



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Renata Nunes Silva

Localização do receptor de melatonina Mel1a e da enzima NRH: quinona redutase 2 em embrião e retinas inteiros de *Kinosternon scorpioides*

Belém
2014

Renata Nunes Silva

Localização do receptor de melatonina Mel1a e da enzima NRH: quinona redutase 2 em embrião e retinas inteiras de *Kinosternon scorpioides*

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucia de Fatima Sobral Sampaio.

Belém
2014

Renata Nunes Silva

Localização do receptor de melatonina Mel1a e da enzima NRH: quinona redutase 2 em embrião e retinas inteiras de *Kinosternon scorpioides*

Data: ___/___/_____.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Lucia de Fatima Sobral Sampaio
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA
Orientadora

Prof^a. Dra. Diva Anelie Guimarães
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA
Membro Titular Interno

Prof^a Dra. Diva Maria Borges-Nojosa
Universidade Federal do Ceará- UFC
Membro Titular Externo

Aos meus pais que
são os pilares de
minha vida, sem os
quais nenhum sonho
seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu vida e me abençoou com saúde para que eu chegasse ao fim de mais uma jornada na minha vida.

Aos meus amados pais, Cardoso e Rosa, os melhores orientadores na escola da vida, meus exemplos de caráter e honestidade, que sempre me apoiaram, acreditaram na busca dos meus ideais. Amo muito vocês!

A duas pessoas que me acolheram na sua casa e nas suas vidas quando precisei passar por essa jornada: tia Rosélia e prima Luise. Obrigadão!

À minha princesa Sofia, que mesmo sem saber sempre me motivou. Você sempre será minha fonte de inspiração!

Ao meu marido Woshington, por todo amor, incentivo e respeito. Obrigada por tudo!

À minha irmã Fernanda, por sua torcida para que esse passo desse certo em minha vida.

Ao meu avô Nicolau, que mesmo não conhecendo as letras sabe muito bem a importância da educação para nosso futuro.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade de ampliação de meus conhecimentos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro e científico, sem os quais esse resultado não seria possível.

À Profa. Dra. Lucia Sampaio pela orientação competente, conhecimento transmitido, críticas e paciência.

Ao Prof. Dr. Ribamar Marques meus sinceros agradecimentos.

Aos Professores dos quais já fui aluna, que de alguma forma sempre contribuíram para uma vontade crescente de continuar a aprender.

A Embrapa (Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental) por ceder os materiais biológicos de seu criatório para realização desse trabalho.

A todos os que cruzaram comigo e decidiram dedicar um pouco do seu tempo a esclarecer uma dúvida, a fomentar um espírito de aprendizagem ou apenas a partilhar uma conversa, muito obrigada por tudo!

"Não tenha medo do sofrimento, pois nenhum coração jamais sofreu quando foi em busca dos seus sonhos."

Paulo Coelho

RESUMO

A melatonina hormônio produzido pela glândula pineal, e também por outros tecidos como a retina é responsável por sinalizar aos seres vivos se está claro ou escuro. Melatonina tem ação no desenvolvimento via o receptor de membrana Mel1a e a enzima NRH: quinona redutase 2 (QR2). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi iniciar a localização do receptor de membrana Mel1a e da enzima NRH: quinona redutase 2 (QR2) no desenvolvimento de vertebrados, tomando como modelo animal o desenvolvimento da tartaruga de água doce *Kinosternon scorpioides* (muçua). Para tanto, retinas e embriões inteiros de 21 dias (E21) e de animais pós-eclodidos (PH) com 60 dias de vida foram submetidos à imunohistoquímica e imunoenaios, usando anticorpos comerciais e visualizados com o anticorpo fluorescente Texas red. Tanto o receptor Mel1a, quanto a enzima QR2 foram localizados em importantes caracteres morfológicos externos em E21 e nas retinas de embriões E21 e PH. Os resultados mostraram que o receptor Mel1a está presente em E21 nas regiões maxilar e mandibular, no contorno externo do olho, na íris, fissura coróide, pescoço, membros anteriores e posteriores alongados, carapaça rudimentar, além da parte interna da cauda em brotamento. As marcações que a enzima QR2 produziu nos embriões de 21 dias (E21) ocorreram nos caracteres morfológicos externos a seguir. Na cabeça, região maxilar; no olho, cristalino e íris; membros anteriores e posteriores alongados e na cauda em brotamento. Nenhuma fluorescência foi observada nos controles negativos incubados sem o anticorpo primário. Sendo assim, nossos achados sugerem que melatonina tem participação no desenvolvimento de *Kinosternon scorpioides*, seja na ossificação, papel do receptor Mel1a, seja na proteção contra xenobióticos, papel da QR2. O papel da melatonina no desenvolvimento de tartarugas ainda está longe de ser completamente desvendado, mas encontramos algumas respostas interessantes e surgiram perspectivas para investigações futuras.

Palavras-chave: *Kinosternon scorpioides*. Desenvolvimento. Produção animal. Melatonina. Receptor de melatonina Mel1a. QR2.

ABSTRACT

The pineal and others tissues produced hormone melatonin synchronizes biological clocks with dark light environmental cycle. This hormone has functions on development via Mel1a melatonin receptor and NRH: quinona redutase 2 (QR2) enzyme. The present aim was to initiate an investigation about the localization of the both Mel1a melatonin receptor and QR2 enzyme melatonin binding site in vertebrate development. We taken as a model the fresh water turtle *Kinosternon scorpioides* (muçuã). Whole 21 days embryos (E21) and retinas from E21 and 60 days post-hatched (PH) muçuãs respectively were assayed by immunoassays and immunohistochemistry, using commercial antibodies and the results were revealed by Texas red fluorescence. As Mel1a melatonin receptor as QR2 enzyme were localized in important external morphological characters in E21 and in retinas from both E21 and PH. Results showed Mel1a melatonin receptor in maxillary, mandibula, eye contour, Iris, choroide fissure, neck, elongated forelimb and hindlimb, developing carapace, beyond of the internal part of the tail bud. QR2 fluorescent signals in whole E21 embryos were in the following morphological external characters. In head, QR2 is at maxillary region; in the eye at lens and iris; in elongated forelimb and hindlimb; and in tail bud. No fluorescence was observed in negative controls incubated without the primary antibody. In conclusion, our achievers suggest that melatonin participates in *Kinosternon scorpioides* development as in ossification, hole of the Mel1a receptor, as in xenobiotic protection, hole of the QR2 enzyme. Melatonin functions on turtle development disclose are only starting, but we found some interesting answers and future investigations arise from these studies.

Key words: *Kinosternon scorpioides*. Development. Animal production. Melatonin. Melatonin Receptor Mel1a. QR2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Representação esquemática dos tipos celulares presentes na retina de vertebrados	17
Figura 02: Imagem de <i>Kinosternon scorpioides</i> com 3 anos de idade	23
Figura 03: Embrião de 21 dias (E21) de <i>Kinosternon scorpioides</i> em tamanho real	28
Figura 04: Embriões inteiros de 21 dias (E21) de <i>Kinosternon scorpioides</i> marcado com Mel1a	29
Figura 05: Olho de embrião de 21 dias (E21) de <i>Kinosternon scorpioides</i> marcado com Mel1a.....	29
Figura 06: Embriões inteiros de 21 dias (E21) de <i>Kinosternon scorpioides</i> marcado com QR2	30
Figura 07: Olho de embrião de 21 dias (E21) de <i>Kinosternon scorpioides</i> marcado com QR2	31
Figura 08: Retina de embrião de 21 dias (E21) de <i>Kinosternon scorpioides</i> marcada com Mel1a, QR2 e sem marcação	32
Figura 09: Retina de animais pós-eclodidos (PH) de 60 dias de <i>Kinosternon scorpioides</i> marcada com Mel1a, QR2 e sem marcação	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK	N-acetil-metoxiquinuramina
BAGAM	Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental
E21	Embriões de 21 dias
HIOMT	Hidroxitriptofano
HTP	Hidroxitriptofano
IDO	Indolamina-dioxigenase
MEL	Melatonina
MEL1a	Receptor membranar de melatonina do subtipo 1a
MEL1b	Receptor membranar de melatonina do subtipo 1b
MEL1c	Receptor membranar de melatonina do subtipo 1c
MPO	Mieloperoxidase
MT1	Receptor de membrana de melatonina do subtipo 1
MT2	Receptor de membrana de melatonina do subtipo 2
NAT	N-acetiltransferase
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PBS	Salina tamponada com fosfato
PH	Pós-eclosão
QR2	Enzima NRH: quinona redutase 2
SNC	Sistema Nervoso Central
TRH	Trato retinohipotalâmico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 CRONOBIOLOGIA	15
3.2 RETINA	16
3.3 GLÂNDULA PINEAL	17
3.4 MELATONINA	19
3.4.1 Receptor de melatonina Mel1a	20
3.4.2 Sítio de ligação da melatonina QR2	20
3.4.3 Melatonina e Reprodução e Produção	20
3.4.4 Melatonina e desenvolvimento	21
3.5 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO <i>Kinosternon scorpioides</i> (Linnaeus, 1766)(Testudines;Kinosternidae)	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 ANIMAIS	25
4.2 IMUNOENSAIOS	25
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
4.3.1 Experimento 1: Imunohistoquímica em retinas inteiras	26
4.3.2 Experimento 2: Imunoensaios em embriões inteiros	26
4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	27
4.5 ESTATÍSTICA	27
4.5.1 Amostragem	27
5 RESULTADOS	28
5.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS EXTERNOS DO EMBRIÃO DE 21 DIAS (E21) DE <i>KINOSTERNON SCORPIOIDES</i>	28
5.2- LOCALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE MELATONINA MEL1A EM EMBRIÕES INTEIROS DE <i>KINOSTERNON SCORPIOIDES</i> DE 21 DIAS (E21)	28
5.3- LOCALIZAÇÃO DA ENZIMA QR2 EM EMBRIÕES INTEIROS DE <i>KINOSTERNON SCORPIOIDES</i> DE 21 DIAS (E21)	30

5.4- MEL1A E QR2 EM RETINA INTEIRA DE <i>KINOSTERNON SCORPIOIDES</i> EMBRIONÁRIO	31
5.5- MEL1A E QR2 EM RETINAS DE ANIMAIS PÓS-ECLOSÃO (PH) DE <i>KINOSTERNON SCORPIOIDES</i>	32
6 DISCUSSÃO	33
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

Cronobiologia pode ser entendida como um esforço multidisciplinar para compreender a dimensão temporal da vida, sendo reconhecida principalmente pelo estudo dos fenômenos “enigmáticos” conhecidos como ritmos biológicos. Esses seguem as variações de luz ambiental durante o dia (ritmos circadianos) e durante o ano (ritmos circanuais). São produzidos também pelos relógios biológicos, os quais são mecanismos endógenos que geram oscilações sustentadas em todos os níveis dos sistemas biológicos (AGUILAR-ROBLERO et al., 2001).

