


SIMONE FANAN

**ESTUDOS *in vitro* SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMUTAGÊNICA E POTENCIAL DE RISCO DA
MELATONINA**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Simone Fanan
e aprovada pela Comissão Julgadora.


16/04/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Edwiges
Hoffmann
Instituto de Biologia/UNICAMP

Campinas, 1999

9912226

UNICAMP
BIBLIOTECA

UNIDADE	BC
CHAMADA:	
ESTADO:	SP
CIDADE:	F212e
PREÇO:	35 887
DATA:	22/06/99
IMPRESSÃO:	<input checked="" type="checkbox"/>
RECEBIDO:	R\$ 11,00
DATA:	11/06/99
P.º CPO:	

CM-00123994-3

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Fanan, Simone

F212e Estudos *in vitro* sobre a atividade antioxidante, antimutagênica e potencial de risco da melatonina/
Simone Fanan. -- Campinas, SP:[s.n.], 1999.
105f.:ilus.

Orientadora: Maria Edwiges Hoffmann
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

I. Melatonina. 2. Toxicidade. I. Hoffmann, Maria Edwiges.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Campinas, 16 de abril de 1999.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann
Depto. Bioquímica/IB/UNICAMP



Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli
Depto. Embriologia e Histologia/ICB/USP



Prof. Dr. Luiz Eduardo Soares Neto
Depto. Bioquímica/IB/UNICAMP



SUPLENTE

Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo
Depto. Bioquímica/IB/UNICAMP



AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram, diretamente ou indiretamente, na realização deste trabalho, mas eu gostaria de dedicar agradecimentos especiais a algumas, sem as quais isto tudo não seria possível.

À Ind. e Comércio de Cosméticos Natura Ltda. por oferecer a oportunidade de realizar este estudo, e pelo auxílio financeiro.

Aos professores Dra. Gláucia M. M. Santeli, Dr. Luiz E. S. Neto e Dra. Satie Hatsushika Ogo pelas discussões e sugestões apresentadas a este trabalho.

Ao Philippe Joseph Pommez por oferecer a oportunidade de aprendizado.

À profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann pela orientação e pelo crédito depositado em mim, e pela força transmitida nos momentos mais difíceis.

Ao prof. Dr. João Antônio P. Henriques, por ceder gentilmente seu laboratório para a realização de uma parte do trabalho.

À Neuza Neritan pelo apoio com o material de cultura e pela manutenção das células, além do carinho e da atenção dada durante todos os momentos.

À todos os outros colegas do Laboratório de Toxicologia Celular e Molecular: Cláudia, Denise, Maribel e Marlene.

À Ana Lúcia Pereira pela ajuda na finalização do trabalho.

Ao Jean Luc Gesztesi pela paciência e sabedoria ao me ajudar nos momentos mais difíceis.

À minha mãe e ao meu pai pelo amor, apoio e segurança que sempre me deram. Mas, principalmente, por terem me ensinado a seguir meus objetivos, por terem transmitido tão bem o que é certo e o que é errado. Toda a minha determinação e vontade eu devo a eles.

Ao meu querido e amado David, pelo amor e paciência dedicado a mim durante todo este tempo. E por não ter deixado eu desistir nunca em momento algum.

À Paola, minha querida amiga, por sempre ter me escutado, com paciência e carinho.

Ao pessoal da Natura pela grande torcida!!

E à minha alma gêmea ...

PASSAGEM DA NOITE

*... Sinto que é noite no vento,
noite nas águas, na pedra ...
... É noite, não é morte, é noite
de sono espesso e sem praias.
Não é dor, nem paz, é noite,
é perfeitamente a noite.*

*Mas salve, olhar de alegria!
E salve, dia que surge!
Os corpos saltam do sono,
o mundo se recompõem.
... Existir: seja como for.
A fraterna entrega do pão.
Amar: mesmo nas canções.
De novo andar: as distâncias,
as cores, posse das ruas.
Tudo que à noite perdemos
se nos confia outra vez.
... Clara manhã, obrigado,
o essencial é viver!
Carlos Drummond de Andrade*

POÉTICA

*De manhã escureço
De dia tardeo
De tarde anoiteço
De noite ardo.*

.....

Vinicius de Moraes

SUMÁRIO

RESUMO	1
LISTA DAS FIGURAS E TABELAS	4
LISTA DAS ABREVIACÕES	7
INTRODUÇÃO	9
1. <i>Glândula Pineal e a Biossíntese da Melatonina</i>	10
2. <i>Espécies Reativas de Oxigênio em Sistemas Biológicos</i>	15
3. <i>Melatonina como Antioxidante</i>	19
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS	26
1. <i>Reagentes e Soluções</i>	27
1.1. Reagentes	27
1.2. Soluções e meios de cultura	27
2. <i>Métodos</i>	29
2.1. Melatonina: caracterização e propriedades	29
2.2. Determinação da atividade mutagênica e anti-mutagênica da melatonina	31
2.3. Determinação da citotoxicidade celular	33
2.4. Avaliação da atividade antioxidante da melatonina	34
RESULTADOS	38
1. <i>Melatonina: Caracterização e Propriedades</i>	39

<i>2. Determinação da Atividade Mutagênica e Anti-Mutagênica da Melatonina</i>	45
<i>3. Determinação da Citotoxicidade Celular</i>	52
<i>4. Avaliação da Atividade Antioxidante da Melatonina</i>	57
4.1. Atividade antioxidante da melatonina em solução	57
4.2. Efeito antioxidante da melatonina em cultura de células V79	61
4.3. Efeito antioxidante da melatonina em eritrócitos humanos	66
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	79
SUMMARY	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS	97

RESUMO

A melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, apresenta um grande interesse na atualidade, devido à demonstração de sua ação antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Neste trabalho, foi investigado o potencial de risco genético e toxicológico da melatonina em culturas de células, e sua atividade antimutagênica.

A mutagenicidade da melatonina foi determinada pelo teste de Ames, na presença e na ausência de ativação metabólica (fração S9), nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97, TA100 e TA102. A exposição das culturas por 30 minutos, à diferentes concentrações de melatonina (29-1160 µg/placa) não induziu nenhum aumento significativo do número de colônias revertentes, tanto na presença como na ausência de ativação metabólica. A melatonina mostrou, também, uma reversão dose-dependente (29 - 232 µg/placa) dos efeitos mutagênicos causados pelo H₂O₂ (0,5 mM), na linhagem TA102. A atividade citotóxica da melatonina para fibroblastos de hamster chinês (linhagem V79) foi determinada pela medida de seus efeitos sobre a viabilidade e proliferação celular. A melatonina não alterou a viabilidade celular, medida pela redução do MTT, na faixa de concentração entre 0,0001 a 1 mM. A exposição das células por 30 minutos a diferentes concentrações de melatonina (0,01 - 5 mM) não causou inibição significativa do crescimento celular, no período de 24 horas subsequente ao tratamento. Entretanto, a exposição das células por 24 horas a concentrações de melatonina entre 0,5 a 5 mM, causou inibição significativa do crescimento celular, de forma dependente da dose. A melatonina mostrou ser um antioxidante altamente eficiente em solução, inibindo a oxidação degradativa da desoxirribose, induzida pelo sistema H₂O₂/Fe⁺³/NTA, de forma dependente da dose. Este hormônio foi 10 vezes mais eficiente que a glutatona e 200 vezes mais que o manitol, ao sequestrar os radicais hidroxila. Porém, o trolox foi 15 vezes mais eficaz que a melatonina. Entretanto, ao avaliar crescimento celular em fibroblastos V79, a melatonina (0,001 mM) mostrou uma proteção apenas parcial (50 ± 7%) do efeito inibitório induzido por H₂O₂ (50 µM). Contudo, a melatonina não protegeu a membrana mitocondrial de fibroblastos V79 contra os ataques dos oxidantes H₂O₂ e HPC (2,5 mM), como demonstrado pela ausência de proteção no ensaio do MTT. Já em eritrócitos humanos, ela mostrou ser um antioxidante eficiente contra a peroxidação lipídica, induzida pelo H₂O₂ (5 mM), apresentando um efeito protetor dose-dependente.

Estes resultados indicam que a melatonina não é mutagênica e, além disso, inibe a mutação induzida pela H_2O_2 . A análise da toxicidade da melatonina pelas células V79 mostrou que a melatonina é citotóxica somente quando presente em altas concentrações e por tempo prolongado. A melatonina mostrou ser um eficiente antioxidante em sistema livre de células, em cultura de fibroblastos V79 apresentou proteção apenas parcial contra os efeitos da H_2O_2 . Entretanto, em eritrócitos mostrou eficiente proteção contra danos de membrana induzidos por este oxidante.

LISTA DAS FIGURAS E TABELAS

- Tabela 1.** Concentrações (mM) da melatonina, em soluções sonicadas e não sonicadas, antes e após estocagem.
- Tabela 2.** Bandas de absorção observadas para cada grupo funcional da molécula de melatonina, experimental e teórica.
- Tabela 3.** Conversão das unidades de concentração.
- Tabela 4.** Indução de revertentes de His⁺ na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA97, pela melatonina
- Tabela 5.** Indução de revertentes de His⁺ na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA100, pela melatonina.
- Tabela 6.** Indução de revertentes de His⁺ na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA102, pela melatonina.
- Tabela 7.** Inibição da degradação oxidativa da desoxirribose
- Figura 1.** Superfície medial do hemisfério direito do cérebro humano.
- Figura 2.** Produção da melatonina nos pinealócitos.
- Figura 3.** Mecanismo de metabolização da melatonina no fígado.
- Figura 4.** Mecanismo de sequestro de radicais livres pela melatonina.

- Figura 5.** Espectro UV da melatonina em solução aquosa.
- Figura 6.** Espectro UV da melatonina em solução aquosa, após estocagem.
- Figura 7.** Espectros da melatonina na região do infra vermelho.
- Figura 8.** Efeito anti-mutagênico da melatonina.
- Figura 9.** Efeito da melatonina sobre a viabilidade celular.
- Figura 10.** Efeito da melatonina sobre a proliferação celular após curta exposição.
- Figura 11.** Efeito da melatonina sobre a proliferação celular após exposição prolongada.
- Figura 12.** Efeito da melatonina sobre a degradação oxidativa da desoxirribose.
- Figura 13.** Efeito dos antioxidantes sobre a degradação oxidativa da desoxirribose.
- Figura 14.** Efeito da melatonina sobre a inibição da proliferação celular, induzida por H_2O_2 .
- Figura 15.** Efeito da melatonina sobre a inibição da viabilidade celular, induzida por H_2O_2 .
- Figura 16.** Efeito da melatonina sobre a inibição da viabilidade celular, induzida por HPC.
- Figura 17.** Indução de peroxidação lipídica em eritrócitos humanos por H_2O_2 .

Figura 18. Efeito da melatonina sobre a peroxidação lipídica em eritrócitos induzida por H_2O_2 .

LISTA DAS ABREVIÇÕES

A	Adenina
AFB₁	Aflotoxina B ₁
Az	Azida sódica
C	Citosina
λ	Comprimento de onda
CAT	Catalase
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ϵ	Coefficiente de extinção
EDTA	Etileno diamino tetra-acetato dissódico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G	Guanina
GP	Glândula pineal
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
Hb	Hemoglobina
His⁺	Colônias revertentes de histidina
HIOMT	Hidroxiindol-O-metiltransferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO[•]	Radical hidroxila
HPC	Hidroperóxido de cumeno
HRP	Peroxidase de raiz forte
hs	Horas
IM	Índice mutagênico

IV	Infra vermelho
MDA	Malondialdeído
min	Minutos
MTT	Sal de tetrazolium: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
MLT	Melatonina: N-acetil-5-metoxitriptamina
NEP	Norepinefrina
NO	Óxido nítrico
4-NQO	Óxido de 4-nitroquinolina
NTA	Nitrilo triacetato
O₂^{•-}	Radical ânion superóxido
PBS	Tampão salina fosfato
SAM	S-adenosilmetiona
SD	Superóxido dismutase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
T	Timina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBAR's	Produtos reativos com TBA
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris[hidroximetil]amino-metano
UV	Ultra violeta

INTRODUÇÃO

1. Glândula Pineal e a Biossíntese da Melatonina

A glândula pineal (GP) possui este nome devido ao seu formato parecido com uma pinha. Em anfíbios ela é, principalmente, um órgão fotorreceptivo; porém, em organismos mais evoluídos, sua principal função está na produção de hormônios através da percepção de luz e escuro pelos olhos e nervos simpáticos (Norman & Litwack, 1997).

A melatonina (MLT) foi descoberta há 30 anos como sendo um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal em mamíferos (Reiter *et. al.*, 1994). Outros produtos da pineal incluem metoxiindois, serotonina e N-acetilserotonina. A produção de metoxiindois é dependente do ciclo luz-escuro, e estes hormônios possuem como função regular a atividade reprodutiva sazonal. Existem algumas diferenças de opinião sobre a ação destes hormônios na ação fisiológica. A MLT é, hoje, a principal substância ativa produzida pela pineal, e pode substituir muitas das funções desta glândula após a pinealectomia (Norman & Litwack, 1997). A síntese da MLT pela GP é controlada pela liberação da norepinefrina (NEP), pelos neurônios vizinhos. Esta liberação da NEP e o trabalho da GP ocorre essencialmente na escuridão e é suprimida pela luz ambiente. As condições luz-escuro são transmitidas através dos olhos pelo núcleo supraquiasmico. Em humanos, a GP está localizada no cérebro, grosseiramente, entre o corpo caloso e o cerebelo (figura 1).

