesma concentração de solução de etanol na água dos bebedouros.

2.4 Análise Morfológica e Histoquímica do Fígado dos Neonatos

Para a análise morfológica do fígado, cinco fêmeas de cada grupo foram acompanhadas durante toda a gestação (21 dias) até o nascimento dos filhotes, os quais foram eutanasiados para a colheita do fígado, que foi fixado em Bouin por 48 horas. Após esses procedimentos, os fígados foram clivados, obtendo-se fragmentos, os quais foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica[®] RM 2035) ajustado para 3 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em sequência, os cortes foram submetidos a técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E) e Ácido Periódico de Schiff (P.A.S),

analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS® BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS® BX-50.

2.5 Análise Morfométrica do Fígado

O estudo morfométrico foi realizado segundo a metodologia descrita por Engelman et al. (2001). Foi determinada a quantidade de células de Kupffer em preparações coradas pela hematoxilina-eosina, nas quais se pôde evidenciar o núcleo alongado e característico das células em relação aos núcleos volumosos e arredondados dos hepatócitos. Utilizou-se uma quadrícula com 100 pontos-teste, colocada sobre os cortes das preparações histológicas coradas pelo Hematoxilina-eosina. A contagem foi feita em cinco lâminas de maneira que foram contados 10 campos aleatórios, utilizando-se a objetiva de 40x, perfazendo um total de 5.000 pontos por grupo.

2.8 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados morfométricos foi realizada no programa computacional InStat (Stat Soft, 2001). Para análise dos resultados realizou-se métodos não-paramétricos de Kruskal-Wallis ($p \geq 0,05$).

3. Resultados

3.1 Análise Morfológica e Histoquímica

No fígado foi evidenciada externamente uma delgada cápsula de tecido conjuntivo. Ainda nesse órgão, verificou-se a presença de veias com diversos calibres, hepatócitos volumosos em torno da veia centro lobular, além da presença de células hematopoéticas e capilares sinusóides (Figs. 1A e 1B). Essas características foram comuns aos neonatos dos

grupos I, II e III. Vale salientar, que as fêmeas do grupo IV não obtiveram sucesso na gestação. A reação pelo P.A.S. foi positiva nos fígados dos neonatos (Figs. 1C e 1D).

3.3 Peso dos neonatos e análise morfométrica do fígado

Não houve diferenças estatísticas entre as médias do peso dos neonatos (PN) (Tabela 1), número dos neonatos (RN) (Tabela 2), quantidade de capilares sinusóides (CS) (Tabela 3) e células hematopoéticas (CH) (Tabela 4). Em contra partida, a quantidade de células de Kupffer (CK) foi maior nos animais do grupo II quando comparado com o grupo I e III (Tabela 5).

4. Discussão

O fígado é um órgão envolvido nos processos metabólicos de destoxificação, sendo equipado por uma variedade de enzimas antioxidantes (Kireev et al., 2007). Durante a prenhez, o fígado é acompanhado por um aumento da atividade metabólica e um aumento de oxigênio tecidual tanto na mãe quanto no feto (Sainz et al., 2000). Dessa forma, o resultado da análise morfológica demonstrou que o fígado dos neonatos apresentou características histológicas semelhantes nos grupos I, II e III. Isso pode está relacionado com o fato de que a melatonina exerce um papel protetor sobre esse órgão, pois segundo Ostondag et al., (2000); Nava et al., (2000); Luo et al., (2004); Zhang, et al., (2006), a melatonina tem função de prevenir danos produzidos por agentes oxidantes ou processos inflamatórios no fígado.

Deve-se ressaltar ainda que estudos ontogênicos relatam que a síntese de melatonina pela glândula pineal de filhotes de ratos não aparece até a segunda semana após o nascimento (Stehle et al., 1995; Laazko et al., 1996). Em contrapartida, de acordo com Rowe e Kennaway (2002), a melatonina foi detectada na glândula pineal dos filhotes cinco dias após o

nascimentos, sendo estes capazes de metabolizar o hormônio, o qual aumentou significativamente durante o desenvolvimento. Esses mesmos autores relatam que a significativa diferença no nível de melatonina entre o dia e a noite só foram observadas após o quinto dia de vida e que a circulação da melatonina nos filhotes pode ser aumentada após a ingestão de leite, que seria outra forma de passagem desse hormônio para os neonatos. No entanto, as fêmeas do grupo IV não obtiveram sucesso na gestação. Sabe-se que a pinealectomia, a iluminação constante ou associação destes fatores induzem uma redução do número de blastocistos implantados em ratas além de inibir o desenvolvimento dos locais de implantação (Haldar e Yadev, 2006). Em adição, Alipreeta (2000) relata que a pinealectomia seguida de alta dose imediata de melatonina não mantém a gravidez em morcegos frugívoros.