A retina capta luminosidade do ambiente e transmite essa informação para o núcleo supraquiasmático (NSQ), independentemente da sua capacidade de formação de imagem. Isso ocorre através do trato retinohipotalâmico (TRH) que tem origem em células ganglionares fotossensíveis, cujo fotopigmento é a melanopsina. O NSQ então processa a informação e transmite para os relógios periféricos e cerebrais (localizados nos outros núcleos hipotalâmicos, no tálamo, na habénula e na amígdala) de forma a poder organizar todos os ritmos endógenos individuais. A condução da informação circadiana é feita através de hormônios e metabólitos e também por controle nervoso direto, envolvendo sistema nervoso autônomo e o sistema neuroendócrino. O neurohormônio responsável por fornecer aos órgãos informações de claro ou escuro é a melatonina (DIBNER et al., 2010).

Nas salamandras, serpentes, tartarugas e aves, a glândula pineal coexiste com o chamado órgão parapineal e, tendo células fotorreceptoras em seus tecidos, regula ela mesma a biossíntese de melatonina, possuindo a capacidade de gerar ritmos circadianos e sazonais (KORF et al., 1998). De fato, em peixes e anfíbios, as células da glândula pineal têm função semelhante ao olho, ou seja, são extremamente fotossensíveis; nos demais vertebrados, todos os vestígios desta função fotorreceptora desapareceram (SRINIVASAN et al., 2005).

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula conservativa presente em todos os filos, entretanto maiores estudos sobre sua caracterização e efeitos se concentram nos vertebrados, principalmente em mamíferos (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). É o principal hormônio da glândula pineal, pertencente ao grupo das indolaminas. Têm receptores acoplados à proteína G (MT1, MT2 em mamíferos, Mel1a, Mel1b e Mel1c em aves) (DUBOCOVICH et al., 2010; WIECHMANN; SHER-

RY, 2013), sítio de ligação na proteína ligante de cálcio calmodulina (BENÍTEZ-KING *et. al.*, 1993; MARKUS; TAMURA, 2009), e liga no sítio ativo da enzima quinona redutase 2, cuja fisiologia vem sendo estudada (SAMPAIO, 2009, 2013a). Modula positivamente enzimas antioxidantes e possui, ela mesma atividade antioxidante (ACUNA-CASTROVIEJO *et al.*, 2007).

A função da melatonina no desenvolvimento embrionário vem sendo demonstrada utilizando a retina de pintinhos como modelo para o estudo de mudanças celulares e moleculares no sistema nervoso durante o desenvolvimento embrionário (SAMPAIO, 2008; 2009; SAMPAIO; MARKUS, 2010). Também sabe-se da participação da melatonina nos estágios iniciais da embriogênese de mamíferos (SAMPAIO *et al.*, 2012).

Dentre as tartarugas brasileiras, o *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)(Testudines;Kinosternidae), é uma das menos conhecidas pela ciência e provavelmente uma das mais ameaçadas no Brasil, mesmo que sua caça seja proibida (MACHADO JÚNIOR *et al.*, 2006). Nesse sentido, estudar a influência da iluminação ambiental no desenvolvimento embrionário dessa espécie é de suma importância para o conhecimento de sua biologia, uma vez que, a reprodução como a de outras tartarugas é sazonal (CASTRO, 2006; GOMES *et al.*, 2006).

Sendo assim, no trabalho em questão foi estudado a expressão do receptor transmembrânico de melatonina Mel1a e o sítio de ligação na enzima QR2 nas retinas de *Kinosternon scorpioides* embrionários e pós-eclosão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do neurohormônio melatonina no desenvolvimento de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)(Testudines;Kinosternidae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descobrir a atuação da melatonina no desenvolvimento de *Kinosternon scorpioides*;
- Analisar através de imunoenaios em embriões inteiros de *Kinosternon scorpioides* a expressão do receptor de membrana (Mel1a) e do sítio de ligação de melatonina QR2;
- Verificar através de imunohistoquímica a expressão do receptor de membrana (Mel1a) e do sítio de ligação de melatonina QR2 em retinas embrionárias e pós-eclosão de *Kinosternon scorpioides*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CRONOBIOLOGIA

A Cronobiologia é a ciência que estuda os ritmos e os fenômenos físicos e bioquímicos periódicos que ocorrem nos seres vivos. Existem inúmeros tipos de ritmos que orientam o organismo. Quando estes ritmos têm a duração aproximada de vinte e quatro horas, são denominados de ciclos circadianos (*circa diem*, aproximadamente um dia), no entanto, se a duração for superior, chamam-se ultradianos ou se, por outro lado, têm uma duração inferior, são chamados de infradianos. Os ciclos circadianos manifestam-se na organização temporal de processos fisiológicos, celulares, neuronais, bioquímicos e comportamentais. Permitindo, assim, que o organismo antecipe a fase do dia, constituindo estes processos de forma proativa e não apenas reativa (DIBNER et al., 2010).

Como disciplina científica formal, a cronobiologia é recente. Apesar dos primeiros relatos empíricos dos ritmos biológicos datarem de 1729, somente em 1960 é que a cronobiologia foi caracterizada como disciplina científica. Conhecida em inúmeros países, somente na década de 80 a Cronobiologia tornou-se tema de estudos no Brasil, e hoje ainda não alcançou os currículos dos cursos universitários de ciências médicas e biológicas na maioria das instituições (MENNA-BARRETO, 2003).

Ritmicidade é um fenômeno inerente aos reinos dos seres vivos em geral, sendo encontrada em todos os níveis de organização, desde em simples células (ou seres unicelulares), tecidos e órgãos, até em organismos mais complexos (DELATTRE, 2004). Ritmo é a organização de um fenômeno no tempo frequentemente descrito por seu período, média ou nível e fase (MARQUES et al., 2003).

Entende-se que os ritmos biológicos, tais como observa-se na natureza, são o resultado da interação entre relógios biológicos endógenos e os fatores ambientais externos aos quais os organismos estão sujeitos. O processo através do qual se dá essa interação é conhecido como sincronização ou arrastamento, e as variações ambientais capazes de desenvolvê-la em uma determinada espécie são identificados como agentes sincronizadores ou arrastadores ou simplesmente *zeitgebers*. (MENNA-BARRETO; MARQUES, 2002).

Um sincronizador não cria um ritmo, ele é apenas capaz de influenciar sua expressão, forçando a alteração do seu período e/ou a temporização do seu pico em

relação à hora do dia (DRUST et al., 2005). O zeitgeber mais potente, para a maioria dos animais é o ciclo claro-escuro (DRUST et al., 2005).

Os ritmos circadianos são controlados por um oscilador interno, o relógio circadiano, que permite que os organismos antecipem-se a mudanças rítmicas do ambiente, mudando seu estado fisiológico e fornecendo assim uma vantagem adaptativa (MARQUES et al., 2003).

Para que a informação luminosa chegue a todas as células do organismo, esta tem que chegar via trato retino hipotalâmico e ser processada por um relógio central, que está situado num par de pequenos núcleos localizados na região anterior do hipotálamo, os núcleos supraquiasmáticos, NSQ (FOSTER; HANKINS, 2007). O NSQ então processa a informação e transmite para os relógios periféricos e cerebrais (localizados nos outros núcleos hipotalâmicos, no tálamo, na habénula e na amígdala) de forma a poder organizar todos os ritmos endógenos individuais.

A condução da informação circadiana é feita através de hormônios e metabólitos e também por controle nervoso direto, envolvendo sistema nervoso autônomo e o sistema neuroendócrino (DIBNER et al., 2010).

3.2 RETINA

A retina é considerada integrante do Sistema Nervoso Central (SNC) devido à sua derivação do tubo neural anterior (YANG, 2004). Desenvolveu-se a partir da invaginação do tubo neural que forma a chamada vesícula óptica. Após, esta invagina-se forma a cúpula óptica, na parede interna forma a retina neural e a externa o epitélio pigmentado (PURVES et al., 2001). Nos vertebrados a retina é organizada em uma configuração laminar composta por sete classes de células: ganglionares, horizontais, amácrinas, bipolares, fotorreceptores do tipo cone ou bastonete e glia de Müller (YANG, 2004), ver figura 01.

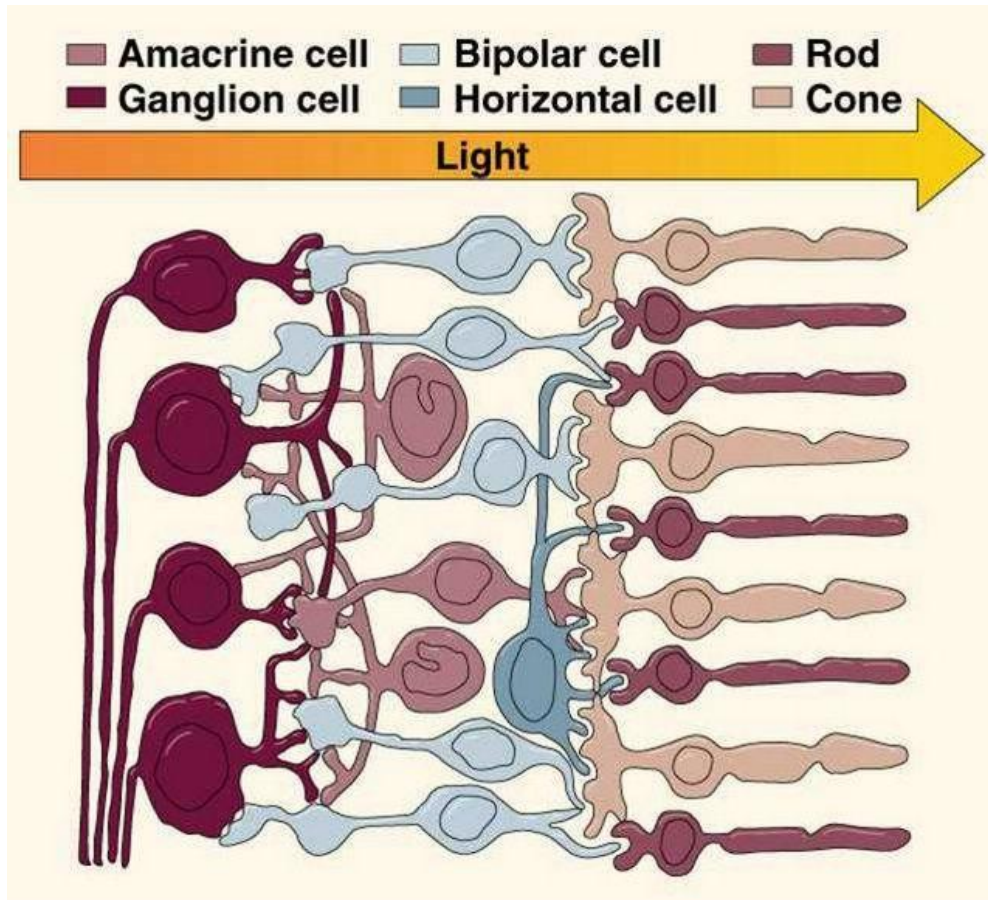


Figura 01- Representação esquemática dos tipos celulares presentes na retina de vertebrados. (Modificado de Yang, 2004)