O triptofano é o precursor da MLT. Depois de ser transportado pelo sistema vascular sanguíneo extracelular e levado até o pinealócito, este aminoácido é convertido para 5-hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase (figura 2). Serotonina (5-hidroxitriptamina) é o produto do próximo passo pela ação da L-amino-ácido aromático descarboxilase sobre o 5-hidroxitriptofano. A concentração de serotonina na GP é maior durante as horas do dia, na escuridão ela é convertida para MLT ou é utilizada em algumas outras reações. Existem duas enzimas para esta conversão: N-acetiltransferase e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT). A primeira catalisa a transferência de um grupo acetila da acetil coenzima A para a serotonina, e a segunda catalisa a transferência de um grupo metila da S-adenosilmetiona (SAM) para o 5-hidroxi da N-acetilserotonina (Tan *et. al.*, 1993). O produto desta última reação é a MLT(5-metoxi-N-acetilriptamina).

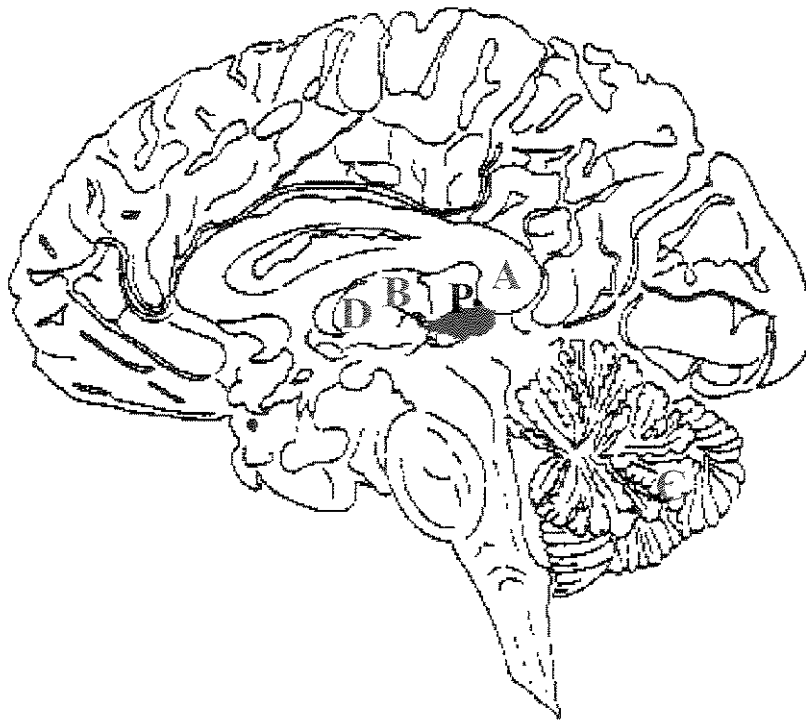
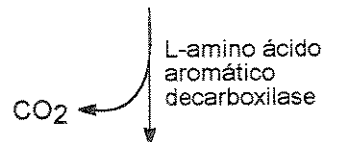
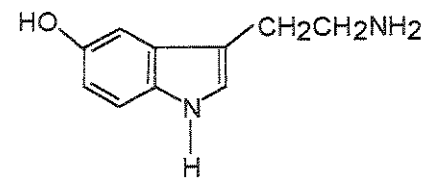


Figura 1. Superfície medial do hemisfério direito do cérebro humano. Abreviações: (A) esplênio do corpo caloso; (B) comissura habenular; (C) cerebelo; (D) terceiro ventrículo; (P) glândula pineal.

CLARO

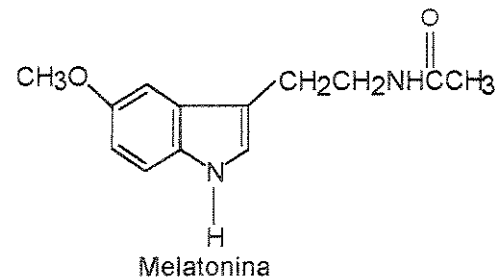
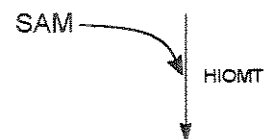
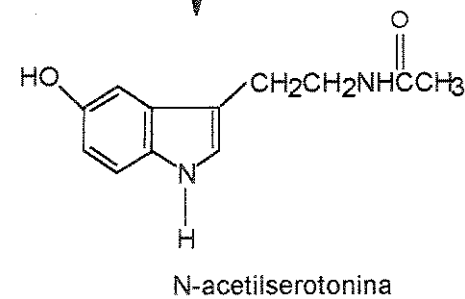
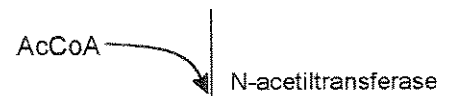


Acumula na pineal na presença de luz e uma parte é secretada



ESCURO

Liberação da norepinefrina na ausência de luz
Aumento do AMP cíclico com elevada biosíntese de N-acetiltransferase



Secretada durante a noite

Figura 2. Produção da melatonina nos pinealócitos.

Praticamente, toda a MLT produzida pela GP é rapidamente secretada para a corrente sanguínea e uma parte eliminada na urina, principalmente como 6-sulfatomelatonina, após sua metabolização no fígado (Norman & Litwack, 1997).

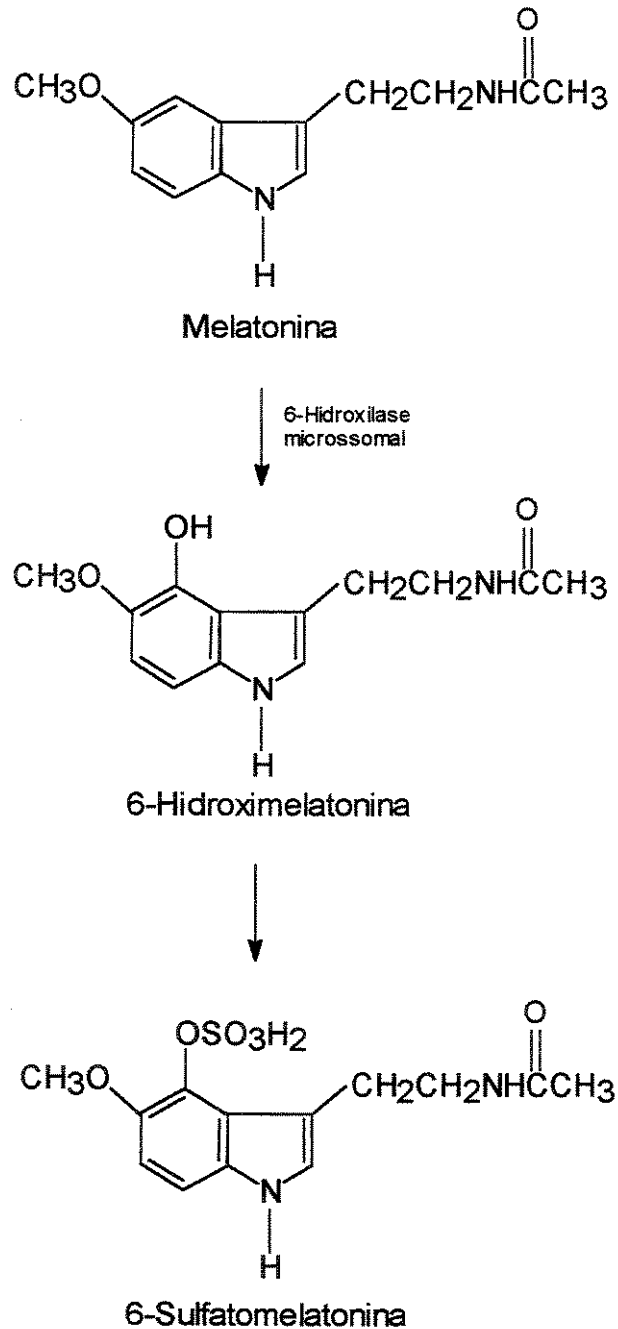


Figura 3. Mecanismo de metabolização da melatonina no fígado.

De acordo com os mecanismos descritos anteriormente, em vertebrados e em dinoflagelados a produção da MLT exibe um ritmo circadiano, com níveis sanguíneos máximos durante a noite (Poeggeler, 1991). Este ritmo de síntese da MLT parece estar relacionado com outros processos cíclicos, como, a reprodução e estações do ano (Brainard *et al.*, 1982; Caroleo *et al.*, 1994). Alguns trabalhos mostram que o maior nível desta indolamina é encontrada essencialmente entre uma e cinco horas da manhã, e o pico de concentração fica entre 1.500 e 2.000 pg/glândula na GP e 250 a 300 pg/ml (1,1 a 1,3 pM) no plasma sanguíneo de ratos jovens (Huether, 1994; Reiter, 1985). Em humanos jovens, o pico de concentração fica entre 80 e 100 pg/ml (revisado por Reiter, 1995).

A biodisponibilidade da MLT exógena não é bem conhecida. De acordo com estudos recentes (Wei-Li Di *et al.*, 1997) realizados em humanos, a concentração encontrada de MLT no plasma sanguíneo, após a administração oral (500µg), foi muito variável. O autor explica que esta grande variação entre os voluntários ocorreu devido a sua rápida metabolização no fígado.

Esta indolamina pode ser encontrada em diferentes tecidos, tais como: retina, glândulas Harderianas, hipotálamo, intestino e células mononucleares (Menendez-Pelaez *et al.*, 1993a). É encontrada, também, em células como macrófagos (Das, 1994) e organismos unicelulares como *Gonyaulax polyedra* (Poeggeler, 1991), o que sugere que a MLT não é produzida exclusivamente na GP e indica que esta indolamina pode estar envolvida em funções importantes ainda desconhecidas, em adição àquelas descritas em vertebrados. A presença da MLT em vários tecidos pode ser explicada por possuir uma alta lipofilicidade, o que permite sua rápida transferência do sangue para outros fluidos, como o fluido cerebrospinal (Menendez-Pelaez *et al.*; 1993b). Costa *et al.* (1995) comprovaram a forte interação da MLT com a bicamada lipídica através de um experimento simples de diálise.

Por ser um hormônio, esta indolamina possui alguns receptores específicos de membrana. Os receptores que mediam os efeitos neuroendócrinos e circadiano da MLT estão localizados na membrana externa das células de *pars tuberalis* da glândula pituitária anterior e do núcleo supraquiásmico hipotalâmico (Stankov & Reiter, 1990). Muitas das funções básicas da MLT (como regulação do ciclo circadiano) nos organismos são via interação com estes receptores (Reiter & Carneiro, 1997). Entretanto, Benitez-King &

Anton-Tay (1993) mostraram que a MLT se liga à calmodulina citosólica, molécula intracelular que media uma variedade de eventos metabólicos. Tan *et al.* (1993) mostraram que a MLT é um potente sequestrador de radicais livres, comprovando novamente a influência desta molécula sobre os eventos intracelulares das células presentes no organismo, sem o benefício de um receptor específico de membrana. Além disso, trabalhos recentes mostram que o hormônio da glândula pineal possui receptores sítio/ligantes intranucleares (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1993, Acuña-Castroviejo *et al.*, 1994); os quais possibilitam mediar as ações genômicas da indolamina (Menendez-Pelaez *et al.*, 1993a).

2. Espécies Reativas de Oxigênio em Sistemas Biológicos

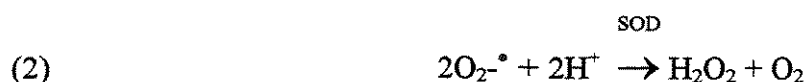
Estudos sobre a biologia do envelhecimento esclareceram a deficiência do potencial de adaptação de organismos idosos, em relação à resistência aos fatores estressantes do ambiente e da vida normal. Os fenômenos de envelhecimento caracterizaram-se, em geral, por não diferenciação e degenerações internas (Chung *et al.*, 1992). Animais e humanos idosos têm reduzida, drasticamente, a capacidade de lidar com qualquer tipo de estresse, exibindo crescente vulnerabilidade a doenças relacionadas com a idade, como problemas cardíacos e vasculares, hipertensão, doenças neurodegenerativas, diabetes e câncer (Harman, 1992).

De todas as teorias sobre os mecanismos de envelhecimento, a que mais é aceita no mundo científico atualmente é a teoria dos radicais livres (Harman, 1992). Estes radicais são átomos ou grupo de átomos que possuem, em sua última camada, um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell & Gutteridge, 1989a). A molécula de oxigênio, no seu estado fundamental, é particularmente interessante, pois já possui dois elétrons desemparelhados, cada um em um orbital π^* antiligante diferente. Assim, o oxigênio é considerado um bom agente oxidante por receber elétrons de outras moléculas redutoras em sua última camada, formando espécies reativas de oxigênio (EROs).

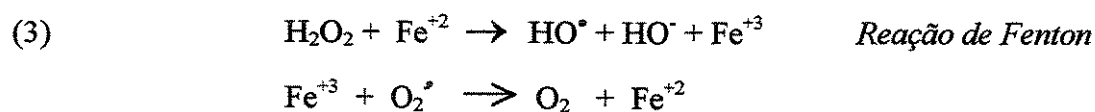
As EROs são inicialmente formadas, em sistemas biológicos, através da redução monoelétrica do oxigênio molecular para formar o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), como no esquema a seguir (1) (Gutteridge, 1994):



O radical ânion superóxido é dismutado a H_2O_2 através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) ou espontaneamente (2).