Estudos realizados por Rai; Haldar (2003), demonstram que a administração exógena de melatonina em roedores afeta o ciclo estral e reduz a fertilidade, aparentemente pela supressão do hormônio luteinizante, impedindo assim a ovulação. Em ratos machos, a administração de melatonina na dose de 100 µg/dia, de 15 a 20 dias, exhibe progressão anormal da espermatogênese, diminuição da habilidade das células de Leydig para produzir progesterona e diminuição de hormônio luteinizante. Em adição, Jankovick et al., (1999) relata que a administração oral de melatonina está associada com o tempo e com a potencialidade com a qual o animal é exposto. Isso indicaria que a melatonina, pode ter uma função importante na viabilidade de implantação do blastocisto e no processo de formação da placenta desses animais, o que explicaria a não prenhez dos animais do grupo IV.

Em relação à análise histoquímica, a reação pelo P.A.S. foi positiva no fígado dos neonatos. De acordo com Seraphin et al., (2000), células hepáticas submetidas ao meio de cultura, na presença ou ausência de melatonina, não apresentaram diferenças quanto ao conteúdo de glicogênio. No entanto, ratos pinealectomizados apresentam diminuição da glicogenogênese hepática e aumento de corticosterona plasmática ao longo do dia, o que pode

está envolvido na alteração de sensibilidade tecidual à insulina (Scalera et al., 2000). Em contrapartida, ratos submetidos ao tratamento com melatonina evidenciam um aumento do conteúdo de uma proteína transportadora de glicose, com conseqüente aumento da sensibilidade tecidual a essa substância (Seraphin et al., 2000). Contudo, Rowe e Kennaway (2002) relatam que os efeitos da melatonina só são detectados nos neonatos após o quinto dia de vida, o que explicaria a reação positiva do P.A.S. nos grupos.

Na análise estatística, não houve diferença significativa entre as médias do peso dos neonatos, do número dos neonatos, quantidade de capilares sinusóides e quantidade de células hematopoéticas. De acordo com El-Sokkary et al., (2006), o fotoperíodo não provoca diferenças significativas no peso e número dos neonatos. Esta explicação é reforçada por Jankovick et al., (1999), que demonstra que animais neonatos na presença ou ausência de melatonina não afetam o seu crescimento, sua viabilidade e o seu desenvolvimento morfológico. No entanto, a análise morfométrica referente à quantidade de células de Kupffer (CK) foi maior nos animais do grupo II quando comparado com o grupo I e com o grupo III. Este resultado pode está relacionado com o fato de que o fígado é um órgão altamente responsivo à ação do hormônio melatonina, pois estudos realizados por Engelman et al.,(2001) relatam que animais tratados com melatonina ou submetidos a ausência de luz apresentaram um aumento no número das células de Kupffer em decorrência da atividade antioxidante da melatonina como forma de defesa do organismo, tendo em vista sua função imunomodulatória. Em adição, quando ratos são tratados com melatonina na dose de 10mg/kg, apresentam dilatação sinusoidal e aumento das células de kupffer (Baykara et al., 2009), o que explicaria o resultado observado nos animais do grupo II. Assim concluímos que a exposição ao iluminação constante ou ausência de luz antes e durante a gestação não afeta a histogênese hepática nos neonatos.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Referências