As células da retina responsáveis pelo processamento inicial da informação luminosa são os fotorreceptores (cones e bastonetes), os fotorreceptores do tipo cone são os responsáveis pela percepção de cores, enquanto que os bastonetes são responsáveis pela percepção de contrastes, referidos como sendo responsáveis pela visão no escuro; nos outros tipos celulares da retina o sinal elétrico é modulado e refinado até chegar nas células ganglionares. A partir destas células este sinal segue para os centros superiores do SNC (WÄSSLE, 2004). A informação flui antero-posteriormente dos fotorreceptores para as células bipolares e dessas para as ganglionares, além disso, flui lateralmente das células horizontais da camada plexiforme externa para as amácrinas na camada plexiforme interna (KANDEL et al., 1991).

3.3 GLÂNDULA PINEAL

O neurohormônio responsável por fornecer aos organismos informações de claro ou escuro e transmitir as informações circadianas, é a melatonina produzida

ritmicamente pela glândula pineal, ou em resposta ao núcleo supraquiasmático (PANDI-PERUMAL et al., 2006). A glândula pineal ou epífise, tem a forma de um cone de pinha (pinea) e em mamíferos mede 8 mm de comprimento por 4 mm de largura e pesa 0,1 a 0,2 gramas. É um órgão parenquimatoso, derivado do teto diencefálico caudal que se projeta posteriormente no tronco cerebral (CARVALHO-BARROS, 2006).

A glândula pineal dos vertebrados é um componente essencial do sistema fotoneuroendócrino que permite a maioria dos vertebrados apreenderem a ritmicidade da passagem do tempo (MARKUS et al., 2002).

Como estrutura é conhecida desde a antiguidade, sendo mencionada nos estudos anatômicos de Galeno. Desde então, sempre foi relacionada a funções misteriosas e metafísicas, sendo alvo de estudo mais dos filósofos que dos anatomistas até o século XIX, quando iniciaram a fase de estudos científicos sobre a glândula pineal e suas funções (MACHADO, 1993). Contemporaneamente, a glândula pineal ressurge como objeto de estudo da Medicina e da Biologia, através de uma revisão da literatura mundial feita por Kitay e Altschule (1954). Outro marco nos estudos desta glândula ocorreu em 1959, quando Lerner e seus colaboradores isolaram o hormônio da glândula pineal, a que chamou de melatonina. A partir disso, em vários trabalhos, congressos e simpósios procura-se esclarecer o papel funcional da glândula pineal.

A glândula pineal funciona como um transdutor capaz de informar às partes internas do organismo sobre as condições de iluminação ambiental, ou seja, quando a glândula pineal libera melatonina, informa ao organismo se está escuro (FERREIRA; MARKUS, 2001).

A glândula pineal, associadamente aos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos, constitui parte importante do sistema neuroendócrino, responsável pela organização temporal dos diversos eventos fisiológicos e comportamentais (DUBOCOVICH et al., 2003).

A presença da glândula pineal ou tecidos compatíveis com pinealócitos aparece na escala evolutiva a partir dos peixes. Em alguns anfíbios, répteis e aves, a glândula pineal existe juntamente com o chamado órgão parapineal e, tem células fotorreceptoras em seus tecidos, regula ela mesma a biossíntese de melatonina, possuindo a capacidade de gerar ritmos circadianos. Nessas mesmas classes, além de suas características de fotossensibilidade e de secreção endócrina, a glândula

pineal mantém conexões, tanto aferentes quanto eferentes, com o sistema nervoso central através do pedúnculo pineal (MARKUS et al., 2002).

3.4 MELATONINA

Esta substância foi isolada primeiramente na glândula pineal bovina, identificada por Lerner e colaboradores em 1958 (REITER; TAN, 2003).

A melatonina (MEL) ou *N-acetil-5-metoxitriptamina*, é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal dos vertebrados, mas também pode ser sintetizada por outros tecidos tais como a retina, intestino e leucócitos mononucleares (REITER et al., 2000).

Esta é uma molécula altamente conservada ao longo da cadeia evolutiva, apresentando funções decorrentes de sua produção noturna em todos os grupos de seres vivos, desde organismos unicelulares até o homem (ARENDDT, 2007). Apresenta solubilidade *in vivo* em lipídios, e *in vitro* em etanol absoluto e água. Seu peso molecular é de 232,28g e sua fórmula molecular é $C_{13}H_{16}N_2O_2$ (TAN et al., 1993).

Nas células fotorreceptoras (cones e bastonetes) da retina o triptofano oriundo da corrente sanguínea é hidroxilado pela triptofano hidroxilase transformando-o em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). O 5-HTP é então descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase em 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina. Nesta etapa da síntese, aparece a serotonina-N-acetiltransferase (NAT), a qual converte a 5-HT em N-acetilserotonina. Estudos confirmaram que a NAT é a principal enzima que modula a produção da melatonina, sendo caracterizada como a enzima chave do processo. No final, a N-acetilserotonina, pela ação da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), é convertida em N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina (DUBOCOVICH et al., 2003).

Certa quantidade de melatonina que foi produzida é excretada de forma inalterada, e outra parte é eliminada através de uma via de hidroxilação envolvendo enzimas do citocromo P450 1A2, que catalisam a formação de 6-hidroxi-melatonina que então sofre conjugação com sulfato, gerando um composto mais habilitado à excreção (BOUTIN et al., 2005). Uma via alternativa a estes processos consiste na abertura do núcleo indol durante o processo de oxidação pela enzima indolamina-dioxigenase (IDO) e/ou pela mieloperoxidase (MPO) levando a produção de N-acetil-metoxiquinuramina (AMK). A importância fisiológica deste metabólito da melatonina

é ainda desconhecida, contudo, acredita-se que ele possa estar envolvido em muitos dos efeitos desse hormônio (BOUTIN et al., 2005).

3.4.1 Receptor de melatonina Mel1a

Atualmente para mamíferos foram clonados os receptores MT1 e MT2 ligados a proteína G (DUBOCOVICH et al., 2010). Em aves e *Xenopus leavis*, o receptor isolado equivalente ao MT1 é o Mel1a e ao receptor MT2 é conhecido como receptor Mel1b (DUBOCOVICH et al., 2010). Ao Mel1a e Mel1b também foi isolado em aves e *Xenopus* o receptor Mel1c. Os três subtipos são expressos em peixes, batráquios, e aves (REPPERT et al., 1995; SAMPAIO, 2008).

O receptor tipo MEL1a já foi verificado em vários tecidos e órgãos, onde participa de uma diversidade de respostas fisiológicas (WITT-ENDERBY et al., 2003). Este receptor já foi verificado no NSQ (DUBOCOVICH et al., 1998), na retina (SAMPAIO, 2008, SAMPAIO, 2013a), no fígado, no rim (NAJI et al., 2004), na pele (SLOMINSKI et al., 2005) e no sistema imunológico (POZO et al., 2004).

Supõe-se que o Mel1a atua na reprodução, uma vez que foi encontrada em células da granulosa do folículo ovariano (BARROS, 2013), bem como no útero e ovário de ratas (CHUFFA, 2012).

3.4.2 Sítio de ligação da melatonina QR2

Melatonina liga na enzima N-ribosil-hidronicotinamida (NRH) quinona redutase 2 (QR2). As quinonas redutases participam da proteção contra estresse oxidativo pela prevenção das reações de transferências de elétrons das quinonas (PANDIPERUMAL et al., 2006).

QR2 tem localização citosólica (NOSJEAN et al, 2000). Sua distribuição é bastante generalizada, mas apresenta particularidades para determinadas espécies (NOSJEAN et al, 2001; SAMPAIO, 2013b). Essa enzima foi localizada na retina de embriões de pintainhos desde o início da fase de diferenciação, sugerindo que é importante nos estudos de desenvolvimento (SAMPAIO, 2009; SAMPAIO 2013a).

3.4.3 Melatonina e Reprodução e Produção

Está bem determinado que a melatonina tem influência sobre a sincronização da resposta apropriada de vários animais às condições ambientais, mas além disso esta apresenta outras funções.

A principal descoberta em relação a melatonina foi seu papel como antioxidante (TAN et al., 1993) servindo de estímulo para o desenvolvimento de várias outras pesquisas, que possibilitaram entender a capacidade desta molécula como quelante de radicais livres e redutora da agressão molecular (REITER et al., 2009).

A melatonina atua como antioxidante de vários tecidos, e também está presente no plasma seminal (CASAO et al., 2010), e seus receptores na membrana espermática (FUJINOKI, 2008), ainda que em espécies diferentes.

As provas da ação antioxidante da melatonina sobre os espermatozóides foi já confirmada em vários artigos, visto que, comprovou-se a existência de receptores de melatonina no tecido epididimário de ratos e de humanos (SHIU et al., 2000), assim como a detecção de melatonina no plasma seminal tanto de humanos (LUBOSHITZKY et al., 2002) como de carneiros (CASAO et al., 2010), levaram à suspeita de que este neurohormônio possa ter um papel fundamental na viabilidade das células espermáticas.

Além disso, a nível fisiológico, a melatonina não consiste num hormônio pró-gonadal nem anti-gonadal, e sim num sinal cronológico circulante cuja função é informar o organismo do momento em que se encontra, efectuando uma interacção neuroendócrina-reprodutora. Porém, em equinos está comprovada que a administração exógena deste hormônio causa uma inibição na ciclicidade e na produção espermática (REITER et al., 2009).