A seguir, o H_2O_2 , na presença de metais de transição, principalmente os íons Fe^{+2} ou Cu^{+1} , produz o radical hidroxila (HO^\bullet), um dos mais potentes radicais livres encontrados em sistemas biológicos (3).



O radical ânion superóxido, o H_2O_2 e o radical hidroxila não possuem as barreiras cinéticas de spin existentes no oxigênio molecular (configuração triplete), o que torna essas moléculas relativamente mais reativas (Green & Hill, 1984). Além dessas espécies existem outros oxidantes, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o óxido nítrico (NO). O $^1\text{O}_2$ é formado a partir da reação fotodinâmica do tipo II, através de um fotossensibilizador (S°), que no estado excitado cede energia para o oxigênio molecular, que passa do estado fundamental para o estado excitado singlete (Halliwell & Gutteridge, 1989b). Já o óxido nítrico é um radical livre fisiológico, sintetizado pela oxidação do aminoácido L-arginina a citrulina, pela reação da enzima óxido nítrico sintetase. A reação do NO com o radical ânion superóxido produz uma molécula fortemente oxidante e citotóxica, o ânion peroxinitrito (revisado por Bruch-Gerharz *et al.*, 1998).

A toxicidade destes radicais está relacionada com sua alta reatividade com

biomoléculas, principalmente através de reações de abstração de átomos de hidrogênio e de adição. Enquanto o radical ânion superóxido e o H_2O_2 são considerados oxidantes fracos, o radical hidroxila é um oxidante extremamente potente. Ward *et al.* (1985) sugerem que esta espécie reage com qualquer biomolécula num raio de 15 Å do seu local de formação, o que levou à preposição de que a produção de HO^\bullet seja o evento crítico da toxicidade do estresse oxidativo.

Os organismos aeróbicos estão continuamente expostos a concentrações basais de EROs, geradas como subprodutos do metabolismo aeróbico normal. As principais fontes endógenas de EROs são a mitocôndria e o retículo endoplasmático. EROs são geradas normalmente através de um desvio de elétrons da cadeia respiratória (~4–5% de todo o oxigênio consumido) e pela atividade de algumas enzimas como: xantina-oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases e a NADH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, que produz uma grande quantidade de EROs em resposta ao estímulo fagocitário (Halliwell & Gutteridge, 1989b).

Uma situação de estresse oxidativo se instala quando a produção de EROs é aumentada, ou quando os sistemas celulares de defesa anti-oxidante são exauridos. Esta situação pode ocorrer durante o metabolismo de xenobióticos, a exposição dos organismos a radiações, ou em consequências de patologias que aumentam a produção endógena de EROs. Nesse sentido, o envelhecimento celular é entendido como decorrente do aumento da produção de espécies oxidantes, principalmente pela mitocôndria, associada a uma diminuição progressiva na atividade dos sistemas de defesa/reparo (Harman, 1981).

As lesões induzidas por EROs em biomoléculas são bem numerosas. Os ácidos graxos insaturados sofrem lipoperoxidação, levando à quebra da cadeia carbônica com formação de produtos reativos, usualmente aldeídos (Halliwell & Gutteridge, 1989d). As proteínas sofrem oxidação de grupos SH, com formação de pontes S-S, e consequente agregação protéica (Gabai & Kabakov, 1994). A oxidação de outros grupos laterais de proteínas, resulta na formação de carbonilas e outras modificações de aminoácidos; o ataque da ligação peptídica leva à quebra da cadeia polipeptídica (Cao *et al.*, 1995). Os ácidos nucleicos sofrem ataques nas bases constituintes, em várias posições do anel, com formação de produtos oxidados ou sítios abásicos (revisado em Breen & Murphy, 1995) como, também,

quebras da cadeia (Hoffmann & Meneghini, 1979).

A ocorrência de uma situação de estresse oxidativo pode acarretar uma série de respostas celulares distintas. Basicamente, as respostas celulares dependem do grau do estresse oxidativo ao qual as células foram submetidas. Uma situação de estresse moderado pode alterar seletivamente alguns processos fisiológicos, que incluem a transdução de sinais e a expressão gênica (Crawford et. al., 1988). Assim, a modulação da atividade de proteínas-quinase envolvidas no controle do ciclo celular (Kass et. al., 1989) e também da velocidade de crescimento celular através da avaliação da proliferação celular (Burdon, 1995), podem estar diretamente envolvidas na sequência de eventos que levam à transformação maligna (Emerit, 1994).

Por estarem constantemente expostos à espécies oxidantes potencialmente danosas, os organismos aeróbicos desenvolveram alguns mecanismos de defesa, que incluem enzimas como a superóxido dismutase (2), a catalase (CAT) (4), o complexo glutationa peroxidase/glutationa redutase (GSH-Px/GSH-Rd) (5) (6).



A glutationa reduzida (GSH) é mantida nos níveis fisiológicos pela sua síntese via glutationa sintetase e pela redução da glutationa oxidada (GSSG) através da glutationa redutase que utiliza NADPH como redutor (6) (Halliwell & Gutteridge, 1989c).

Em adição aos sistemas enzimáticos, algumas pequenas moléculas orgânicas colaboram também na desintoxicação de espécies oxidantes, como o ácido ascórbico, o α -tocoferol e a glutationa reduzida.

3. Melatonina como Antioxidante

Em todos os animais jovens e adultos, incluindo os humanos, o ritmo circadiano de dia-e-noite altera os valores de MLT na glândula pineal, com um pico máximo à noite. Entretanto, durante o envelhecimento a produção deste hormônio diminui, passando de 80 pg/ml, aos 21 anos, para 30 pg/ml, aos 82 anos (Reiter, 1995). Esta redução da MLT é uma consequência do decréscimo do número de receptores β -adrenérgicos na membrana dos pinealócitos (Henden *et al.*, 1992), e possivelmente também pela destruição dos neurônios no núcleo supraquiasmico hipotalâmico pelo glutamato (Poeggeler *et al.*, 1993).

Uma ligação entre a MLT e a longevidade tem sido proposta através de vários trabalhos, e os efeitos benéficos desta indolamina são responsáveis por esta aparente habilidade em prolongar a vida. A ação antioxidante da MLT (mostrada primeiramente por Tan *et al.*, 1993) e seu papel nos ciclos de reprodução e ritmo circadiano, levaram Lesnikov & Pierpaoli (1994) a questionar sua possível ação no retardamento do envelhecimento. Verificaram esta influência através de experimentos de transplantes cruzados da glândula pineal entre os ratos jovens e velhos. Observaram que os ratos velhos com glândulas dos ratos jovens viveram duas vezes mais que os ratos jovens com glândulas dos ratos velhos. Este trabalho deu origem a outras investigações na comprovação da capacidade da MLT como sequestrador de radicais livres.

Numerosos trabalhos científicos mostram que o tratamento com antioxidantes previne a ocorrência de diversas patologias associadas ao envelhecimento e aumenta a expectativa de vida de diversas espécies (Cutler, 1991; Slater & Block, 1991).

Pesquisas recentes enfatizam que, além da função hormonal, a MLT desempenha um papel vital na regulação de processos de transferência de elétrons, e desintoxificação de intermediários reativos do oxigênio, bem como no controle dos fenômenos decorrentes da ação desses radicais (Pieri *et al.*, 1994; Poeggeler *et al.*, 1994; revisado por Reiter, 1995). As primeiras evidências da ação antioxidante da MLT, em sistema livre de células, foram observadas por de Tan *et al.* (1993).

Ainda não se sabe ao certo o mecanismo de sequestro de radicais livres pela MLT. Poeggeler *et al.* (1994) sugerem que a amina indólica participa do mecanismo de

“scavenger” formando um radical cátion indólico intermediário, que sequestra o radical ânion superóxido, formando por fim N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (figura 4). Entretanto, Tan *et al.* (1993) observaram que a maior habilidade de sequestrar radicais está relacionada com a presença dos grupos metoxi e acetil na molécula.

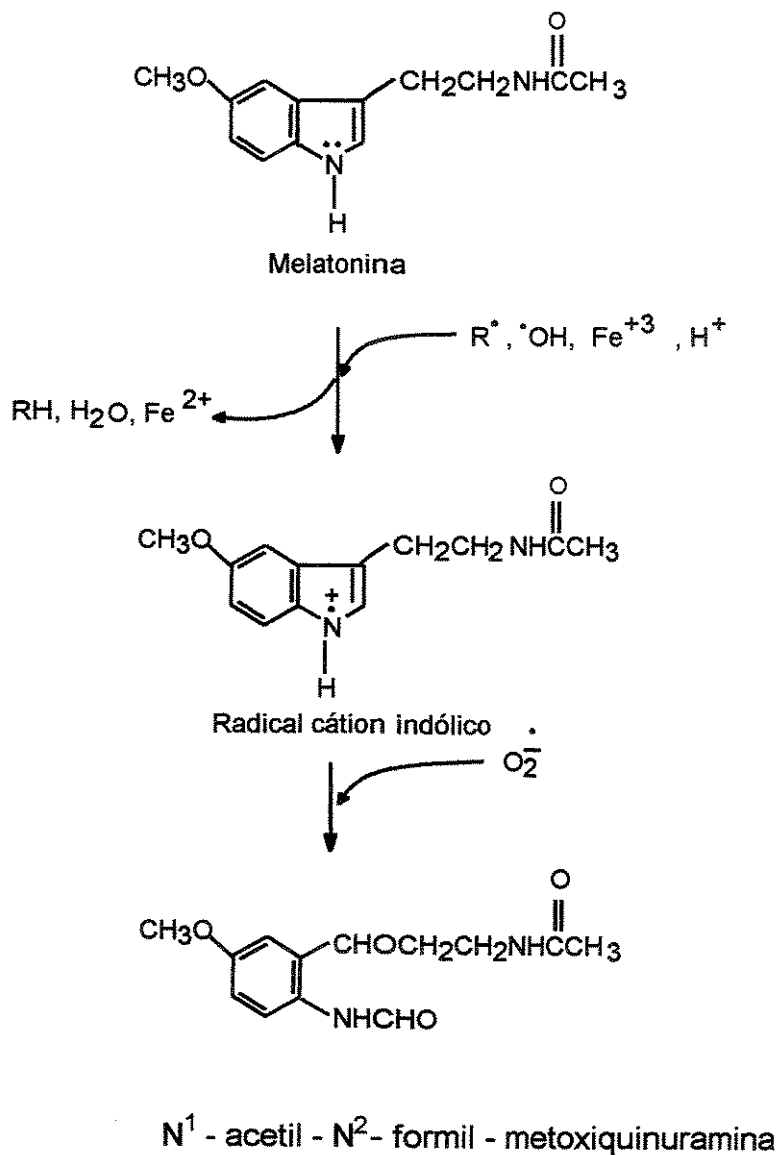


Figura 4. Mecanismo de sequestro de radicais livres pela melatonina

Paralelamente, outros pesquisadores (Pieri *et al.*, 1994; Melchiorri *et al.*, 1995) estudaram a atividade antioxidante da MLT *in vitro* em sequestrar radicais hidroxilas, comparando sua ação com outros antioxidantes conhecidos, como glutathiona reduzida, vitamina C, vitamina E e o manitol. Pieri *et al.* (1994) verificaram que a MLT foi duas vezes mais eficaz que a glutathiona reduzida como scavenger de radical peroxila, e 1,12 vezes mais efetiva que vitamina E, em sistema livre de células.

Como um derivado do triptofano, a MLT apresenta em sua estrutura grupos lipofílicos que facilitam sua difusão pela membrana celular, permitindo sua ação antioxidante no interior das células (Costa *et al.*, 1995). Estudos recentes mostraram que esta indolamina protege as células contra ataques de outras espécies reativas de oxigênio, como o ânion peroxinitrito (formado a partir do NO e O₂⁻) e o oxigênio singlete (Gilad *et al.*, 1997; Cagnoli *et al.*, 1995).

Tan *et al.* (1994) mostraram o efeito da MLT na redução da genotoxicidade causada por carcinógenos conhecidos, como o safrol. Esta molécula induz a formação de radicais livres no núcleo celular, produzindo adutos de DNA. Em ratos tratados com 0,6 mg/Kg de MLT por 8 hs, após a pinealectomia, foi observado uma alta inibição na formação de adutos de DNA em células hepáticas.

Além de proteger as células contra os ataques diretos dos radicais livres, a MLT estimula a atividade da enzima glutathiona peroxidase (Pablos *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1996). O mecanismo deste estímulo ainda é desconhecido. Entretanto, Pablos *et al.* (1995) sugerem que a MLT pode estimular a atividade desta enzima via uma ação genômica. A atividade da glutathiona peroxidase é um dos principais mecanismos de defesa das células contra o H₂O₂, em condições fisiológicas, pois reduz o peróxido produzido durante a respiração celular a água (Halliwell & Gutteridge, 1989c). Desta forma, a enzima além de eliminar os peróxidos orgânicos, ela evita a formação de um dos mais tóxicos radicais livres: o radical hidroxila (7).



Até pouco tempo atrás, a MLT era utilizada pela população principalmente com a

finalidade de regular o sono e aliviar os sintomas do *jet lag*. Entretanto, hoje ela tem sido recomendada para outras aplicações, como na potencialização do sistema imunológico (Jankovic *et al.*, 1994), podendo auxiliar no combate contra a AIDS (Reiter & Robinson, 1996), na redução da proliferação de células tumorais (Sze *et al.*, 1993), sendo coadjuvante no tratamento quimioterápico de tumores. Em vista da sua atuação no sequestro de radicais livres (Tan *et al.*, 1993), passou a ser, também, utilizada como uma terapia preventiva visando o retardamento do envelhecimento.