- Alipreeta, R., 2000: Physiology of the pineal organ of short-nosed fruit bat *Cynopterus sphinx*. Ph.D dissertation, Banaras Hindu University, Varanasi, India.
- Baykara, B., I. Tekman, C. Pekceten, C. Ulukus, P. Tucel, O. Sagol, H. Ormen, and C. Ozogul, 2009: The protective effects of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Acta Histoquímica*. **V. 111**, p. 42-51
- Bishnupuri, K.S and C. Haldar, 2001: Maternal transfer of melatonin alters the growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Biol. Signais Recent*. **V. 10**, p. 317-325,
- Blask, D. E., R. T. Dauchy, L. A. Sauer and J. A. Krause, 2004: Melatonin uptake and growth prevention in rat hepatoma 7288CTC in response to dietary melatonin: melatonin receptor-mediated inhibition of tumor linoleic acid metabolism to the growth signaling molecule 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the potential role of phytomelatonin. *Carcinogenesis*, **V. 25**, p. 951-960,
- Carrillo-Vico, A., J.R. Calvo, P. Abreu, P. J. Lardone, S. García-Mauriño, W.S. Choi, G.J. Cho, C.K. Won and Koh, P.O, 2005: Expression of melatonin growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy. *J. Vet. Science*. **V.6**, p. 179-183,.
- El-Sokkary, G.H., R.J. Reiter, D.X. Tan, S.J. Kim and Cabera, J, 2000: Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*. **V. 34**, p. 842-850.
- El-Sokkary, G.H., H.M. Omar and Hassanein, A.F, 2002: Melatonin reduces oxidative damage and increase survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Free Biol. Med*. **V. 32**, p. 319-332.
- El-Sokkary, G. H., Khidr, B. M. and Younes, H. A, 2006: Role of melatonin in reducing hypoxia-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of male mice. *European Journal of Pharmacology*. **V. 540**, p. 107-114.
- Engelman, M.F.B., J. Guiduglio Neto, C.H.U. Andrade, R. Hernandez and Goulart, L.B.N.T, 2001: Estudos morfológicos do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. **V. 45**.
- Goldman, B.D, 2003: Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. *Sciences's STKE*. **V. 192**, p. 29-31,.
- Gong, L. H., D. H. Ren, M. Xiong, Z. Q. Lu and Wang, X. M, 2003: Melatonin in in vitro apoptosis of H22 hepatocarcinoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*; **V. 25**, n. 6, p.550-554.
- Haldar, C and R. Yadav, 2006 melatonin, gestation and fetal development *Pineal Research*, **V.10**, p. 32 – 42.

- Helliwel, R.J.A and L.M Williams, 1994. The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. *J. endocrinol.* **V 142**, p. 175-181,
- Jankovic, B.D., K. Isakovic, S. Petrovic, 1999: Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* **V 18**.
- Kireev, R.A., A.C.F. Tresguerres, C. Castello, V. Salazar, C. Arizmavaneta, E. Vara and J.A.F. Tresguerres, 2007: Effect of exogene administration of melatonin and growth hormone on pro-oxidant function of the liver in aging male rats. *J. Pineal Res.* **V. 42**, p. 64-70.
- Laazko, M.L., A. Alila, T. Hatonen and S.M. Mustonoja, , 1996: Ontogeny of pineal melatonina rhythm in rats under 12:12hs and 14:14hs Light:dark conditions. *J. Pineal. Res.* **V. 21**, p. 155-164.
- Luo, F.M., X. Liu, S.Q. Li, C. Liu and Z. Wang, 2004: Melatonin promoted chemota expression in liver epithelial cell stimulated with TNF-alfa. *Respiratory Reseach.* **V.5**, p. 1-8.
- Martins, E. Jr., 2009: The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. *Journal of Neuroimmunology*, **V. 82**, P 81-89.
- Mcmillen, I.C. and R. Nowak, 1989: Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasm melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *J.endocrinology.* **V 120**, p. 159-161,
- Menendez-Pelaez, A., B. Poeggeler, R.J. Riter, L.R. Barlow-Walden, M.I. Pablos and D.X. Tan, 1993: Nuclear localization of melatonina in different mammalian tissue: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence: *Journal of Cellular Biochemistry.* **V. 53**, p. 373-382.
- Naji, L., A. Carrillo-Vico, J. M. Guerrero and J. R. Calvo, 2004:. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci*; **V. 74**, p. 2227-2236.
- Nava, M., F. Romero, Y. Quiroz, G. Parro, L. Bonet and B. Rodriguez-Iturb, 2000: Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercuric choride in rats. *Am. I. Physiol Renal Physiol.* **V. 279**, p. 910-918.
- Ohta, Y., M. Kongo and T. Kishikawa, 2003:. Therapeutic effect of melatonin on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation. *Adv Exp Med Biol*; **V. 527**, p. 559-565,
- Okatani, Y., A. Wakatsuki, R. J. Reiter, H. Enzan and Y. Miyahara, 2003: Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol*, **V. 469**, p. 145-152.
- Ostodang, B., N. Çinkeliç, I. Halifeoglu, H. Canatan and I.H. Ozercan, 2000: Effect of melatonin on hepatic fibrogênese vitamin C and hydroxyprolene level in liver of ethanol-fed rats. *Turk J. Med. Sci.* **V. 30**, p. 333-340.
- Pablos, M.I., M.T. Agapito and R. Gutierrez, 1995: Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyml glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res.*, **V. 19**, p. 111-115.
- Rai S., C. Haldar, 2003: Pineal control of immune status and hematological changes in blood and bone marrow of male squirrels (*Funambulus pennanti*) during their reproductively active phase. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **V. 136**, p. 319–328.
- Reiter, R., L. Tang and J.J. Garcia, 2000: Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* **V. 60**, p. 2255-2271.