Ela também é um fator em potencial para proteger o oócito e suas células circundantes contra os danos ocasionados pelo estresse oxidativo, além de regular a expressão de genes atuando em receptores nucleares, sua função como antioxidante pode estar associada ao desenvolvimento folicular e à qualidade oocitária, interferindo em processos como a maturação oocitária e ovulação (SAMPAIO et al., 2012).

3.4.4 Melatonina e desenvolvimento

Estudos demonstraram a expressão desses receptores no neurodesenvolvimento, e o papel do sistema melatoninérgico na diferenciação celular. Além disso, verificou-se que o receptor de melatonina Mel1a é expresso desde o início do de-

envolvimento embrionário, enquanto o receptor Mel1b é expresso desde a sinaptogênese (SAMPAIO, 2008; 2009). Em culturas de células dissociadas de retina, a presença do antagonista de receptores e sítios de ligação de melatonina luzindole, impede a expressão de respostas mediadas pelos receptores nicotínicos $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 7\alpha 8$ medidas por microfisiometria. Mas isso só ocorre quando luzindole é adicionado antes das células estarem completamente diferenciadas, e parece envolver uma via independente de AMPc (SAMPAIO et al., 2005; 2008; SAMPAIO; MARKUS, 2010), mostrando que esses receptores influenciam a diferenciação neuronal em aves.

3.5 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)(Testudines;Kinosternidae)

O Brasil possui uma biodiversidade impressionante, são mais de 8200 espécies de vertebrados (713 mamíferos, 1826 aves, 721 répteis, 875 anfíbios, 2800 peixes continentais e 1300 peixes marinhos), dentre os répteis 35 espécies são de quelônios (11% da fauna mundial) (ICMBio, 2013).

Na atualidade 20% da fauna mundial de quelônios é formada por espécies da subordem Pleurodira, que contém as espécies que retraem a cabeça para dentro da carapaça dobrando o pescoço horizontalmente, e 80% da subordem Cryptodira, aquelas que retraem a cabeça dobrando o pescoço em “S”. No Brasil, contudo, a maioria das espécies pertence à subordem Pleurodira e apenas um terço à subordem Cryptodira, que é o caso da espécie *Kinosternon scorpioides*, popularmente designada de muçua ou jurará (MACHADO et al, 2008).

Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766)(Testudines;Kinosternidae), pertence à família *Kinosternidae* que é uma família de pequenas tartarugas, com vinte e cinco espécies, classificadas em quatro gêneros. Existem quatro subespécies reconhecidas, como *K. scorpioides*, sendo: *K. s. scorpioides*, *K. s. abaxillare*, *K. s. albogulare* e *K. s. cruentantum*. (BERRY; IVERSON, 2011).

A tartaruga muçua (*Kinosternon scorpioides*) possui em média de 16 a 18 cm de comprimento da carapaça, sua cabeça é triangular, a narina em forma de focinho e a mandíbula têm a forma de bico de papagaio e duas barbelas na parte posterior (figura 02). A cauda, em ambos os sexos, possui uma unha na extremidade, sendo a

do macho maior que a da fêmea, numa proporção de 3 para 1 cm. Ela tem a coloração marrom-escuro apresenta carapaça com três carenas longitudinais e o focinho termina em forma de bico. O plastrão apresenta os lobos anteriores e posteriores móveis. Os machos apresentam cauda comprida e plastrão côncavo, com espinho córneo, e as fêmeas a cauda curta e plastrão plano (CASTRO, 2006).



Figura 02- Indivíduo da espécie *Kinosternon scorpioides* com 3 anos de idade.
Fonte: Arquivo pessoal

Os *Cryptodira* são os únicos quelônios encontrados hoje em dia na maior parte do Hemisfério Norte, existindo espécies aquáticas e terrestres na América do Sul e, na África apenas espécies terrestres (POUGH et al., 2008).

Além de *Rhinoclemmys punctularia punctularia*, *K. scorpioides* é o único *Cryptodira* de água doce que ocorre na região amazônica e caatinga (LE; MCCORD; IVERSON, 2007).

O *Kinosternon scorpioides* distribui-se desde as regiões da Amazônia e caatinga brasileira, Peru, Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Panamá, Guianas, até o norte da Argentina, com habitats distribuídos em vários estados do norte do país, como por exemplo, Pará, Maranhão, dentre outros (BERRY; IVERSON, 2011; CARVALHO et al., 2000; DELDUQUE, 2000).

Conforme Ferreira- Júnior (2009), o desenvolvimento do embrião inicia-se quando os ovos são expostos ao ar. No caso de tartarugas como *Kinosternon scorpioides* é quando esses ovos são depositados em locais próximos a rios, lagoas, embaixo de folhas e galhos (CASTRO, 2006).

Estudos realizados com fêmeas de *Kinosternon scorpioides* indicaram que seus folículos vitelogênicos são de forma ovóide a esférico, os ovos são bastante

mineralizados, e que não há diferença significativa dos ovários no período de inverno e verão (COSTA et al., 2009, CHAVES et al., 2012).

A presença de ovos em ovidutos se dá a partir de março (COSTA et al., 2009). Mas segundo Castro (2006), a maior taxa de nidificação desses animais acontece nos meses de junho a julho, com eclosão dos filhotes a partir de setembro, com período de incubação dos ovos variando em média 136 dias.

Após esse período, os filhotes nascem medindo no máximo de 4 a 5 cm e pesando 9 g (MARQUES, 2005). Segundo Barreto et al.,(2009), entre 1,8 a 2,7 meses com 5 e 9cm os animais encontram-se na fase juvenil. E a maturidade sexual se dá a partir de 2,8 a 4 anos de idade, com comprimento de carapaça de aproximadamente 14,2 cm (CASTRO, 2006). Vogt (2008), aduz que a maturidade sexual do *Kinosternon scorpioides* dá-se a partir dos 5 anos de idade, com 13,2cm de comprimento.

Os embriões de 21 dias incluem-se no estágio 17 de desenvolvimento, apresentando os seguintes caracteres morfológicos externos: arco mandibular, cauda proeminente, fendas palatinas fechadas, poço olfativo, retina pigmentada, carapaça delimitada, curvatura do corpo e membros anteriores e posteriores formados ((TOKITA; KURATANI, 2001; WERNEBURG, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Todo o trabalho foi feito de acordo com as leis vigentes de utilização de animais de experimentação (CEPAE-UFPA BIO088-12 e Autorização SISBIO 40839-1). Foram utilizados 10 ovos e 3 animais pós-eclosão de *Kinosternon scorpioides* obtidos da coleção biológica de muçua do Banco de Germoplasma Animal da Embrapa Amazônia Oriental- BAGAM, do município de Salvaterra. As coordenadas do BAGAM são 48° 30' e 54" de longitude W e 00° 45' e 21" de latitude S, na Mesorregião geográfica (12) Marajó, à margem direita do rio Paracauari, cerca de 17 km de Salvaterra- PA, por via terrestre (MARQUES, 2005).

O período de coleta dos embriões e animais pós-eclosão aconteceu de setembro a novembro de 2013, época do ano menos chuvosa na região, de 8 às 12h da manhã com variação solar de 550-650 W/m² (SOUZA; COSTA, 2002).

Os ovos foram alojados em recipientes de poliestireno expandido contendo areia, e encaminhados ao Laboratório de Neurociências do Desenvolvimento do Sistema Nervoso do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, onde ficaram acondicionados por 2 dias, com uma temperatura variando entre 26 e 27°C e com luz natural (12h claro / 12h escuro).

Os animais pós-eclosão também foram alojados em poliestireno expandido contendo areia e um pouco de água do próprio local de nascimento e encaminhados ao mesmo laboratório.

4.2 IMUNOENSAIOS

Os embriões inteiros foram retirados do ovo e realizados imunoenaios em embriões de 21 dias imunohistoquímica em retinas inteiras. Para a pesquisa utilizou-se ovos de 21 dias e animais com 60 dias de vida, considerando a dificuldade em dissecar retinas em animais tão pequenos e a formação embrionária do olho. Devido a falta de informações em relação a embriologia de *Kinosternon scorpioides*, levou-se em consideração o estadiamento de *Pelodiscus sinensis* que tem similaridade morfológica com a espécie aqui estudada (TOKITA; KURATANI, 2001).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Experimento 1: Imunohistoquímica em retinas inteiras

Neste experimento foram utilizadas 3 retinas de 3 animais com 60 dias de vida da espécie *Kinosternon scorpioides*. Os animais pós-eclodidos foram decaptados, os olhos foram enucleados e as retinas foram removidas em uma solução Salina tamponada com fosfato (pH= 7.4), sem magnésio e cálcio. Depois, as retinas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante 15 min em solução de paraformaldeído a 4 %. A etapa de emulsificação foi realizada por incubação por 30 minutos em solução de PBS / Tween 20 (0,5 %). A essa solução foi adicionado soro normal de galinha (1:400) para bloquear a ligação inespecífica. Depois, as retinas foram incubadas numa solução de PBS contendo Mel1a primário (1:100) e/ou QR2 (1:100) durante 72 h, exceto para o controle negativo que foi feito incubando as retinas por 72h somente em PBS. Após os tecidos foram lavados três vezes com PBS e incubados durante 2 horas em solução de PBS contendo o anticorpo secundário Texas Red (1:400). A ligação do Texas Red foi interrompida por 3 lavagens em PBS com agitação de 45 rpm durante 10 min. Depois todas as retinas foram secas, montadas em lâminas e visualizadas em microscópio de fluorescência Nikon.

4.3.2 Experimento 2: Imunoensaios em embriões inteiros

No experimento 2, foram utilizadas 3 retinas para cada proteína investigada (com duas repetições) do total de 10 embriões de *Kinosternon scorpioides* de 21 dias de idade, sendo que na primeira repetição foi utilizada 5 embriões e na segunda mais 5 embriões. Estes foram excisados dos ovos e lavados 3x em PBS. Depois, esses embriões estavam sob os seguintes passos sequenciais: fixados em solução de paraformaldeído 4%/ PBS por 15 min; emulsificados por 30 minutos numa solução de Tween 20 (0,5 %) / PBS; lavados 3x em PBS; incubados em uma solução de PBS contendo anticorpo Mel1a primário (1:100) e/ou QR2 (1:100) durante 48h, exceto para o controle negativo que foi feito retirando o anticorpo primário; lavados 3x em PBS; incubados em solução de PBS contendo o anticorpo secundário de Texas Red (1:400) durante 2h. A ligação do Texas Red foi interrompida por 3 lavagens com agitação de 45 rpm durante 10 min. Em seguida,

os embriões ficaram na geladeira por no máximo 7 dias, depois analisados por microscopia de fluorescência.