Nos Estados Unidos, as empresas estão aderindo cada vez mais à comercialização deste hormônio como suplemento alimentar (como a vitamina E, vitamina C, Ginkgo Biloba, e outros). Já na Europa, ela é considerada apenas como um neurohormônio, que não pode ser comercializado livremente (Guardiola-Lemaitre, 1997). Entretanto, no Brasil, o Ministério da Saúde ainda não aprovou sua comercialização no país. Apesar do crescente interesse, as informações sobre a maioria dos "talentos" da MLT não são ainda bem conhecidas na área médica, pois muitas pesquisas sobre suas funções e características são extremamente recentes. Na verdade, parte da pesquisa ainda se encontra num nível básico, o que significa realização de testes *in vitro* e em animais, e poucos em seres humanos. Guardiola-Lemaitre (1997) comenta que a administração de altas doses de MLT em humanos ou em animais pode levar a concentrações supra-fisiológicas do hormônio, podendo dessensibilizar os receptores de membrana MLT, além de induzir o aumento da concentração de seus metabólitos, levando a efeitos deletéricos por si só. De fato, análises do conhecimento do perfil farmacológico da MLT e seus metabólitos, baseados em estudos pré-clínicos científicos, constituem uma base para prevenção das reações adversas e seus efeitos.

Ainda resta muito a conhecer acerca da toxicidade da MLT, inclusive sobre dosagens para cada caso e sobre sua indicação ou contra-indicação para grupos de indivíduos específicos (gestantes, crianças, adolescentes, idosos). A concentração de MLT varia consideravelmente ao longo da vida (Humbert & Pevet, 1994). Os bebês produzem quantidades cada vez maiores de MLT até cerca de um ano de idade. A partir daí, os níveis noturnos de MLT permanecem estáveis a proximidade da puberdade, quando esses níveis diminuem de forma acentuada, numa tendência que se mantém pelos próximos anos. A MLT

continua a cair na meia idade, e na terceira idade os idosos produzem quantidades irrisórias de MLT.

No Instituto Nacional de Cardiologia, em Bethesda, Maryland, a MLT foi submetida a um teste padronizado de toxicidade em roedores, conhecido como LD₅₀, o que equivale à dose letal para a metade da população (Barchas *et al.*, 1967). Entretanto, não foi possível determinar o LD₅₀ para a MLT, pois a administração de até 800 mg/Kg em camundongos não foi suficiente para causar morte de metade da população testada. A restrita solubilidade do hormônio em água não permitiu administrar concentrações maiores. Em humanos, a MLT está sendo testada como pílula anticoncepcional e no tratamento da menopausa, em concentrações muito elevadas (75 mg por comprimido), sobre os quais os autores não tem relatos de efeitos de toxicidade (Cohen *et al.*, 1995).

O crescente interesse pela utilização prática da MLT e a escassez de informações sobre suas atividades tóxicas e seu potencial de risco genético, despertaram nosso interesse em contribuir para os estudos nessa área. Assim, esse trabalho foi realizado com o intuito de investigar a ação antioxidante, paralelamente à ação citotóxica e genotóxica da MLT.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi realizar estudos *in vitro* sobre a atividade antioxidante, antimutagênica e potencial de risco da MLT. Para isso, os seguintes passos foram realizados:

1. Desenvolver um método de solubilização da MLT, visando sua utilização em sistemas biológicos em concentrações farmacológicas.
2. Analisar a ação genotóxica da MLT pela determinação de sua atividade mutagênica em três cepas distintas de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA100 e TA102), utilizando o teste de Ames, na presença e na ausência do sistema de ativação metabólica de fígado de ratos.
3. Avaliar a ação anti-mutagênica da MLT pela medida da sua capacidade de proteger as células de *Salmonella typhimurium* (cepa TA102), particularmente sensível ao estresse oxidativo, da ação mutagênica do H_2O_2 .
4. Investigar a ação citotóxica da MLT em células de mamífero (fibroblastos de pulmão de hamster chinês, linhagem V79), pela análise de seus efeitos sobre a proliferação e a viabilidade celular.
5. Analisar a atividade antioxidante da MLT em diferentes sistemas:
 - a) sistema livre de células;
 - b) fibroblastos V79 expostos ao hidroperóxido de cumeno e ao H_2O_2 ;
 - c) eritrócitos humanos expostos ao H_2O_2 .

MATERIAIS E

MÉTODOS

1. REAGENTES E SOLUÇÕES

1.1. REAGENTES

Foram obtidos da Sigma Chemical Co. os seguintes reagentes: dodecil sulfato de sódio (SDS); peroxidase de raiz forte (HRP); etileno diamino tetra-acetato dissódico (EDTA); desoxirribose; ampicilina; tetraciclina; óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO); azida sódica (Az); aflotoxina B₁ (AFB₁), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT).

Os seguintes reagentes foram obtidos das seguintes firmas: meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) da ICN Flow Biomedicals Inc., soro fetal bovino (SFB) da Cultilab, solução de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg) da Laborclin, Bacto Nutrient Broth e Tripsina (1:250) do Laboratório Difco Ltda., tiourea da Backer Analyzer Reagente, melatonina (MLT) da Merck S.A. Inds. Químicas.

Todos os outros reagentes foram obtidos de fontes comerciais, e possuem grau de pureza analítico.

Todas as placas e garrafas utilizadas neste trabalho foram obtidas da Corning, New York, USA.

1.2. SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

As soluções utilizadas em cultura de células foram esterilizadas ou em autoclave (120°C, 1 Kgf/cm², durante 20 minutos) ou por filtração em um sistema Millipore® (diâmetro de poro de 0,22 µm) e estocadas em geladeira.

1.2.1. Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

A mistura comercial (13,4g de pó) foi dissolvida em água desionizada para um litro de solução, à qual foram adicionados 14,3 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 100 U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. O meio teve seu pH ajustado para 7,4. Antes da utilização foi acrescido de 10% (v/v) de SFB e a esterilidade do lote testada por 48 hs a

37°C.

1.2.2. Tampão Salina Fosfato (PBS)

Esta solução tampão contém os sais cloreto de sódio (NaCl) a 137 mM, cloreto de potássio (KCl) a 26,8 mM, fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) a 8,1 mM e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) a 1,47 mM em água desionizada. O pH do tampão foi ajustado para 7,2 - 7,4.

1.2.3. Solução de Tripsina

A solução de Tripsina foi preparada pela dissolução da massa apropriada em PBS, numa concentração de 0,1% (m/v), contendo 1 mM de EDTA. Após o preparo, a solução foi esterilizada por filtração em um sistema Millipore® e estocada em freezer até o momento da utilização.

1.2.4. Solução de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A solução de H₂O₂ foi preparada por diluições sucessivas da solução comercial a 30% em tampão PBS e estocada em geladeira. Antes da utilização, a concentração real do estoque foi determinada segundo o método de Cotton & Dunford (1973), através de sua reação com iodeto de potássio (KI) catalisada por HRP. A formação de iodo molecular foi seguida espectroscopicamente a 353 nm, utilizando-se um ϵ de $2,55 \times 10^{-4} \times M^{-1} \times cm^{-1}$.

1.2.5. Solução Estoque de Melatonina (MLT)

Uma solução estoque de 5 mM de MLT foi preparada em PBS ou em DMEM, através de sonicação durante 40 minutos e, depois, aquecimento a 42°C por 30 minutos. A solução foi, então, estocada a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante uma semana.

1.2.6. Ágar de Superfície

Esta solução de ágar foi preparada no momento do uso pela solubilização de 0,75% de NaCl, 50 μ M de histidina e 50 μ M de biotina e dispersão de 0,9% de ágar, em água desionizada. O pH foi ajustado para 7,4 e a solução mantida a 45°C.

1.2.7. Meio Mínimo Seletivo

A mistura comercial Vogel-Bonne E medium foi dissolvida em um litro de água desionizada, já contendo 1,5% de ágar e 2% de glicose.

1.2.8. Meio Nutriente

Foram dispersos em água desionizada 0,8% de Bacto Nutrient Broth e 0,5% de NaCl.

1.2.9. Gelose

Foram dispersos em água desionizada 0,6% de ágar e 2,5% de meio nutriente.

1.2.10. Meio Rico

Foram dispersos em água desionizada 0,8% de Bacto Nutrient Broth; 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar.

1.2.11. Reagente de Drabklin

Este reagente foi preparado pela adição de 100 mg de cianeto de potássio (KCN) e 300 mg de ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) em um litro de água desionizada.

2. MÉTODOS

2.1. MELATONINA: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES

A estabilidade da MLT foi caracterizada através de suas propriedades físico-químicas como: ponto de fusão, cromatografia delgada, absorção na região do Ultra Violeta (UV) e no Infra Vermelho (IV).

2.1.1. Ponto de Fusão:

O ponto de fusão da MLT foi medido através do aparelho para ponto de fusão da

Reichert Austria, o qual é munido de uma chapa de aquecimento e microscópio óptico. Cristais de MLT foram colocados sobre a lâmina de vidro e aquecidos, lentamente, em chapa de aquecimento. A fusão dos cristais foi observada através do microscópio óptico e a temperatura de fusão anotada.

2.1.2. Cromatografia de Camada Delgada

Este método (Collins *et al.*, 1997) foi utilizado para avaliar a pureza da indolamina obtida após o processo de sonicação e estocagem da solução aquosa (processo descrito no tópico 1.2.5.). Uma solução a 0,1 mM de MLT foi dissolvida em água desionizada, sob agitação, por 30 min. Após este período, a solução foi separada em duas partes; onde uma delas foi submetida ao método de solubilização descrito no tópico 1.2.5 (solução sonicada) e a outra parte foi deixada em repouso a temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 10 dias (solução não sonicada). Outra solução aquosa de MLT a 0,1 mM foi feita no momento da aplicação (solução padrão).

As três soluções foram aplicadas, uma ao lado da outra, em placas de sílica (6 x 14 cm) da Merck (1.05554, DC. Alufolien, Kiesigel GOF 254) com auxílio de tubo capilar. A placa de sílica foi imersa na fase móvel de clorofórmio/metanol a 7% e deixada correr por 30 min. Após a secagem da placa ao ar, o ponto de migração foi determinado com auxílio de luz Ultra Violeta curta (254 nm; lâmpada EYE G4t5) e/ou exposição ao Iodo.

2.1.3. Absorção na Região do Ultra Violeta

Espectros de absorção óptica das soluções aquosas de MLT a 0,01 mM, uma sonicada e a outra não, foram registrados no espectrofotômetro UV-Visível SyncMaster 3, modelo Metrolab 1700, à temperatura ambiente, em células de quartzo de 1 cm de caminho óptico, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 300 nm. As duas soluções foram mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 10 dias. Após este período, novos espectros de absorção foram registrados. Os procedimentos para realizar este método foram elaborados de acordo com Silverstein *et al.* (1979a).

2.1.4. Absorção na Região do Infra Vermelho

Os espectros dos cristais de MLT obtidos das soluções do hormônio (sonicado e a outra não), após 10 dias da solubilização, foram registrados na região do Infra Vermelho (IV) através do espectrofotômetro FT - IR spectrum 1000 da Perkim Elmer, à temperatura ambiente, em pastilhas de brometo de potássio (KBr), na faixa de comprimento de onda entre 4400 e 450 cm^{-1} . Os procedimentos para realizar este método foram elaborados de acordo com Silverstein *et al.* (1979b).

2.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E ANTI-MUTAGÊNICA DA MELATONINA

A fim de determinar a atividade mutagênica da MLT foram utilizadas três linhagens de *Salmonella typhimurium*: TA97, TA100 e TA102; de acordo com o procedimento descrito por Marion & Ames (1983). Para a atividade anti-mutagênica, foi utilizada a cepa TA102. As linhagens foram obtidas do Dr. B. M. Ames, Universidade da Califórnia, Berkeley, CA (USA). Os experimentos foram realizados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), coordenado pelo Dr. João Antônio P. Henriques.

2.2.1. Cultura de Bactérias

As linhagens TA97 e TA100 foram cultivadas em meio nutriente, contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina por 10 hs, sob oxigenação a 37°C. Seguiu-se o mesmo procedimento para linhagem TA102, acrescentando 12 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina.

2.2.2. Preparação do Sistema de Ativação Metabólica S9 mix

O sistema de ativação metabólica, designado S9 mix, é formado por enzimas microssomais de fígado de rato, constituintes do complexo P450, suplementado com cofatores requeridos para suas atividades. A fração microssomal utilizada foi a preparação comercial S9 da MOLTOX, obtida de fígado de ratos tratados com o indutor aroclor 1254. O S9 mix foi preparado por adição da fração S9 (2g, contendo 16,3 mg de proteína) à uma solução constituída por 25 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4; 1 ml de solução salina

contendo 1,65 M de KCl; 0,4 M de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,25 ml de glicose-6-fosfato 1 M; 2 ml de NADP 0,1 M e 19,75 ml de água desionizada. O volume total da solução foi de 50 ml, sendo utilizado em condições estéreis e no momento da realização do ensaio.