- Rowe, S.A. and D.J. Kennaway, 2002: Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **V. 282**, p. 797-804.
- Sainz, R.M., I.C. Mayo and R.J. Reiter, 2000: Melatonin regulate glucocorticoids receptor: an ansewerto it action antiapoptótico in thymus. *FASEB.* **V. 13**, p. 1547-1556.
- Seraphim, P.M., D.H. Siemida, F.T. Neshide, F.B. Lima, J.C. Neto and U.F. Machado, 2000: A glândula pineal e o metabolismo de carboidratos. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia.* **V. 44**.
- Serrano, M.A., J.E. Bayón, L. Pascolo, C. Tiribelli, J.D. Ostrow, J. Gonzalez-Gallego and J.J.G. Marin, 2002: Evidence for Carrier-mediated Transport of Unconjugated Bilirubin Across Plasma Membrane Vesicles from Human Placental Trophoblast. *Placenta.* **V. 23**, p. 527-535.
- Scalera, G., C. Benassi and C.A. Porro, , 2000: Pineal involvement in the alimentary behavior and taste preference in the rat. *Physiol Behav.* **V. 48**, p. 97-101.
- Srinivasan, V., G.J.M. Maestroni, D.P. Cardinali, A.L. Esquiteno, S.R. Pandi-Penumal and S.C. Miller, 2005: Melatonin, immune function and aging. *Immunity and Ageing.* **V. 2**, p. 1-10.
- Stehle, J.H., N.S. Foukes, P. Pevet and C.I.P. Sassone, 1995: Developmental maturation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. *Mol. Endocrinology.* **V.9**, p. 706-716.
- Stetson M.H., J.A. Elliot and B.D. Goldman, 2000: Maternal transfer of photoperiodic information influences the photoperiodic response of prepubertal Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*). *BiolReprod* , **V. 34**, p. 664-669.
- St-Pierre, M. V., T. Stallmach, A. Freimoser Grundschober, J.F. Dufour, M. A. Serrano, J. J. G. Marin, Y. Sugiyama and P. J. Meier, 2004: Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **V. 287**, p. 1505–1516.
- Teixeira A.A.C., M.J. Simões, J. Evêncio-Neto and V. Wanderley-Teixeira, 2002: Morphologic aspects of endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. *Int J. Morphol.* **V. 20**, p. 145-9.
- Trentini G.P., A.R. Genazzani, M. Criscuolo, F. Petraglia, C. Gaetani and G. Ficarra, 1992: Melatonin treatment delays reproductive aging of female rat via the opiate system. *Neuroendocrinol.* **V. 56**, p. 364-70.
- Yellon S.M. and L.D. Longo, 1988: Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. *Biological Reproduction.* **V 39**, p. 1093–1099.
- Zhang, W.H., J.Y. Li and Y. Zhou, 2006: Melatonin abates liver ischemia/reperfusion injury by improving the balance between nitric oxid and endothelium. *Hepatobiliary Pancreat.* **V.5**, p. 574-579.
- Zhao, H., S.F. Pang and A.M.S. Poon, 2002: Variations of mt1 melatonin receptor density in the rat uterus during decidualization, the estrous cycle and in response to exogenous steroid treatment. *J Pineal Res*, **V. 33**: p. 140-145.