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi utilizado o microscópio de fluorescência da marca Nikon (Microscópio Biológico Trinocular com sistema de iluminação de lâmpada de halogênio de 60V, NIKON Eclipse 50i). O programa Image J® foi usado apenas para ajuste de contraste e brilho.

4.5 ESTATÍSTICA

4.5.1 Amostragem

Foram consideradas 3 retinas de animais com idades embrionárias e de pós-eclosão iguais para cada proteína investigada como amostra significativa (N=3). Foram realizadas 2 repetições, sendo que em cada repetição foram analisados 5 embriões de 21 dias (E21) para cada grupo experimental quanto a presença positiva ou negativa do receptor de melatonina do tipo Mel1a e da enzima QR2.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERES MORFOLÓGICOS EXTERNOS DO EMBRIÃO DE 21 DIAS (E21) DE *Kinosternon scorpioides*

O embrião de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides* mede cerca de 0,6 cm. É caracterizado por apresentar os seguintes caracteres morfológicos externos: arco mandibular, cauda em brotamento, fendas palatinas fechadas, poço olfativo, retina pigmentada, carapaça um pouco delimitada e com carenas longitudinais. O corpo ainda apresenta curvatura e está ocorrendo o alongamento dos membros anteriores e posteriores (Figura 03).

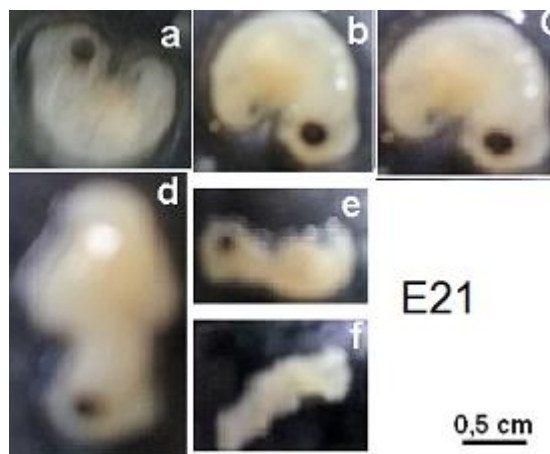


Fig. 03- Imagem de embrião de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides*. Tamanho real: 0,6 cm. Escala 0,5 cm. Figuras a, b,c) Vista lateral do embrião encurvado; d) Vista dorsal; e) Vista lateral do embrião parcialmente alongado. f) Vista lateral do embrião totalmente alongado. Note que o embrião apresenta cabeça com olhos pigmentados, fenda palatina fechada; membros anteriores e posteriores alongados, carapaça delimitada e sem pigmentação, e cauda em brotamento.

5.2- LOCALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE MELATONINA MEL1A EM EMBRIÕES INTEIROS DE *Kinosternon scorpioides* DE 21 DIAS (E21)

Ao analisar a localização do receptor Mel1a no desenvolvimento de *Kinosternon scorpioides* (muçunã), utilizando embriões de 21 dias (E21), através de imunoen-
saio, observou-se que o receptor de melatonina Mel1a está expressando-se em vários caracteres morfológicos externos utilizados como marcadores de desenvolvimento (WERNEBURG, 2009), ou seja na cabeça, mandíbula, maxilar, pescoço, ca-

rapaça e membro anterior (Figura 04). Nenhum sinal fluorescente foi observado nos controles negativos.

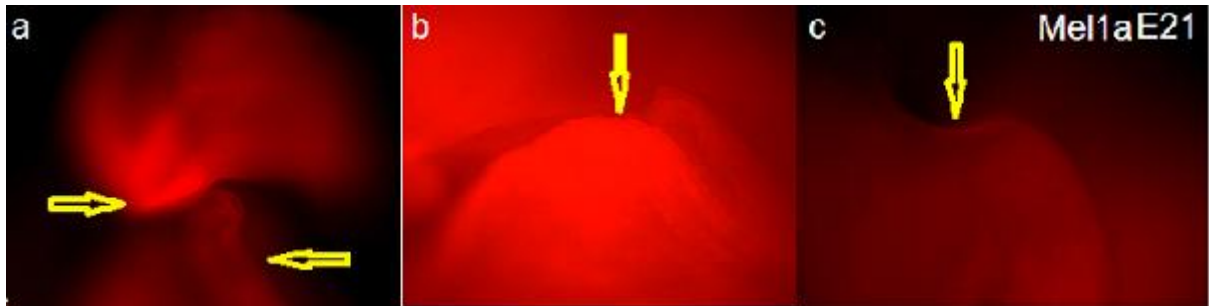


Figura 04- Micrografias em fluorescência de embrião inteiro de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides* apresentando marcação em fluorescência do receptor de melatonina Mel1a: a) Imagem lateral do embrião mostrando sinal na região maxilar, mandibular e na cauda em brotamento. Imagens feitas com objetiva de 25x b) Imagem lateral da região mandibular e membro anterior alongado. c) Imagem frontal e lateral da carapaça com marcação nas carenas longitudinais e escudos superiores primordiais. Nenhum sinal foi observado nos controles negativos. Imagens feitas com objetiva de 40x. Resolução de 1280x960.

Analisando o olho do embrião, observa-se a expressão do receptor Mel1a, conforme vemos na figura 05, principalmente nas áreas demarcadas pelas setas, (retina, fissura coróide e íris). Nenhum sinal fluorescente foi observado nos controles negativos.

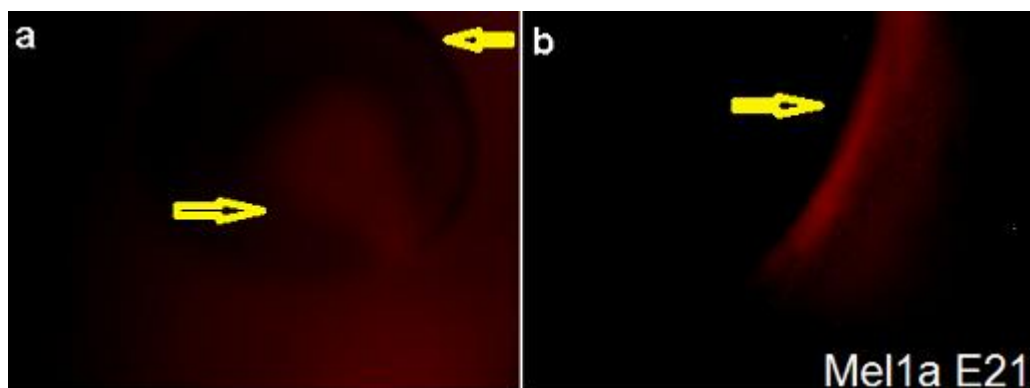


Fig. 05- Micrografias em fluorescência mostrando o olho de embrião de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides* para receptor de melatonina Mel1a. a) Vista frontal do olho com sinal na fissura coróide, na íris e no contorno externo. Visualizada com objetiva de 40x. b) Vista frontal do olho destacando a marcação no contorno do olho. Visualizada com objetiva de 100x. Nenhum sinal foi observado nos controles negativos. Resolução de 1280x960.

Baseado nos resultados morfológicos, verifica-se que o receptor de melatonina Mel1a está presente também em espécies de répteis como a tartaruga *Kinoster-*

non scorpioides e desde o início do seu desenvolvimento embrionário, conforme visto com apenas 21 dias embrionários no estágio 17 segundo Tokita e Kuratani (2001), com 41,7% de desenvolvimento.

5.3- LOCALIZAÇÃO DA ENZIMA QR2 EM EMBRIÕES INTEIROS DE *Kinosternon scorpioides* DE 21 DIAS (E21)

Ao analisar o embrião de 21 dias (E21) a fim de verificar a expressão da enzima QR2, observou-se que os caracteres morfológicos externos cabeça, pescoço, membros anterior e posterior e cauda estavam marcados por essa enzima que liga melatonina (Figura 06). Nenhum sinal fluorescente foi observado nos controles negativos.

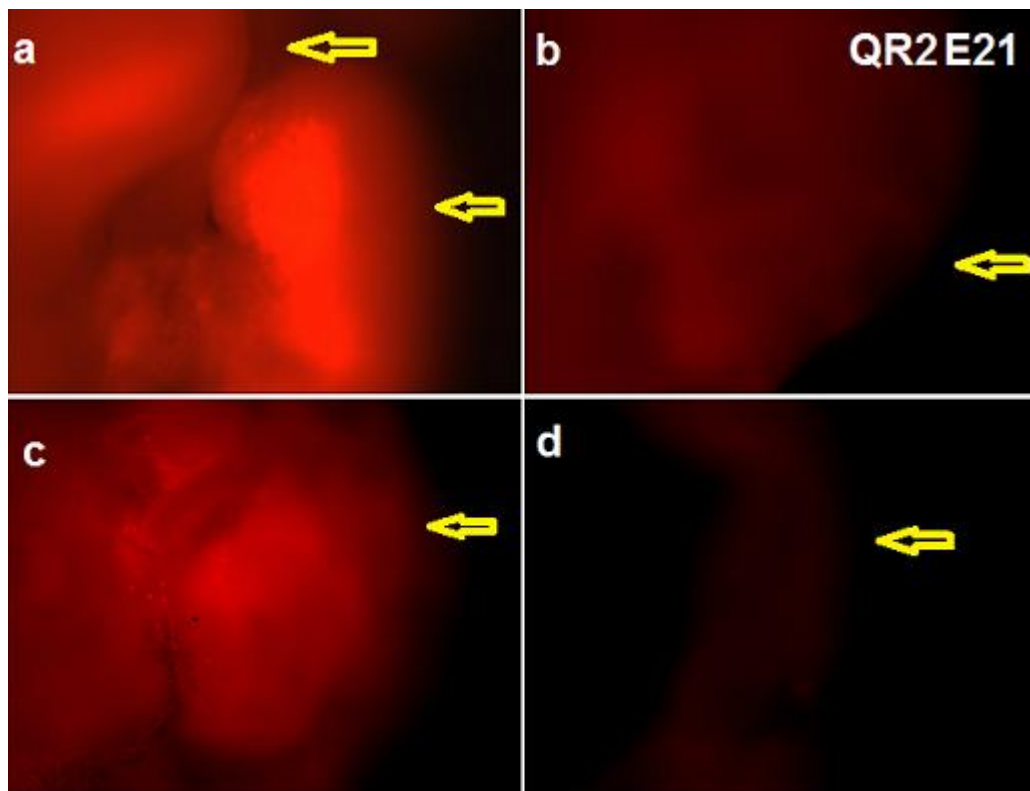


Fig.06- Micrografias de embriões inteiros de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides* com sinalização em fluorescência do sítio de ligação de melatonina QR2. a) Imagem lateral do embrião com marcação na região maxilar da face e no membro anterior alongado. Visualizada com objetiva de 25x. b) Imagem lateral com sinal no membro anterior alongado. c) Imagem lateral com sinal no membro posterior alongado. d) Imunofluorescência na cauda em brotamento. Nenhum sinal foi observado nos controles negativos. Magnificação de 40x. Resolução 1280x960.