2.2.3. Avaliação da Atividade Mutagênica da Melatonina

Uma suspensão celular ($\sim 10^7$ células/ml) foi incubada na presença ou ausência de ativação metabólica (500 μ l da fração S9 mix/ml), com diferentes concentrações de MLT, durante 30 min a 37°C. Na ausência da fração S9 o controle positivo foi 0,5 μ g/placa de 4-NQO para as linhagens TA97 e TA102, e 10 μ g/placa de Az para a TA100. Na presença da fração S9 o controle positivo foi 0,5 μ g/placa de aflotoxina B₁ (AFB₁) para todas as linhagens. Para todos os ensaios o controle negativo utilizado foi tampão fosfato. O volume final dos ensaios foi de 1 ml. Os ensaios foram pré-incubados por 30 min a 37°C.

Após o período de pré-incubação, um volume de 2 ml de ágar de superfície a 45°C foi adicionado a cada tubo teste. O conteúdo do tubo teste foi semeado em placa de Petri contendo 30 ml de meio mínimo seletivo. As colônias revertentes de histidina (His⁺) foram contadas após incubação a 37°C durante 48 hs. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Para cada experimento foi realizado uma curva de sobrevivência. O mesmo procedimento descrito anteriormente foi seguido. Após o período de incubação, o conteúdo de cada tubo foi diluído em tampão fosfato até obter uma concentração de bactérias da ordem de 50 células/placa. Um volume de 1 ml de Gelose foi adicionado a cada tubo teste. O conteúdo do tubo teste foi semeado em placa de Petri contendo ~ 3 ml de meio rico. As colônias foram contadas após incubação a 37°C durante 48 hs. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

2.2.4. Avaliação da Atividade Anti-Mutagênica da Melatonina

Para avaliar a atividade anti-mutagênica da MLT o mesmo procedimento descrito anteriormente foi seguido. As células de *Salmonella typhimurium* ($\sim 10^7$ células/ml), cepa TA102, foram incubadas com MLT na presença de 0,5 mM de H₂O₂, durante 30 min a 37°C. Depois disto, 2 ml de ágar aquecido foi adicionado em cada tubo teste e a mistura foi

transferida para placas contendo 30 ml de meio mínimo seletivo para histidina (His⁺). Colônias revertentes foram contadas depois de 48 hs de incubação a 37°C. A atividade mutagênica foi expressa em índice de mutação (IM), como a frequência de revertentes de His⁺ em relação à placa controle.

2.3. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

2.3.1. Manutenção das Culturas de Células

Fibroblastos de pulmão de hamster chinês da linhagem V79, um clone M8 generosamente cedido pelo Dr. R. Meneghini, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil), foram cultivados aderidos em garrafas de cultura, em DMEM contendo 10% de SFB.

As operações de subcultivo foram feitas removendo-se as células do substrato sólido, pela adição de solução de Tripsina, seguida da inativação da atividade proteolítica pela adição de DMEM + 10% SFB, e transferência de alíquotas para novas garrafas ou placas de cultivo na densidade desejada.

As culturas foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, no escuro.

2.3.2. Efeito da Melatonina sobre a Proliferação Celular

A taxa de proliferação celular foi medida como o aumento da população de células em um período de 24 hs, subsequente ao tratamento com MLT, durante a fase exponencial de crescimento, de acordo com Souza-Pinto (1996).

As células foram cultivadas em placas contendo 24 poços, a uma densidade inicial de 3×10^4 células/poço, em meio DMEM mais 10% SFB, em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após 48 hs de incubação, as células foram expostas a diferentes concentrações de MLT ou 1-heptanol (controle positivo) em PBS por um período de 30 min a 37°C (curta exposição). Depois do tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas em meio fresco por mais 24 hs. Alternativamente, as células foram expostas a concentrações crescentes da indolamina ou do 1-Heptanol por um período de 24 hs (exposição prolongada)

a 37°C, em meio DMEM mais 10% SFB.

No final do período de crescimento, as células foram fixadas com 1 ml de TCA a 5% e lisadas com 1 ml de NaOH 0,5 M por poço. A população celular foi determinada pela medida da absorvância do lisado a 260 nm, um parâmetro diretamente relacionado ao número de células. A proliferação relativa foi expressa em porcentagem, referente ao aumento da população durante o período de crescimento, em relação ao controle (células não tratadas).

2.3.3. Efeito da Melatonina sobre a Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada através da redução do sal de tetrazolium (MTT) a formazan azul pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, segundo Mosmann (1983).

Fibroblastos V79 foram semeados a uma densidade 10^4 células/poço, em placas de 48 poços, e cultivadas por um período de 72 hs. Foram, então, expostas a diferentes concentrações de MLT em meio DMEM sem SFB por 2 hs a 37°C. O MTT foi adicionado em cada poço, a uma concentração de 1 mg/ml em meio DMEM sem SFB, e as células incubadas por 1 h a 37°C. O MTT reduzido (um pigmento insolúvel) foi extraído pela adição de 0,5 ml de HCl concentrado/isopropanol (1:300) sob agitação leve por 17 min. Ao final da extração, foi determinada a absorvância dos diferentes extratos a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de redução do MTT em relação ao ensaio controle (células não tratadas).

2.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MELATONINA

2.4.1. Efeito da Melatonina sobre a Degradação Oxidativa da Desoxirribose

A degradação oxidativa da desoxirribose foi induzida pelo sistema pró-oxidante, constituído por H₂O₂ e um quelato de ferro (III) e nitrilo triacetato (NTA). A degradação foi avaliada através da quantificação espectrofotométrica de adutos coloridos formados a partir da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com produtos desta degradação (Halliwell e Gutteridge, 1981).

O quelato foi previamente preparado pela adição de 100 μM de NTA e 25 μM de FeCl_3 e incubação por 10 min à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 10 mM de tampão fosfato (pH 7,4), 2,8 mM de desoxirribose e concentrações crescentes do antioxidante a ser analisado (MLT, glutationa, trolox ou manitol). Por último, foi adicionado 1,4 mM de H_2O_2 (previamente dosado pelo método descrito no item 1.2.4) e os ensaios foram incubados por 20 minutos a 37°C. O volume final de reação foi de 1,2 ml.

Ao final da incubação, foram adicionados 1 ml da solução de TBA a 1% e 1 ml da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 2,8%, e o meio reagente incubado a 100°C por 15 min. Após este período, a reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo. O conteúdo de cada tubo foi analisado, a temperatura ambiente, por espectroscopia a 532 nm.

2.4.2. Efeito da Melatonina sobre a Inibição da Proliferação Celular

As células foram cultivadas em placas contendo 24 poços, a uma densidade inicial de 3×10^4 células/poço, em meio DMEM mais 10% SFB, em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 . Após 48 hs de incubação, as células foram expostas às amostras testes em PBS, por um período de 30 min a 37°C. Depois do tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas em meio fresco por mais 24 hs. No final do período de crescimento, as células foram fixadas, lisadas e a população celular determinada pela medida da absorbância do lisado a 260 nm, segundo item 2.3.2.

Para se avaliar o efeito da MLT sobre a inibição da proliferação celular, os fibroblastos foram pré-incubados por 10 min com diferentes concentrações do hormônio ou tiourea 10 mM (antioxidante padrão) em PBS e, então, tratadas com 50 μM de H_2O_2 , por 30 min a 37°C. Após o tratamento, as células foram processadas como descrito acima.

A concentração de H_2O_2 foi escolhida com base em uma curva dose-resposta, como a concentração que inibiu cerca de 60% a proliferação celular.

2.4.3. Efeito da Melatonina sobre a Inibição da Viabilidade Celular

Fibroblastos V79 foram semeados numa densidade 10^4 células/poço, em placas de 48 poços e cultivados por um período de 72 hs. Foram, então, expostos às amostras em meio DMEM sem SFB por 2 hs a 37°C. O MTT foi adicionado em cada poço, a uma

concentração de 1 mg/ml em meio DMEM sem SFB, e as células incubadas por 1 h a 37°C. O MTT reduzido foi analisado segundo item 2.3.3.

Para se avaliar o efeito da MLT sobre a inibição da viabilidade celular, as células foram pré-incubadas por 10 min com concentrações crescentes de MLT ou tiourea a 10 mM e, então, tratadas com um sistema oxidante (2,5 mM de hidroperóxido de cumeno, HPC, ou 2,5 mM de H₂O₂) em meio DMEM sem SFB, por 2 hs a 37°C. Após o tratamento, as células foram processadas como descrito acima.

As concentrações dos oxidantes foram escolhidas com base em curvas dose-resposta, como a concentração que reduziu a viabilidade celular para valores entre 35 e 45%.

2.4.4. Efeito da Melatonina sobre a Inibição da Peroxidação Lipídica em Eritrócitos

A peroxidação lipídica foi determinada através da reação do TBA com os produtos da degradação oxidativa dos lipídios da membrana celular, induzida por H₂O₂, segundo Pereira *et al.*(1998), submetido a publicação.

Amostras de sangue humano (contendo o anticoagulante EDTA) foram obtidas do banco de sangue do Hospital de Clínicas/UNICAMP e utilizadas dentro de 24 hs. As amostras foram centrifugadas por 10 min à 3500 rpm e 4°C para separação do plasma que foi descartado. As células foram lavadas por 3 vezes com o triplo do seu volume em PBS, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Após a lavagem, a papa de hemáceas foi suspensa em igual volume de PBS e mantida em gelo. A concentração de hemoglobina (Hb) na suspensão foi realizada através do método de Drabkin (Winterbourn, 1990), pela quantificação do produto de reação entre a Hb e o reagente de Drabkin (cianometahemoglobina) a 540 nm.

Os ensaios foram realizados em PBS com uma concentração de 0,5 mM de Hb, na presença de 2 mM de Az para inibição da catalase dos eritrócitos. As hemáceas foram pré-incubadas com diferentes concentrações de MLT ou tiourea a 10 mM por 10 min e, então, tratadas com H₂O₂ a 5mM, por 30 min a 37°C. A reação foi paralisada pela adição de 0,5 ml de TCA a 25%. Os precipitados foram centrifugados a 3.500 rpm, a 4°C por 15 min, e 1 ml do sobrenadante foi adicionado a 1 ml de TBA a 1% e a mistura aquecida a 100°C por 15 min. A reação foi interrompida em banho de gelo. O produto da peroxidação lipídica foi

analisado, à temperatura ambiente, pela medida da absorbância a 532 nm ($\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os resultados obtidos foram expressos em nmoles de malondialdeído por grama de hemoglobina (nmoles MDA/g Hb). Curvas dose-resposta para o H_2O_2 (1 - 10 mM) foram previamente determinadas com amostras de diferentes indivíduos.



RESULTADOS

1. MELATONINA: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES

A baixa solubilidade da MLT em água tem limitado sua utilização em sistemas biológicos. Geralmente, ela é utilizada nestes sistemas solubilizada em solventes como etanol ou dimetil sulfóxido (DMSO), os quais também possuem ação antioxidante. Para evitar a interferência dos solventes nos estudos, os pesquisadores utilizam concentrações de etanol e DMSO por volta de 1%, o que, muitas vezes, pode limitar a concentração de uso da MLT nos ensaios.

Neste trabalho, procurou-se contornar este problema dissolvendo a MLT em água através de sonicação. Com a utilização deste processo foi possível realizar ensaios com concentrações da indolamina até 5 mM. Para avaliar se o processo de solubilização e de estocagem modificariam a estrutura do hormônio, foram realizados estudos sobre sua estabilidade por cromatografia de camada delgada, absorção na região do UV e no IV.

Primeiramente, a MLT foi caracterizada através de seu ponto de fusão, cujo valor foi de 117°C, semelhante ao valor obtido em literatura (entre 116 e 118°C; The Merck Index, 1983). O estudo da estabilidade MLT foi iniciado por cromatografia delgada. Esta técnica possibilitou observar se havia decomposição da molécula, em comparação com o padrão (solução do composto não sonicada, logo após a solubilização), pelos valores de seus Rfs (razão entre o caminho percorrido pela amostra e o caminho percorrido pela fase móvel).

Obteve-se apenas uma única mancha na placa de sílica para cada aplicação de solução sonicada, solução não sonicada e solução padrão (ver item 2.1.2 de materiais e métodos). Seus Rfs foram, respectivamente: 0,84, 0,85 e 0,83. Estes resultados indicam que cada amostra era constituída pela mesma substância pura.

A seguir, as amostras foram analisadas por espectroscopia na região do ultra violeta. A figura 5 mostra o espectro de absorção óptica de duas soluções aquosas de MLT a 0,05 mM, uma sonicada e a outra não, logo após a solubilização. Os espectros apresentam dois picos característicos: um máximo a 223 nm, e outro de menor intensidade a 278 nm (ϵ 27550 e 6300, respectivamente; de acordo com The Merck index, 1983). O valor de absorbância para a solução sonicada a 223 nm ($A = 0,917$) foi ligeiramente maior que o da solução não sonicada ($A = 0,817$). Após 10 dias de solubilização o valor de absorbância a 223 nm para a

solução sonicada foi de 0,915, e para a não sonicada foi de 0,815 (figura 6). Estes resultados indicam que houve um aumento na concentração da MLT em solução, após a sonicação (tabela 1). Mostram, também que ela permanece estável nas condições de solubilização e estocagem.

Tabela 1. Concentrações (mM) da melatonina, em soluções sonicadas e não sonicadas, antes e após estocagem.