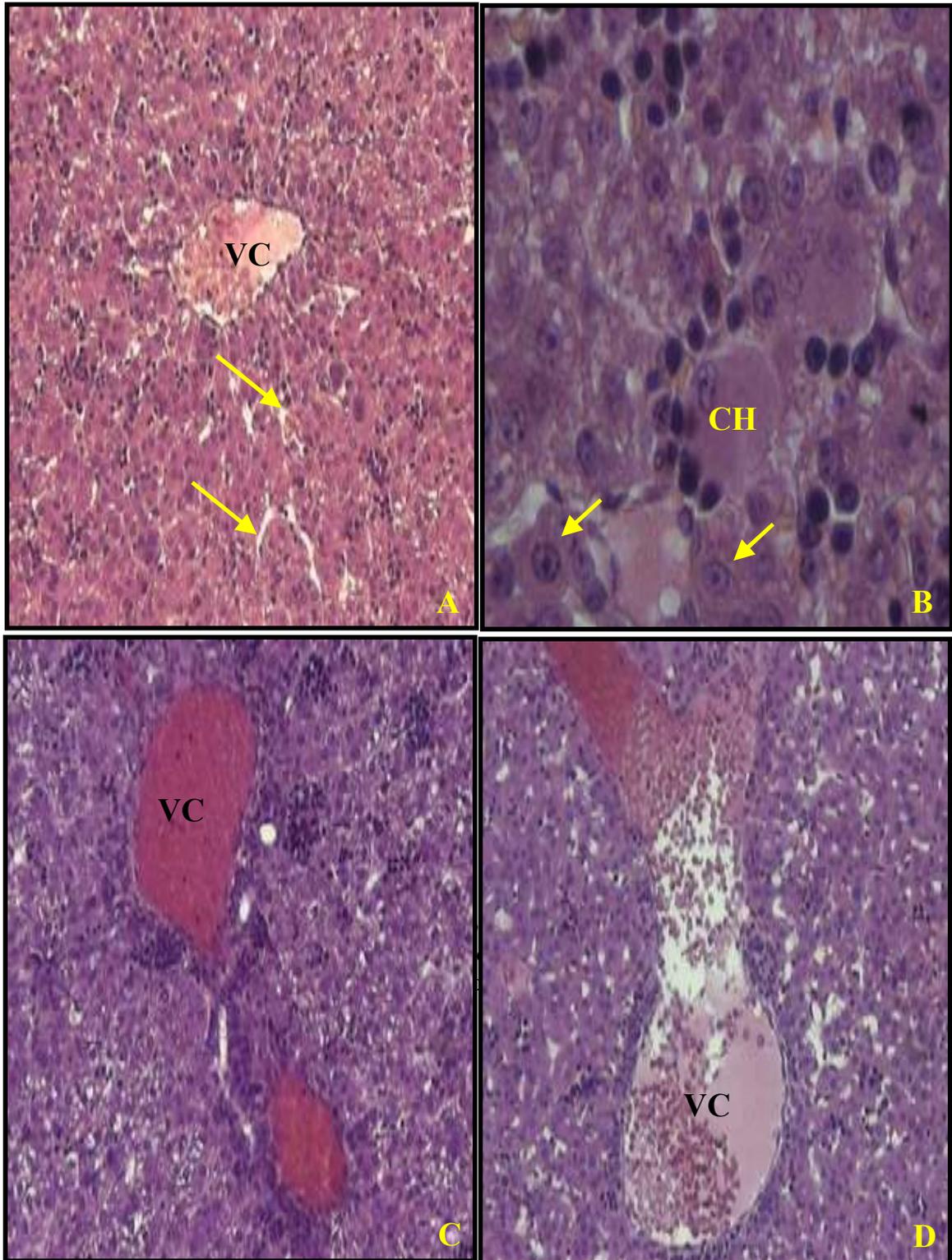


Figura. 1: Fígado de neonatos: (A) Grupo I. H.E. \pm 107X. (B) Grupo III. H.E. \pm 428X. (C) Grupo III. PAS. \pm 107X. (D) Grupo II. \pm 107X. VC – veia centro lobular; CH – célula hematopoiética; Setas longas – sinusóides; Setas curtas – hepatócitos.

Tabela 1: Média e desvio padrão do peso dos ratos neonatos.

	GI	GII	GIII	F^P
PN	6,10 ± 0,29a	6,20 ± 0,09a	6,08 ± 0,12a	1,26 ^{0,5308}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 2: Média e desvio padrão do número de ratos neonatos.

	GI	GII	GIII	F^P
RN	13 ± 1,48a	11 ± 1,30a	11 ± 1,30a	4,40 ^{0,1104}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 3: Média e desvio padrão dos capilares sinusóides presentes no fígado dos ratos neonatos.

	GI	GII	GIII	F^P
CS	29,74 ± 1,14a	30,02 ± 1,44a	30,16 ± 1,17a	0,39 ^{0,8202}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 4: Média e desvio padrão das células hematopoéticas presentes no fígado dos ratos neonatos.

	GI	GII	GIII	F^P
CH	2,68 ± 0,39a	2,80 ± 0,33a	2,78 ± 0,32a	0,31 ^{0,8526}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).

Tabela 5: Média e desvio padrão das células de kupffer presentes no fígado dos ratos neonatos (1º dia de vida).

	GI	GII	GIII	F^p
CK	17,2 ± 2,79a	24,66 ± 2,96b	20,72 ± 1,65a	9,86 ^{0,0014}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05).