Quando analisou-se o olho do embrião, é notável a marcação da enzima QR2 no cristalino e na íris do embrião de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides* (Figura 07). Nenhum sinal fluorescente foi observado nos controles negativos.

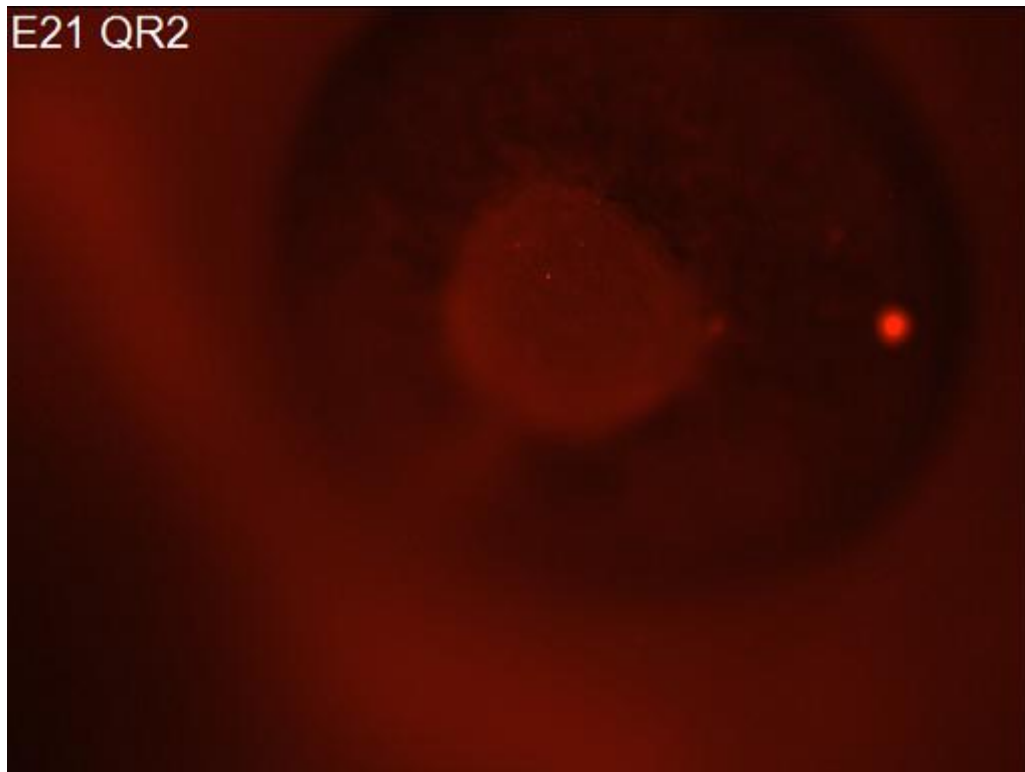


Fig. 07- Micrografia do olho de embrião de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides* marcado com fluorescência para a enzima QR2 no cristalino e na íris. Nenhum sinal foi observado nos controles negativos. Imagem feita com objetiva de 40x e resolução 1280x960.

5.4- MEL1A E QR2 EM RETINA INTEIRA DE *Kinosternon scorpioides* EMBRIONÁRIO

Para verificação da presença do receptor de melatonina Mel1a e do sítio de ligação de melatonina QR2 em retina embrionária de *Kinosternon scorpioides* foram utilizados 10 embriões de 21 dias (E21), sendo que 3 retinas foram analisadas no total.

Analisando a figura 08, observa-se que na retina de embrião houve marcação de Mel1a, QR2 e não houve marcação na retina controle desse grupo.

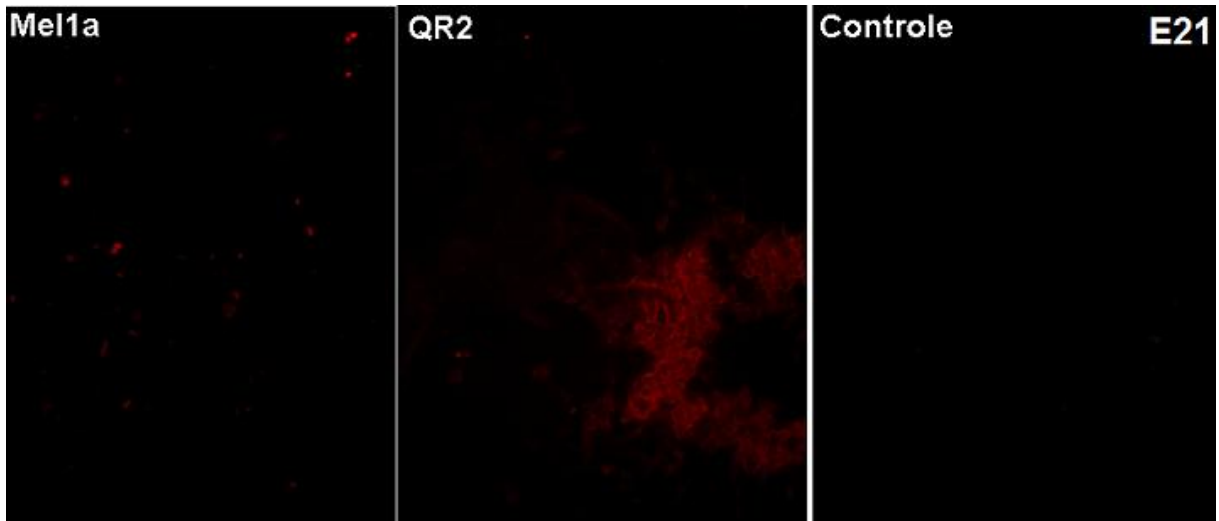


Fig. 08- Micrografias de retina de embrião de 21 dias (E21) de *Kinosternon scorpioides*. a) Imunofluorescência na área mais externa da retina inteira para o receptor Mel1a. b) Imunofluorescência da retina inteira para a enzima QR2. c) Controle negativo. Magnificação de 40x e resolução de 1280x960.

5.5- MEL1A E QR2 EM RETINAS DE ANIMAIS PÓS-ECLOSÃO (PH) DE *Kinosternon scorpioides*

Ao analisar 03 retinas de 03 animais pós-eclodidos com 60 dias de vida, observou-se que há a presença do receptor de melatonina Mel1a e do sítio de ligação de melatonina QR2, e que não houve nenhuma marcação na retina controle (Figura 09).

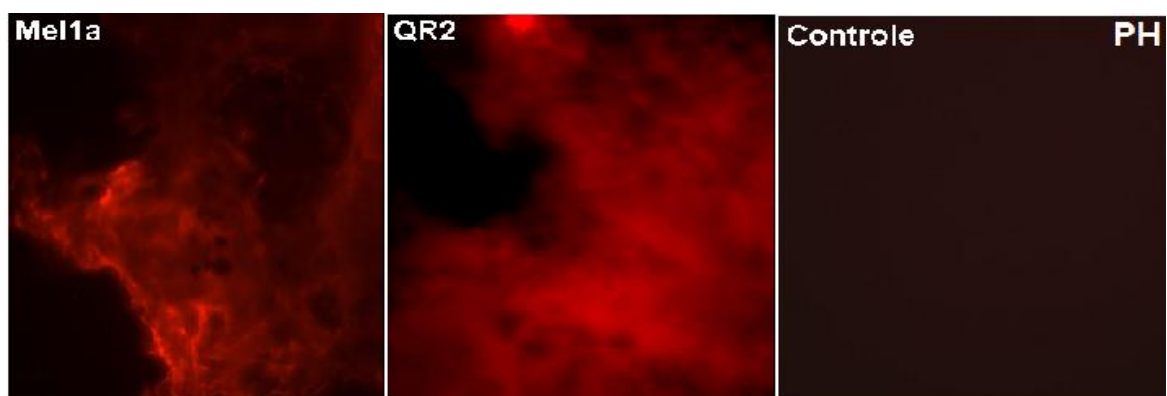


Fig. 09- Micrografias de retina de animais pós-eclodidos (PH) de 60 dias de *Kinosternon scorpioides*. a) Imagem frontal na área mais externa da retina marcada com receptor de melatonina Mel1a. b) Imagem frontal da retina marcada em um grupo de células marcados do sítio de ligação de melatonina QR2. c) Controle negativo. Objetiva de 40x e resolução de 1280x960.

6 DISCUSSÃO

Testudines vem sendo usados como modelo para estudar desenvolvimento de vertebrados (ABRAMYAN; LEUNG.; RICHMAN, 2014). *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766)(Testudines;Kinosternidae) é um testudine que tem como habitat natural a região do Panamá à Argentina. Sua reprodução é sazonal, mas nenhuma ritmicidade circadiana é observada para o comportamento de cópula dessa espécie (VOGT, 2008; BERRY; IVERSON, 2011). Estudos têm sido feitos para desenvolver a reprodução de *Kinosternon scorpioides* em cativeiro no norte e nordeste do Brasil (COSTA et al., 2009; RODRIGUES; BORGES-NOJOSA, 2013). Estudos bioquímicos, genéticos e morfológicos de Kinosternideos atestam que a espécie *Kinosternon scorpioides* foi o principal alvo evolutivo para o surgimento de novas subespécies (IVERSON et al., 2013). Essas espécies tem sido catalogadas em função de características morfológicas e distribuição geográfica (TTWG, 2011 e 2012). Em *Kinosternon scorpioides*, se tem notícia de um único estudo mostrando por ultrassonografia os estágios iniciais do desenvolvimento de folículos vitelogênicos e o desenvolvimento de ovos no oviduto (COSTA et al., 2009). Entretanto, como outros da mesma classe, *Kinosternon scorpioides* deve ter retardo no desenvolvimento nos estágios antes da postura dos ovos. Essa inibição ou cessação da divisão celular e da atividade metabólica evita danos durante a oviposição pelo movimento de embriões, assegurando que o desenvolvimento só seja retomado após a oviposição. Assim, todos os ovos eclodem no mesmo estágio embrionário (RAFFERTY; REYNA, 2012). Essas observações permitiram usar o dia embrionário a partir da postura neste estudo. Que se tenha notícia, um embrião de *Kinosternon scorpioides* é descrito pela primeira vez nesse trabalho, assim como é a primeira vez que o receptor de melatonina Mel1a e a enzima QR2 são mostrados em Testudines.