Solução	Logo após a solubilização		Após 10 dias de estocagem	
	Não sonicada	Sonicada	Não sonicada	Sonicada
Melatonina (mM)	0,03	0,033	0,03	0,033

Para caracterizar os grupos funcionais da molécula presente nas amostras, e identificá-la definitivamente, foram realizados estudos espectroscópicos na região do infra vermelho. A figura 7 mostra os espectros dos cristais obtidos da solução sonicada e não sonicada da MLT, na região do infra vermelho (conforme descrito em materiais e métodos, item 2.1.4). Pela figura, verificou-se que os espectros das duas soluções são idênticos entre si, com os mesmos picos de absorção nos comprimentos de onda característicos para cada estiramento. De acordo com a tabela 2, as bandas de absorção obtidas experimentalmente foram características para cada grupo funcional da molécula da MLT, em comparação com as bandas de absorção teórica. Estes resultados mostram que a substância presente nas duas amostras é a molécula de MLT, e que ela não foi modificada estruturalmente após o processo de solubilização e estocagem.

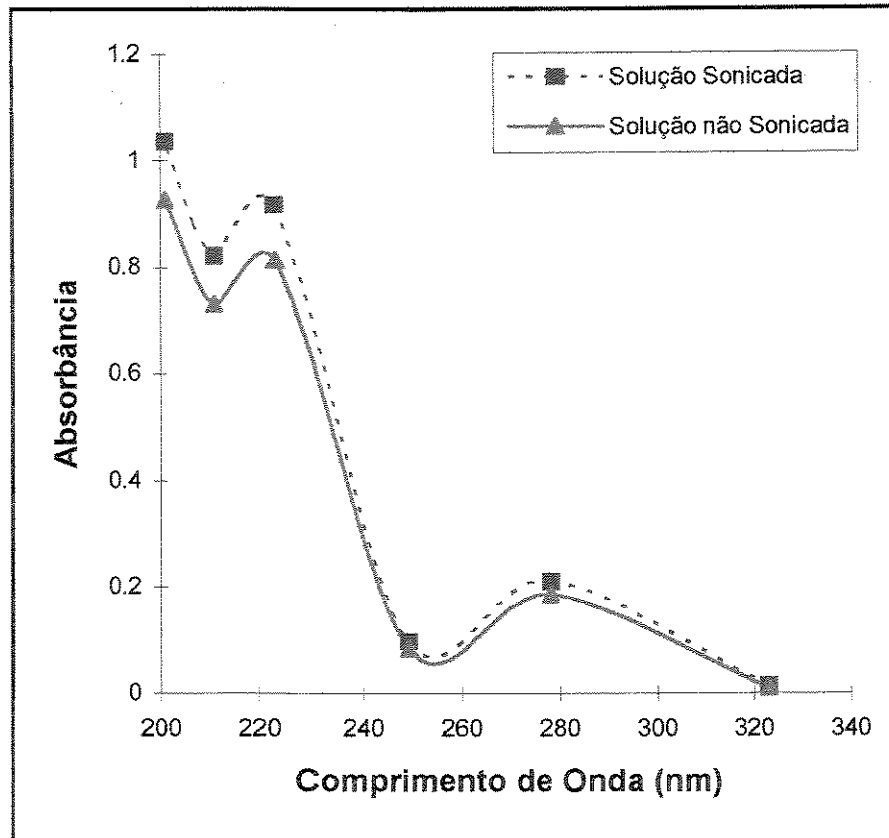


Figura 5. Espectro UV da melatonina em solução aquosa. Espectros de absorção óptica das soluções aquosas de MLT 0,05 mM, uma sonicada e a outra não, foram registrados logo após a solubilização, no espectrofotômetro UV-Visível SyncMaster 3, modelo Metrolab 1700, à temperatura ambiente, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 300 nm.

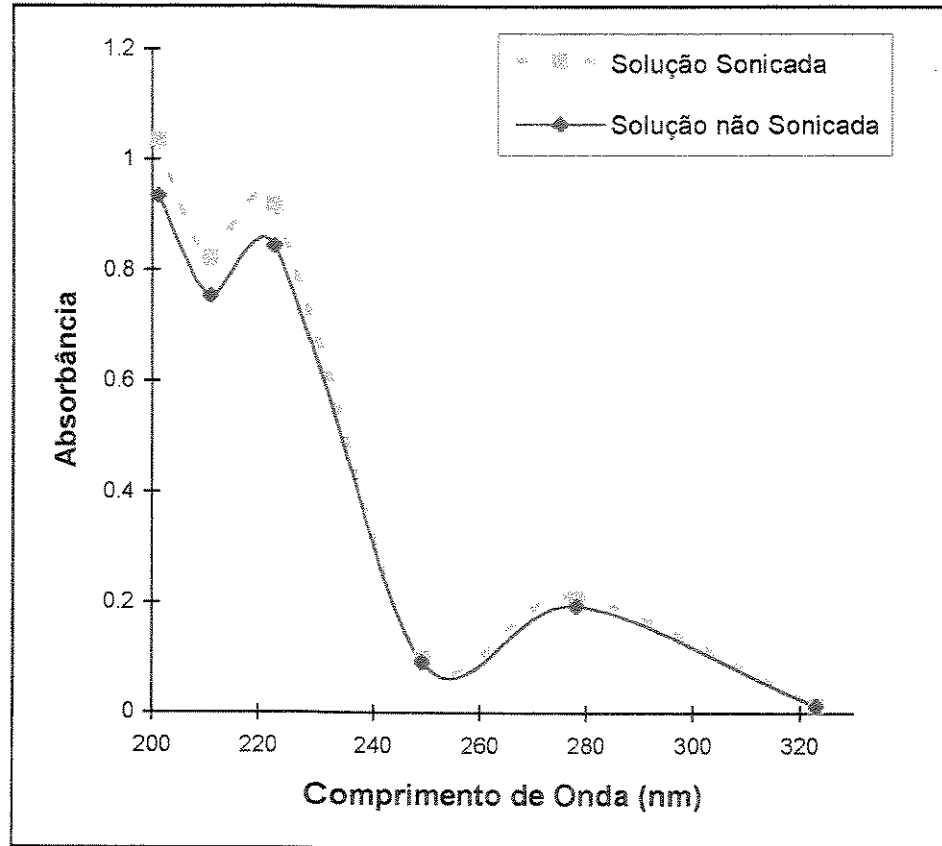


Figura 6. Espectro UV da melatonina em solução aquosa após estocagem. Espectros de absorção óptica das soluções aquosas de MLT 0,05 mM, uma sonicada e a outra não, foram registrados no espectrofotômetro UV-Visível SyncMaster 3, modelo Metrolab 1700, após 10 dias de solubilização, à temperatura ambiente, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 300 nm.

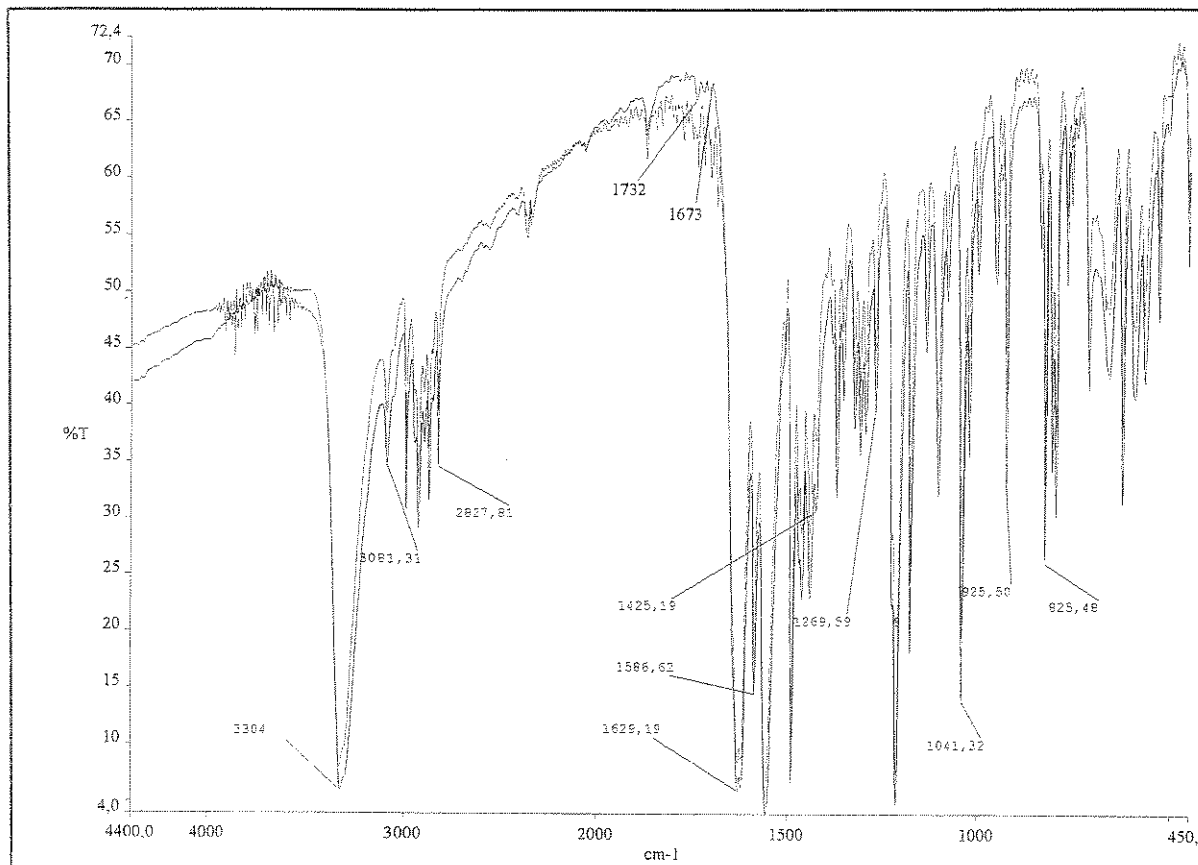
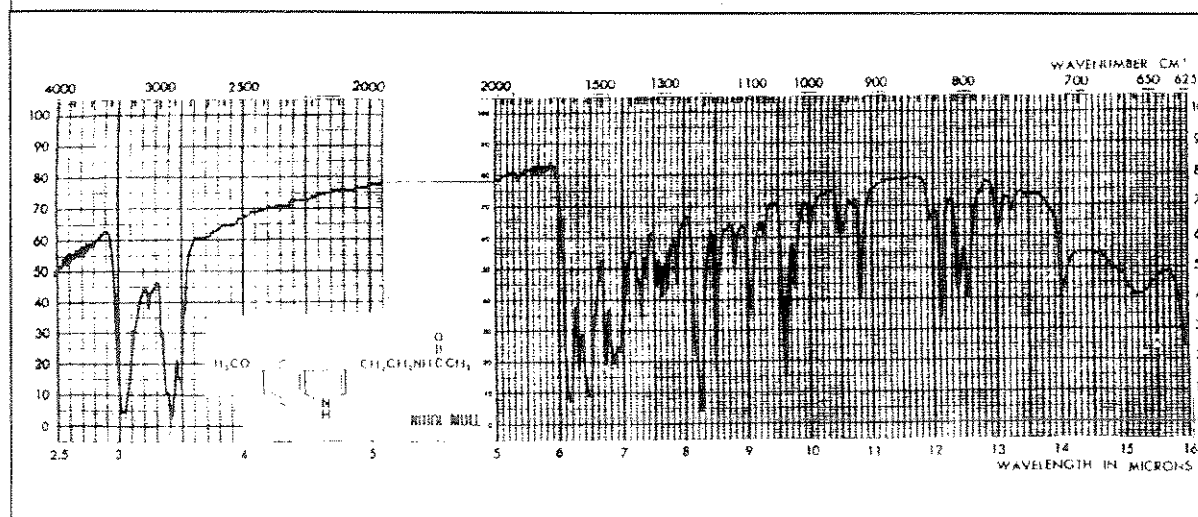
a**b**

Figura 7. Espectros da melatonina na região do infra vermelho. a) espectros das duas soluções (sonicada ----- ; não sonicada -----) foram registrados no espectrofotômetro FT – IR spectrum 1000 da Perkim Elmer, à temperatura ambiente, em pastilhas de KBr, na faixa de comprimento de onda entre 4400 e 450 cm-1. B) espectro teórico da MLT em nujol, de acordo com Pouchert (1981).

Tabela 2. Bandas de absorção observadas para cada grupo funcional da molécula de melatonina, experimental e teórica.

Experimental		Teórico	
Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3304	Estiramento do grupo N-H da amida.	3247	Estiramento do grupo N-H da amida (deslocado devido à interferência do nujol).
1629,19	Estiramento do grupo C=O da amida.	1629	Estiramento do grupo C=O da amida.
1614	Deformação angular do grupo N-H da amida.	1616	Deformação angular do grupo N-H da amida.
1425,19	Estiramento do grupo C-N da amida.	1431	Estiramento do grupo C-N da amida (deslocado devido à interferência do nujol).
1586,62	Deformação angular do grupo N-H da amina secundária.	1587	Deformação angular do grupo N-H da amina secundária.
3304	Estiramento do grupo N-H da amina secundária possui intensidade fraca e pode estar encoberta pela banda correspondente ao estiramento do grupo N-H da amida.	3304	Estiramento do grupo N-H da amina secundária possui intensidade fraca e pode estar encoberta pela banda correspondente ao estiramento do grupo N-H da amida.
1269,59	Estiramento do grupo C-O-C.	1269	Estiramento do grupo C-O-C.
1041,32	Estiramento simétrico do grupo C-O-C.	1042	Estiramento simétrico do grupo C-O-C.
1732 a 1673	Frequência de combinação do anel aromático tris-substituído em 1,2,4.	1733 a 1675	Frequência de combinação do anel aromático tris-substituído em 1,2,4.
925,50 e 825,48	Deformação angular C-C do anel aromático tri-substituído em 1,2,4.	925 e 826	Deformação angular C-C do anel aromático tri-substituído em 1,2,4.