A informação sobre iluminação ambiental é traduzida em sinal endócrino pelo neurohormônio melatonina, o qual é sinal de escuro para o NSC e para relógios periféricos (LIU et al., 1997), dando origem aos ritmos biológicos. Esse hormônio tem síntese noturna na glândula pineal e na retina. Assim, melatonina modula reprodução, temperatura e comportamentos adaptativos em mamíferos (VON GALL et al., 2002), aves (BOIX-HINZEN; LOVEGROVE, 1998), anfíbios e répteis (LUTTERSCHMIDT et al., 2002). Essa indoleamina regula os relógios biológicos via o receptor de membrana acoplado a proteína Gi denominado Mel1a para vertebrados não ma-

míferos e MT1 para mamíferos (VON GALL et al., 2002). Esse receptor é o alvo para melatonina sinalizar reprodução sazonal em mamíferos (YASUO et al., 2009), mas não se sabe se pode estar relacionado ao comportamento reprodutivo de répteis. Ritmos circadianos são gerados em répteis por relógios biológicos localizados na retina, olho parietal, pineal e NSC (HERZOG; BLOCK, 1999). Interessantemente em tartarugas, o perfil de receptores de melatonina que resultou de ensaios de ligação com 2[¹²⁵I]-Iodomelatonina revelados por autorradiografia é o de uma distribuição densa, espalhada nas áreas visuais do cérebro e na glândula pineal, com ausência de receptores no NSC. Assim, fotoperíodo e informação visual são sinalizadas da retina para as estruturas cerebrais pelas mesmas fibras nervosas nessas espécies, onde a glândula pineal é a estrutura com a maior quantidade de receptores de melatonina (LARSON-PRIOR et al., 1996). Evolutivamente, ensaios de ligação com 2[¹²⁵I]-Iodomelatonina revelados por autorradiografia foram feitos para quantificar e localizar receptores de melatonina no cérebro e na retina de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Esses estudos comparativos mostram que a ação da melatonina via receptores em répteis é característica dessas espécies. De fato, cérebros de répteis e aves têm receptores de melatonina em maior número e em mais estruturas que aqueles de mamíferos, onde os receptores de melatonina estão mais concentrados na parte tubular da glândula pituitária e no NSC (CASSONE et al., 1995; TOSINI et al., 2001; VON GALL et al., 2002). Em aves, Mel1a e QR2 foram mostrados por imunofluorescência desde o dia embrionário 8 até pós-eclosão (SAMPAIO, 2013b) e não há informação sobre o perfil desses receptores no desenvolvimento da retina de mamíferos.

Não se sabe até que ponto a diferença evolutiva na localização de receptores de melatonina no cérebro pode gerar uma via de sinalização de sazonalidade reprodutiva diferente para Testudines, mas a retina, como porta de entrada, contém receptores de melatonina Mel1a e o sítio de ligação de melatonina QR2 desde os 21 dias embrionários. Esse receptor e sítio de melatonina foram localizados também em estruturas não neurais dos olhos de embriões, com uma intensa marcação de Mel1a na fissura óptica, que é a região por onde entram vasos sanguíneos; uma intensa fluorescência foi também observada na região ínter lateral externa do olho, que pode corresponder à pálpebra. QR2 está localizado diferente no olho, em estruturas como íris, cristalino e esclera. Não está completamente esclarecida a função dessa enzima no olho, muito menos no desenvolvimento de vertebrados (SAMPAIO, 2009;

SAMPAIO, 2013a e b).

O receptor de melatonina Mel1a é o primeiro receptor a ser caracterizado farmacologicamente em aves (SAMPAIO, 2008; 2010) e em anfíbios (ISORNA et al., 2005) no desenvolvimento embrionário. Camundongos geneticamente construídos sem o receptor de melatonina MT1 apresentam perda de fotoperiodicidade e envelhecimento precoce, mas aparentemente não possuem outras diferenças em relação ao tipo selvagem (YASUO et al., 2009). Essa observação indica que melatonina não é fundamental para a organogênese de mamíferos, o que pode ser uma outra grande diferença, se compararmos com aves e répteis.

Pesquisas demonstraram ausência de diferenciação se receptores de melatonina estão bloqueados em retinas de embriões de pintainhos (SAMPAIO et al., 2005; SAMPAIO; MARKUS, 2010). Portanto, a investigação sobre a relevância da melatonina para o desenvolvimento de aves e répteis está apenas iniciando.

Nesse trabalho mostrou-se em embriões de 21 dias a presença do receptor de melatonina Mel1a em áreas correspondentes à ossificação na face, cauda e carapaça. Esses resultados estão de acordo com resultados em mamíferos mostrando a participação do receptor MT1 na diferenciação de osteoblastos (SATOMURA et al., 2007; MANDUCA, et al., 2009; TANG et al., 2013). Se a participação do receptor Mel1a na diferenciação de osteoblastos for confirmada em lagartos, esse receptor pode ser um grande elo evolutivo na gênese desse tecido.

A localização da enzima QR2 foi diferente em embriões de 21 dias, quando comparado com Mel1a, exceto para os membros anteriores, posteriores e para a cauda, mas mesmo para esses caracteres morfológicos externos, o padrão de fluorescência foi diferente, especialmente para a cauda onde QR2 parece localizar-se mais superficialmente que Mel1a.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou a presença do receptor da melatonina (Mel1a) e da enzima quinona redutase (QR2) em *Kinosternon scorpioides* de 21 dias e 60 dias pós-eclosão. Comparando o receptor Mel1a e o sítio de ligação de melatonina QR2, verificou-se que eles apresentam localização diferente no embrião. O Mel1a foi localizado bastante na carapaça do embrião, regiões maxilar e mandibular; e ainda no que parece ser a região de ossificação da cauda em brotamento, enquanto a enzima QR2 marcou tecidos superficiais da cauda. A localização do receptor Mel1a está de acordo com função desse receptor em osteogênese, conforme é observado em mamíferos. Enquanto a enzima QR2, localizada em tecidos superficiais, está de acordo com sua função de proteção contra xenobióticos. Ambos estão localizados em tecidos oculares embrionários e na retina, o que sugere participação na formação do olho de modo geral e da retina.

Após os resultados obtidos, observou-se que estudos a respeito da ação da melatonina em animais que apresentam sazonalidade reprodutiva como é o caso de *Kinosternon scorpioides*, é muito importante para o manejo, uma vez que, ela orienta eventos relacionados a iluminação ambiental, sinalizando assim o início da reprodução nesses animais, mas além disso, a presença do receptor Mel1a e do sítio de ligação QR2, induz que esse hormônio também é primordial para o desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ABRAMYAN, J.; LEUNG, K.J.; RICHMAN, J.M. Divergent palate morphology in turtles and birds correlates with differences in proliferation and BMP2 expression during embryonic development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* Feb;322(2):73-85, 2014.
- ACUNA-CASTROVIEJO, D. et al. Melatonin role in the mitochondrial function. **Front Biosci.** 12:947-63, 2007.
- AGUILAR-ROBLERO, R. et al. The brain decade in debate: IV Chronobiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 34: 831-841, 2001
- ARENDDT, J. Aaron Lerner, Who discovered melatonin. **J. Pineal Res.,** 43 (1): 106-107, 2007.
- BARRETO, L. et al. Observations on the ecology of *Trachemys adiutrix* and *Kinosternon scorpioides* on Curupu Island, Brazil. **Herpetological Review,** v. 40, p. 283-286, 2009.
- BARROS, V.R.P. **Estudo da expressão de receptores de melatonina (MT1) e hormônio folículo estimulante (FSHR) e influência da melatonina e do fsh em meio de cultivo sequencial sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.** Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 2013.
- BENÍTEZ-KING, G. et al. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. **Life Sci.** 53(3):201-7, 1993.
- BERRY, J. F.; IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1766)- Scorpion Mud Turtle. **Chelonian Research Monographs,** N° 5, p. 063-1 – 063-15, 2011.
- BOIX-HINZEN, C.; LOVEGROVE, B.G. Circadian metabolic and thermoregulatory patterns of red-billed woodhoopoes (*Phoeniculus purpureus*): the influence of huddling. *J. Zool. Lond.* 244: 33-41, 1998.
- BOUTIN, J.A. et al. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends Pharmacol. Sci.,** 26(8); 412-419, 2005.
- CARVALHO R.C. et al. Anatomia da traquéia e pulmão do muçua (*Kinosternon scorpioides*). **Braz. J. Morphol. Sci.**17(1):165-166, 2000.
- CARVALHO-BARROS, R. A. **Anatomia macro e microscópica da glândula pineal de (*Cebus apella*).** Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Brasil, 165pp., 2006.
- CASAO, A. et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res,* 48(1), 39-46, 2010.

CASSONE, V.M. et al. Comparative Distribution of 2[¹²⁵I]iodomelatonin Binding in the Brains of Diurnal Birds: Outgroup Analysis with Turtles. *Brain Behav. Evol.* 45: 241-256, 1995.

CASTRO, A. B. **Biologia reprodutiva do muçuã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro.** Resumo. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Rural da Amazônia, Belém, 2006.

CHAVES, E.P. et al. **Morphological aspects of the ovaries of turtle *Kinosternon scorpioides* raised in captivity.** *Pesq. Vet. Bras.* 32(7):667-671, 2012.

CHUFFA, L.G.A. **Ação da Melatonina sobre os receptores esteroides sexuais no ovário, oviduto e útero e o estresse oxidativo nos ovários de ratas adultas U-ChB (Consumidoras Voluntárias de Etanol a 10%) durante a ovulação.** Tese (Doutorado). Curso de Pós graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

COSTA, F.B. et al. **Ultrasonographic and radiographic determination of egg development of jurarás (*Kinosternon scorpioides*) in captivity.** *Pesq. Vet. Bras.* 29(10):841-846, 2009.