2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E ANTI-MUTAGÊNICA DA MELATONINA

O teste de mutação reversa em *Salmonella typhimurium*, ou teste de Ames, detecta mutações gênicas induzidas em linhagens requerentes do aminoácido histidina (His^-), produzindo linhagens independentes de histidina (His^+). Para se obter uma resposta confiável, três diferentes linhagens de *Salmonella* foram utilizadas. O teste de Ames detecta também mutagênicos indiretos que, quando metabolizados, produzem compostos oxidados que, por sua vez, são genotóxicos. Para investigar a ação dos metabólitos da MLT, utilizou-se um sistema completo de ativação metabólica (S9 mix), que contém a fração S9 e cofatores (NADP, glicose-6-fosfato).

Para o teste de Ames são considerados mutagênicos os compostos que aumentam em pelo menos duas vezes o número de revertentes por placa, relativo ao valor observado espontaneamente (Marion & Ames, 1983). É utilizado, também, uma substância padrão mutagênica para fins comparativos. Neste trabalho foram utilizadas as linhagens de *Salmonella typhimurium* (cepas TA97, TA100 e TA102), na presença e ausência de ativação metabólica. Após a determinação do número de colônias revertentes por placa, foi calculado a relação entre os valores obtidos nas placas tratadas e no controle (células tratadas com tampão fosfato). Esta razão é denominada índice mutagênico (IM).

Para cada experimento foi realizada previamente uma curva de sobrevivência para selecionar uma faixa de concentração atóxica de MLT. O hormônio não apresentou nenhum efeito tóxico nas três linhagens utilizadas (resultados não mostrados), na faixa de concentração entre 29 a 1160 $\mu\text{g/placa}$.

De acordo com a tabela 4 foi observado que, para as células de *Salmonella typhimurium* (cepa TA97) tratadas com diferentes concentrações de MLT (29-1160 $\mu\text{g/placa}$) sem ativação metabólica, o número de revertentes foi aproximadamente igual ao número de revertentes obtidos no controle, ficando o IM por volta de 1,0. Isto indica que a MLT não induziu mutação nesta linhagem. A tabela mostra ainda que o teste respondeu positivamente para o composto mutagênico padrão 4-NQO, utilizado como controle positivo.

Também não se observou atividade mutagênica na linhagem TA97 na presença do sistema de ativação metabólica de fígado de rato, uma vez que os índices mutagênicos obtidos foram sempre menor que 2,0. O teste respondeu positivamente para o composto mutagênico padrão, aflotoxina B₁ (toxina de fungo que requer ativação metabólica para produzir derivados mutagênicos).

A análise da atividade mutagênica da MLT para as linhagens TA100 (tabela 5) e TA102 (tabela 6), mostra que tanto na ausência quanto na presença de ativação metabólica, os IMs ficaram por volta de 1,0. O teste respondeu positivamente para os compostos mutagênicos padrão azida sódica para a linhagem TA100, e 4-NQO para a linhagem TA102. Esses resultados mostram que nem a MLT nem seus metabólitos são genotóxicos no teste de Ames, para as linhagens TA97, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, na faixa de concentração estudada.

Para avaliar a atividade anti-mutagênica da MLT, foi utilizada a linhagem TA102 devido à sua maior sensibilidade ao H₂O₂ (Levin *et al.*, 1982). A figura 8 mostra a inibição da mutagenicidade induzida pelo H₂O₂ 0,5 mM. Verificou-se que a MLT, na faixa de concentração entre 29 a 464 µg/placa, inibiu a ação mutagênica do H₂O₂ (IM de 3,06), de forma dose-dependente. O máximo de inibição (91%) foi observado na dose de 232 µg/placa. Novamente, não foi observada mutagenicidade para as células expostas a concentrações crescentes de MLT (29 - 464 µg/placa), na ausência de H₂O₂.

A tabela 3 contém a conversão das unidades de concentração para a MLT de µg/placa para mM.

Tabela 3. Conversão das unidades de concentração da MLT

mM	µg/placa
0,25	2,9
0,25	58
0,5	116
1,0	232
2,0	464
5,0	1160

Tabela 4. Indução de revertentes de His⁺ na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA97 pela melatonina.

Tratamento		Ausência S9		Presença S9	
Composto	Concentração	N ^o	IM ^b	N ^o	IM ^b
	(µg/placa)	Rev/placa ^a		Rev/placa ^a	
4-NQO ^c	0,5	419 ± 35	5,51 ± 2,16	-	-
AFB ₁ ^d	10	-	-	297 ± 66	3,08 ± 0,47
MLT	-	95 ± 4	1,00 ± 0,06	97 ± 1	1,00 ± 0,05
	29	92 ± 13	0,97 ± 0,15	109 ± 6	1,12 ± 0,05
	58	85 ± 4	0,89 ± 0,07	117 ± 7	1,20 ± 0,05
	116	82 ± 10	0,87 ± 0,13	117 ± 12	1,25 ± 0,05
	232	85 ± 8	0,89 ± 0,09	124 ± 15	1,34 ± 0,07
	464	72 ± 14	0,75 ± 0,13	147 ± 4	1,52 ± 0,04
	1160	-	-	79 ± 22	0,81 ± 0,16

^aN^oRev/placa: números de revertentes por placa. Representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de um experimento típico, dentre, pelo menos, 3 experimentos independentes.

^bIM: número de revertentes de His⁺, induzidos pelo tratamento, por número de revertentes His⁺ obtidos no controle negativo.

^c4-NQO: controle positivo para o tratamento realizado na ausência de S9.

^dAFB₁: controle positivo para o tratamento realizado na presença de S9.

Tabela 5. Indução de revertentes de His⁺ na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA100, pela melatonina.

Tratamento		Ausência S9		Presença S9	
Composto	Concentração	N ^o	IM ^b	N ^o	IM ^b
	(µg/placa)	Rev/placa ^a		Rev/placa ^a	
Az ^c	10	701 ± 98	3,25 ± 0,20	-	-
AFB ₁ ^d	10	-	-	1032 ± 47	13,22 ± 0,27
MLT	-	215 ± 21	1,00 ± 0,05	79 ± 1	1,00 ± 0,03
	29	203 ± 17	0,95 ± 0,14	95 ± 7	1,22 ± 0,09
	58	198 ± 32	0,92 ± 0,06	110 ± 1	1,25 ± 0,31
	116	220 ± 16	1,03 ± 0,08	99 ± 12	1,27 ± 0,16
	232	208 ± 15	0,97 ± 0,08	98 ± 17	1,25 ± 0,18
	464	195 ± 19	0,91 ± 0,08	96 ± 13	1,23 ± 0,17
	1160	198 ± 14	0,92 ± 0,07	94 ± 6	1,19 ± 0,07

^aN^oRev/placa: números de revertentes por placa. Representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de um experimento típico, dentre, pelo menos, 3 experimentos independentes.

^bIM: número de revertentes de His⁺, induzidos pelo tratamento, por número de revertentes His⁺ obtidos no controle negativo.

^cAz: controle positivo para o tratamento realizado na ausência de S9.

^dAFB₁: controle positivo para o tratamento realizado na presença de S9.

Tabela 6. Indução de revertentes de His⁺ na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA102, pela melatonina.

Tratamento		Ausência S9		Presença S9	
Composto	Concentração (µg/placa)	Nº Rev/placa ^a	IM ^b	Nº Rev/placa ^a	IM ^b
4-NQO ^c	0,5	2371 ± 344	12,23 ± 2,3	-	-
AFB ₁ ^d	10	-	-	1099 ± 185	3,20 ± 0,75
MLT	-	197 ± 31	1,00 ± 0,07	343 ± 30	1,00 ± 0,05
	29	223 ± 55	1,36 ± 0,20	339 ± 72	0,99 ± 0,29
	58	216 ± 13	1,13 ± 0,27	353 ± 2	1,03 ± 0,08
	116	238 ± 14	1,24 ± 0,24	397 ± 18	1,16 ± 0,09
	232	241 ± 3	1,25 ± 0,23	357 ± 42	1,04 ± 0,19
	464	215 ± 9	1,11 ± 0,15	363 ± 57	1,06 ± 0,24
	1160	235 ± 25	1,23 ± 0,34	308 ± 33	0,90 ± 0,02

^aNº Rev/placa: números de revertentes por placa. Representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de um experimento típico, dentre, pelo menos, 3 experimentos independentes.

^bIM: número de revertentes de His⁺, induzidos pelo tratamento, por número de revertentes His⁺ obtidos no controle negativo.

^c4-NQO: controle positivo para o tratamento realizado na ausência de S9.

^dAFB₁: controle positivo para o tratamento realizado na presença de S9.

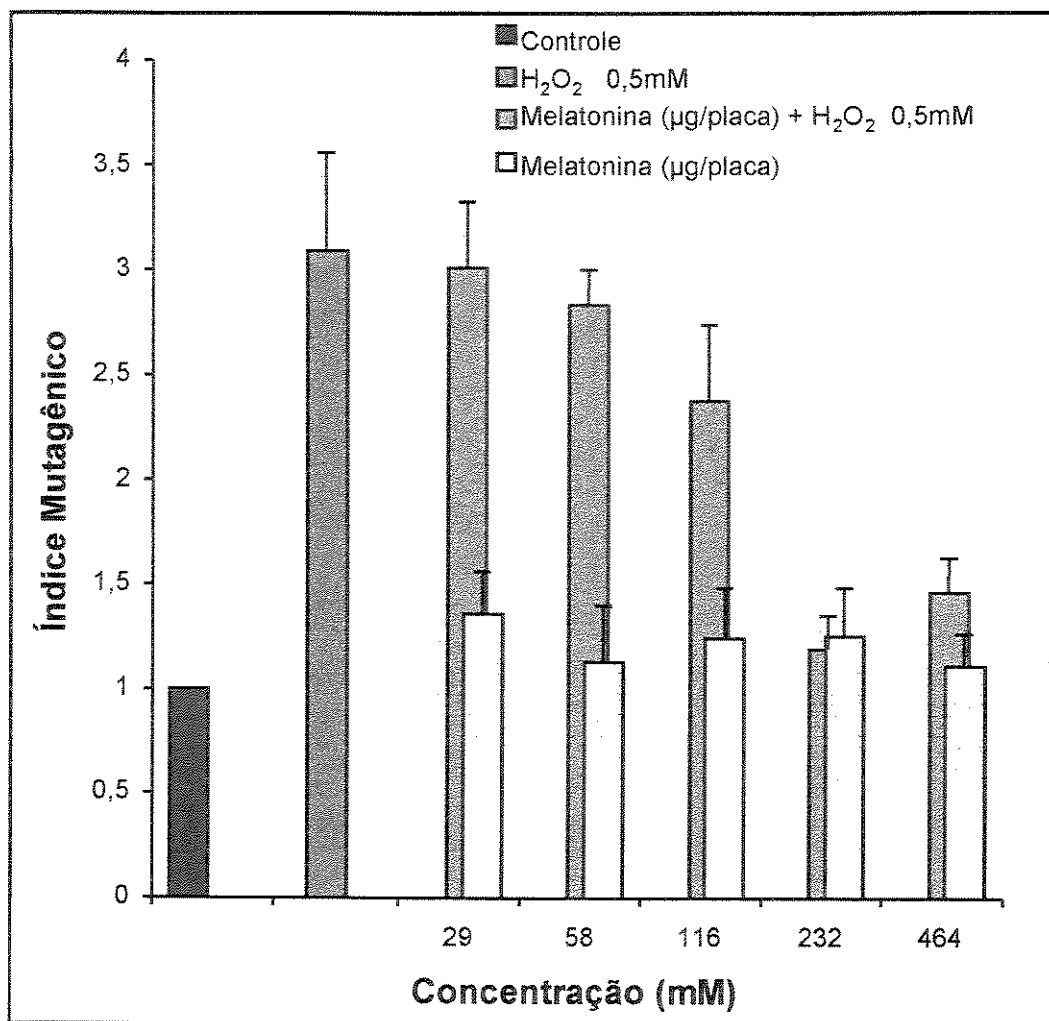


Figura 8. Efeito anti-mutagênico da melatonina. Salmonella typhimurium, cepa TA102, foi incubada com MLT sozinha ou na presença de 0,5 mM de H₂O₂ (30 min, 37°C). Ao final, 2 ml de agar fundido foi adicionado à cada tubo teste e a mistura transferida para placas contendo meio mínimo seletivo para histidina (His⁺). Colônias revertentes foram contadas depois de 2 dias de incubação. A atividade mutagênica foi expressa pelo índice de mutação (IM), como descrito em Materiais e Métodos (item 2.2.4). Os pontos representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de um experimento típico.

3. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

A atividade citotóxica da MLT foi determinada medindo-se seus efeitos sobre a viabilidade e proliferação celular de fibroblastos V79 cultivados *in vitro*. Estas células pertencem a uma linhagem estabelecida em cultura, oriunda de pulmão de hãster chinês, que tem sido amplamente utilizada em testes de citotoxicidade e genotoxicidade, por causa de sua rápida reprodução e fácil manutenção *in vitro* (Capucci *et al.*, 1995; Clemedson *et al.*, 1996).