DELDUQUE, M. Ficha do Bicho: Muçuã. **Globo Rural.** V. 176, p. 1-4, 2000.

DELATTRE, E. Ritmos hormonais do pâncreas endócrino: dos fundamentos cronobiológicos às implicações clínicas. *Medicina*, Ribeirão Preto, jan/jun, 2004.

DIBNER, C. et al. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. ***Annu Rev Physiol.*** 17;72:517-49, 2010.

DRUST, B. et al. Circadian rhythms in sports performance — an update. ***Chronobiology International***, Oxford, v.22, n.1, p.21-44, 2005.

DUBOCOVICH, M.L. et al. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 12:1211–1220, 1998.

DUBOCOVICH, M.L. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. ***Front Biosci.*** 8(10):1093-108, 2003.

DUBOCOVICH, M.L. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. ***Pharmacol Rev.*** 62(3): 343-80, 2010.

FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Characterization of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. ***Eur. J. Pharmacol.***, v. 415, p. 151-156, 2001.

FERREIRA JÚNIOR, P. D. Aspectos Ecológicos da determinação sexual em tartarugas. ***Acta Amazonica***, 39 (1): 139-154, 2009.

- FOSTER, R.G.; HANKINS, M.W. Circadian vision. **Curr Biol.** 17(17): 746-751, 2007.
- FUJINOKI, M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*, 136(5), 533-541, 2008.
- GOMES, M. G. T. et al. Tartarugas marinhas de ocorrência no Brasil: hábitos e aspectos da biologia da reprodução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 1/2, p.19-27, jan./jun., 2006.
- HERZOG, E.D.; BLOCK, G.D. Keeping na eye on retinal clocks. *Chronobiology International*, 16(3), 229-247, 1999.
- ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Fauna Brasileira**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira.html>>. Acesso em: 06 de junho de 2013.
- ISORNA, E. et al. Ontogeny of central melatonin receptors in tadpoles of the anuran *Rana perezi*: modulation of dopamine release J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 191 (12) :1099-1105, 2005.
- IVERSON, J. B.;LE, M.; INGRAM, C. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69 (3): 929–939, 2013.
- KANDEL, E.R. et al. **Princípios da Neurociência**. Pereira ACG, tradutor. 4th Ed. São Paulo: Manole; 1412p, 1991.
- KITAY, J.I; ALTSCHULE, M.D. Effects of pineal extract administration on ovary weight in rats. **Endocrinology**. 65, 782-784, 1954.
- KORF, H. W. et al. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, Berlin, v. 146, p. 1-100, 1998.
- LARSON-PRIOR, L.J. et al. Localization of 2-[¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in visual áreas of the turtle brain. *European Journal of Pharmacology*. 297: 181-185, 1996.
- LE, M.; MCCORD, W.P.; IVERSON. J.B. On the paraphyly of the genus *Kachuga* (Testudines: Geoemydidae). **Mol. Phylogenet. Evol.** 45:398-404, 2007.
- LIU, C. et al. Molecular Dissection of Two Distinct Actions of Melatonin on the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron*, vol. 19, 91-102, 1997.
- LUBOSHITZKY, R. et al. Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *J Androl*, 23(4), 572-578, 2002.
- LUTTERSCHMIDT, D.I. et al. Behavioral Thermoregulation and the Role of Melatonin in a Nocturnal Snake. *Hormones and Behavior*, 41: 41-50, 2002.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Ateneo, p. 237-241, 1993.

MACHADO, A. B.M. et al. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1 ed. Brasília: MMA; Belo Horizonte:Fundação Biodiversitas, 1429p, 2008.

MACHADO JÚNIOR, A. A. N.et al. Morfologia dos órgãos genitais femininos do muçã (*Kinosternon s. scorpioides*). **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 25-29, 2006.

MANDUCA, P. et al. Role of MT1-MMP in the osteogenic differentiation. *Bone*. Feb;44(2):251-65, 2009.

MARKUS, R.P. et al. **Glândula Pineal e Melatonina**. São Paulo: FAPESP, 2002.

MARKUS, R. P.; TAMURA, E.K. G protein-coupled receptors and others mechanisms that translate melatonin effects. *In: G protein-coupled receptors: comparative perspectives*. Kerala: Ed. Research Signpost, v. 37, p. 93-101, 2009.

MARQUES, M.D. et al. Adaptação temporal. In Marques N e Menna-Barreto L, editors. *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 45-84, 2003.

MARQUES, J. R. F. **Conservação do Muçã (*Kinosternon scorpioides*) na ilha de Marajó**. Belém. Embrapa Amazônia Oriental / FUNTEC (Relatório Final do Projeto).33p, 2005.

MENNA-BARRETO, L.; MARQUES, N. O tempo dentro da vida, além da vida dentro do tempo. **Ciência e cultura**, 54 (2), 44-46, 2002.

MENNA-BARRETO, L. O tempo na Biologia. Em: N. Marques; L. Menna-Barreto. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicações* (pp. 26-29). São Paulo: Edusp, 2003.

NAJI, L. et al. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sciences*. 18, 2227-2236, 2004.

NOSJEAN, O. et al. Identification of the melatoninbinding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. of Biol.Chem*. 275, 31311–7, 2000.

NOSJEAN, O. et al. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol*. 61,1369–1379, 2001.

PANDI-PERUMAL, S.R. et al. **Melatonin- Nature's most versatile biological signal?** *Febs Journal*.; 273(13): 2813-38, 2006.

POUGH, F. H. et al. **A Vida dos Vertebrados**. 4 ed., São Paulo: Atheneu Editora , 839 p., 2008.

POZO, D. et al. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole- O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J. Pineal Res.* 37, 48–54, 2004.

PURVES, D. et al. **Neuroscience**. 2 Ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001.

RAFFERTY, A. R.; REINA, R.D. **Arrested embryonic development: a review of strategies to delay hatching in egg-laying reptiles**. Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences. 1-10, 2012.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. **J Biomed Sci.**, (7): 444-458, 2000.

REITER, R.J. ; TAN, D.X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research.* 58:10–19, 2003.

REITER, R.J. et al. Melatonin and reproduction revisited. **Biol. Reprod.** v.81, p.445-456, 2009.

REPPERT, S.M. et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8734–8738, 1995.

RODRIGUES, J.F.M.; BORGES-NOJOSA, D.M. Do male *Kinosternon scorpioides* (LINNAEUS, 1766) select and monopolize females? *HERPETOZOA* 26 (3/4) Wien, 186-188, 2013.

SAMPAIO, L.F. et al. Influence of melatonin on the development of functional nicotinic acetylcholine receptors in cultured chick retinal cells. **Braz J. Med Biol Res.** 38(4): 603-13, 2005.

SAMPAIO, L.F.S. Melatonin inhibitory effect on cAMP accumulation in the chick retina development. **Int. J. Devl Neuroscience.** (26): 277–282, 2008.

SAMPAIO, L.F.S. An unexpected effect of 5-MCA-NAT in chick retinal development. **Int. J. Devl Neuroscience.** (27): 511–515, 2009.

SAMPAIO, L.F.; MARKUS, R.P. Melatonin and the time window for the expression of the alpha8 nicotinic acetylcholine receptor in the membrane of chick retinal cells in culture. **Int J Dev Neurosci.** 28(3): 245-9, 2010.

SAMPAIO, R.V. et al. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 10:103, 2012.

SAMPAIO, L.F.S. Catecholquinones as Substrates of the NRH: Quinone Oxidoreductase 2 in the Brain and Retina. In: *Quinones: Occurrence, Medicinal Uses and Physiological Importance*. Johnson SC, Price ER, New York: NOVA Publishers, pp. 141-156, 2013.

SAMPAIO, L.F.S. By Receptors, Binding Sites or Free Radical Scavenger Action: Is There a Pivotal Action Mechanism for Melatonin in Retinal Pathologies? In: *New Developments in Melatonin Research*. Acuña-Castroviejo D, Rusanova I, Escames G. New York: NOVA Publishers, pp. 193-204, 2013.

SATOMURA, K. et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res.* Apr;42(3):231-9, 2007.

SHIU, S. Y. et al. Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol Signals Recept*, 9(3-4), 172-187, 2000.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.** v. 55, p. 325-395, 2003.

SLOMINSKI, A. et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine.* 27, 137–148, 2005.

SOUZA, W.J.S.; COSTA, A.C.L. Variação Sazonal do Saldo de Radiação para Três Ecossistemas Amazônicos. *Anais do XII Congresso Brasileiro de Meteorologia*, Foz de Iguacu-PR, 2002.

SRINIVASAN, V. et al. Melatonin, immune function and aging. *Immun Ageing*, 29(2):17, 2005.

TAN D.X. et al. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine.* 1: 57-60, 1993.

TANG, Y. et al. MT1-MMP-dependent control of skeletal stem cell commitment via a β 1-integrin/YAP/TAZ signaling axis. *Dev Cell.* May 28;25(4):402-16, 2013.

TOKITA, M; KURATANI, S. Normal Embryonic Stages of the Chinese Softshelled Turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). **Zoological Science**, 18:, p. 705–715, 2001.

TOSINI, G. et al. The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiology & Behavior*, 72(4), p. 461-471, 2001.

TTWG, TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP, VAN DIJK, P.P. et al. *Turtles of the World, 2011 Update: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status*. Chelonian Research Monographs. Chelonian Research Monographs, No. 5, 165-242, 2011.

TTWG, TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP, VAN DIJK, P.P. et al. *Turtles of the World, 2012 Update: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status*. Chelonian Research Monographs, No. 5, 243-328, 2012.

VOGT, R.C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, 104p, 2008.

VON GALL, C. et al. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309: 151-162, 2002.

WÄSSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. **Nat Rev Neurosci**, v.5, p.747-57, 2004.

WERNEBURG, I. A Standard System to Study Vertebrate Embryos. *Plos one*, 4(6), june 2009, volume 4, e5887, 2009.

WIECHMANN, A.F.; SHERRY, D.M. Role of melatonin and its receptors in the vertebrate retina. **Int Rev Cell Mol Biol.** 300:211-42, 2013.

WITT-ENDERBY, P.A. et al. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanism. **Life Sci.**, v. 72, p. 2183-2198, 2003.

YANG, X. J. Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. **Semin Cell Dev Biol** 15, 91-103, 2004.

YASUO, S. et al. Melatonin Transmits Photoperiodic Signals through the MT1 Melatonin Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 29(9):2885–2889, 2009.