Inicialmente, a viabilidade celular da MLT foi determinada através do teste do MTT. Este ensaio se baseia na medida da capacidade celular em reduzir o MTT a azul de formazan, pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de redução do MTT em relação ao ensaio controle (células não tratadas). A figura 9 mostra que a MLT não inibiu a atividade mitocondrial de redução do MTT numa ampla faixa de concentração testada (0,0001 a 1 mM), indicando que ela é atóxica para fibroblastos V79.

Buscando confirmar esse fato, a atividade citotóxica da MLT foi analisada através de um método mais sensível, medindo seus efeitos sobre a proliferação celular de fibroblastos V79. Para isso, células V79 foram expostas à MLT, em sua fase exponencial de crescimento, e a proliferação celular foi medida no período de 24 horas após o tratamento.

De acordo com o gráfico (figura 10), após curta exposição (30 minutos), a MLT não produziu alteração significativa (foi utilizada a ferramenta Modelo Linear Geral para executar o teste de comparação múltipla de Tukey, considerando $\alpha = 0,05$) da proliferação celular de fibroblastos V79, em concentrações entre 0,01 e 5 mM.

O 1-heptanol, considerado um irritante severo (Shopsis & Sathe, 1984), foi utilizado como padrão de citotoxicidade. Trabalhou-se na mesma faixa de concentração (0,01 a 5 mM), a fim de se comparar com os resultados obtidos com a MLT. O gráfico em destaque na figura 10 mostra que esse álcool não induziu efeitos tóxicos em fibroblastos V79 em concentrações inferiores a 3 mM. Entretanto, na concentração de 4 mM foi observada uma severa inibição da proliferação celular, enquanto na concentração de 5 mM também foi verificada uma diminuição do número de células.

A seguir, foi analisado o efeito de uma exposição prolongada (24 hs) das células a concentrações crescentes de MLT (0,5- 5,0 mM). A figura 11 mostra que houve inibição da proliferação celular de forma dependente da dose. Nas mesmas condições, o 1-heptanol também causou inibição da proliferação celular de forma dependente da dose (gráfico em destaque na figura 11).

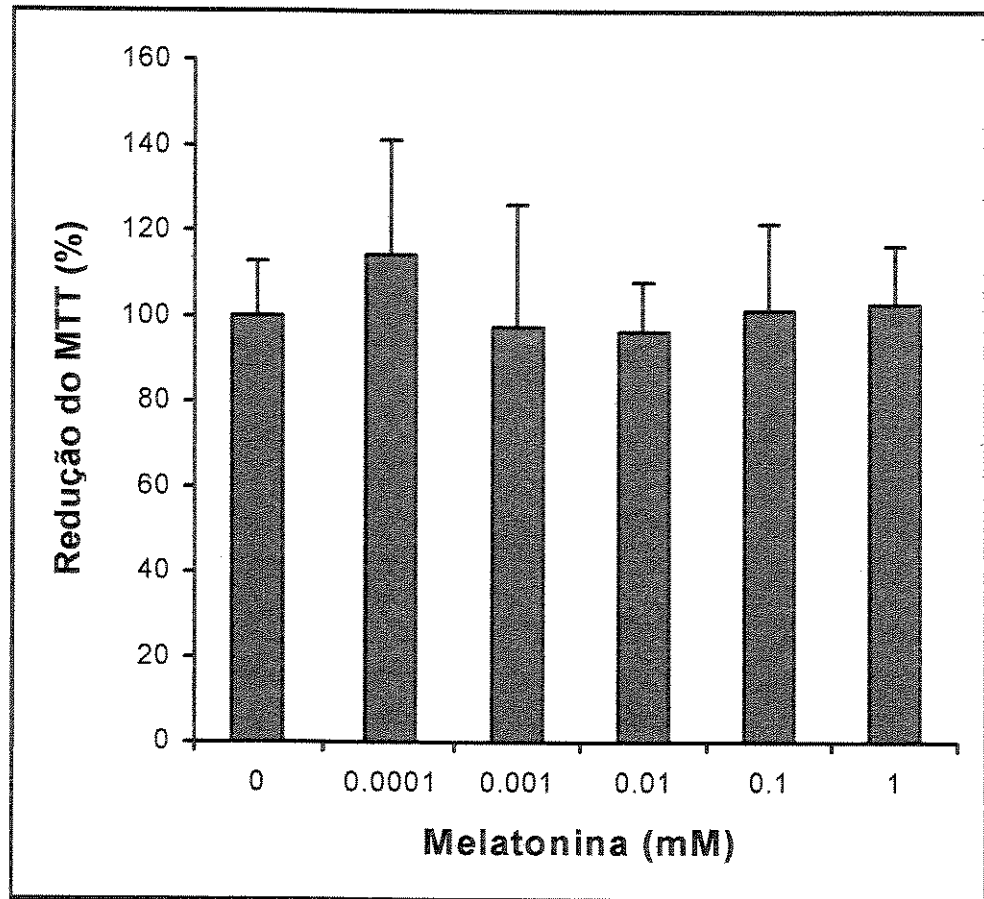


Figura 9. Efeito da melatonina sobre a viabilidade celular. Fibroblastos V79, em fase exponencial do crescimento, foram expostos (2 hs, 37°C) a concentrações crescentes de MLT em meio DMEM sem SFB. As células foram, então, incubadas com MTT (1 mg/ml por 1 h, a 37°C) e o corante reduzido foi extraído e quantificado por sua absorvância a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de redução do MTT em relação ao ensaio controle, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.3.3). Os pontos representam valores médios de 3 experimentos independentes.

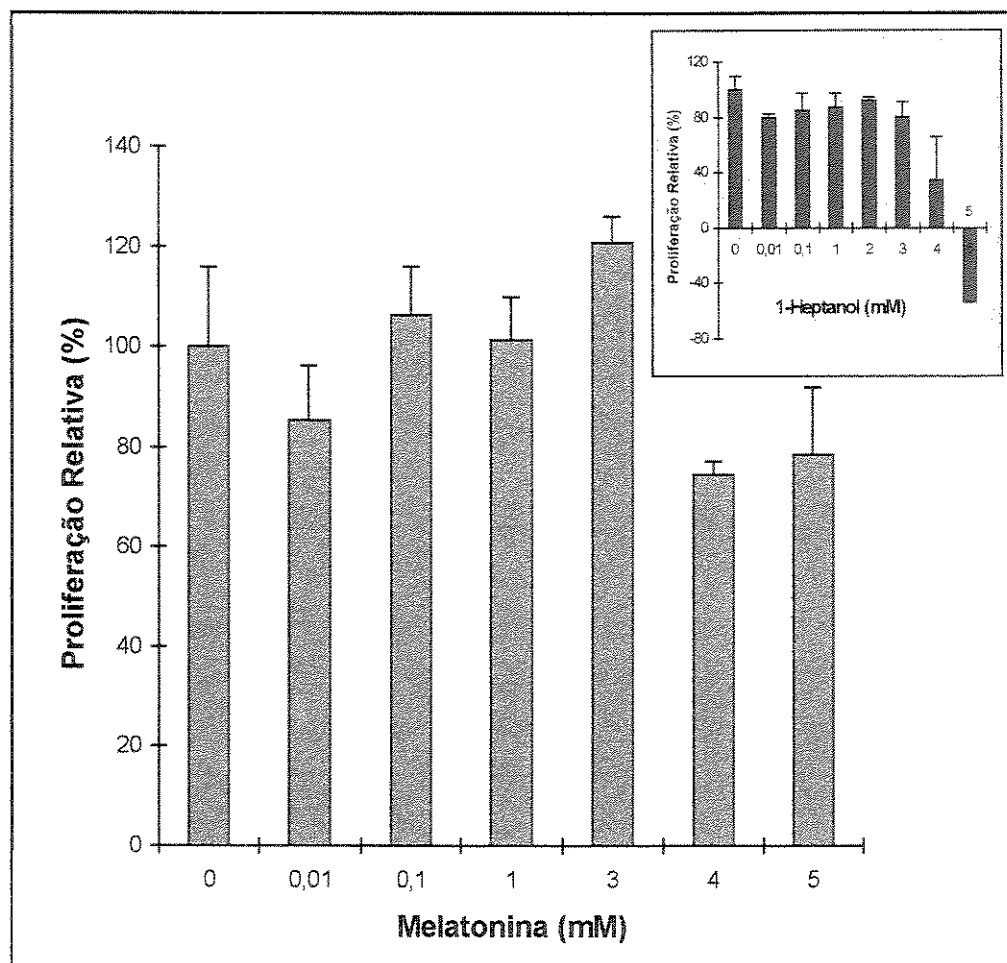


Figura 10. Efeito da melatonina sobre a proliferação celular após curta exposição. Fibroblastos V79, em fase exponencial de crescimento, foram expostos (30 min, 37°C) a concentrações crescentes de MLT ou 1-heptanol em PBS. Após 24 hs de incubação a 37°C as células foram fixadas e lisadas. O aumento da população celular foi avaliado medindo-se a absorbância dos lisados a 260 nm em relação ao ensaio controle, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.3.2). Os pontos representam valores médios de 3 experimentos independentes.

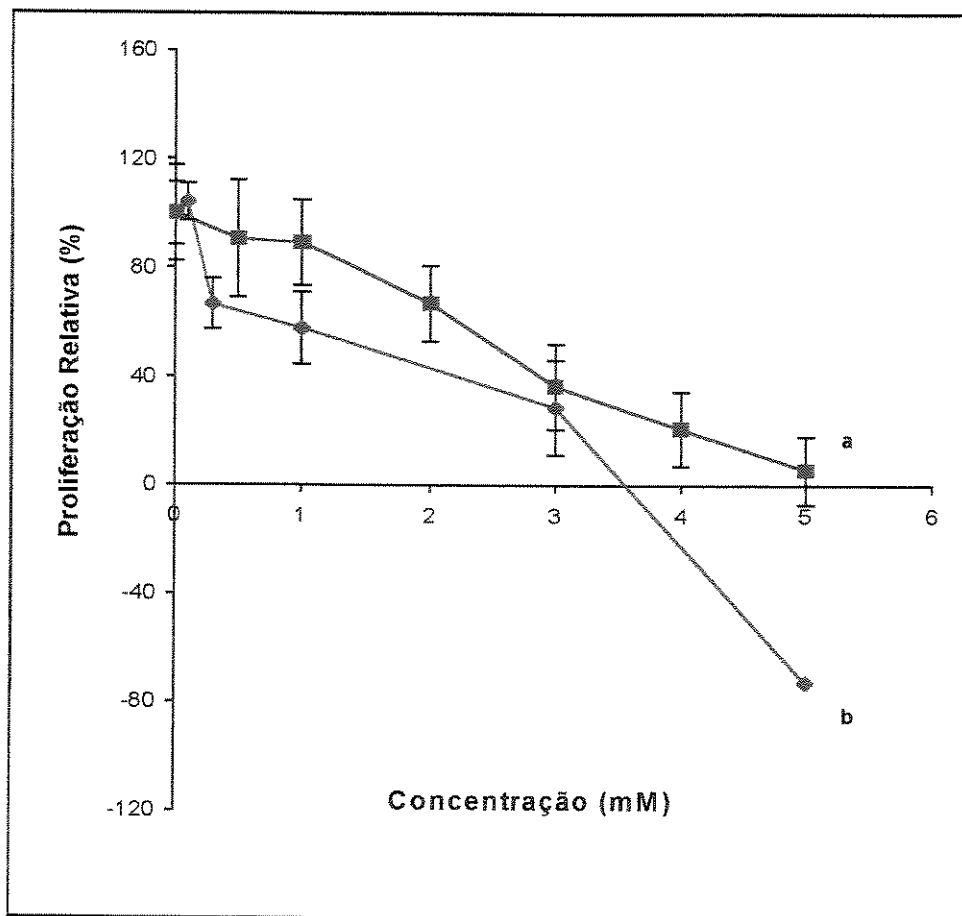


Figura 11. Efeito da melatonina sobre a proliferação celular após exposição prolongada.

Fibroblastos V79, em fase exponencial de crescimento, foram expostos (24 horas, 37°C) a concentrações crescentes de MLT (a) ou 1-heptanol (b), em meio DMEM mais 10% SFB. Após o tratamento, as células foram fixadas e lisadas. O aumento da população celular foi avaliado medindo-se a absorbância dos lisados a 260 nm em relação ao ensaio controle, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.3.2) Os pontos representam valores médios de 3 experimentos independentes. Na concentração de 5 mM de heptanol obteve-se o valor de $-73 \pm 57\%$ na proliferação celular.

4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA MELATONINA

4.1. Atividade Antioxidante da Melatonina em Solução:

Inicialmente, procurou-se detectar a atividade antioxidante da MLT em um sistema livre de células, a fim de comparar sua eficiência como sequestrador de radicais hidroxila com a de outros antioxidantes conhecidos, sem restrições de permeabilidade.

Um dos métodos mais utilizados para detecção de danos oxidativos causados por radicais livres, consiste na quantificação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O teste do TBA é amplamente usado para medir a peroxidação lipídica que ocorre em membranas biológicas, devido à formação de aldeídos reativos com o TBA, como o malondialdeído (MDA), formando um aduto detectado a 532 nm (Kosgi & Kikugawa, 1989). O teste do TBA é também usado na detecção de produtos da degradação de carboidratos, amino ácidos e ácidos nucleicos. Um substrato susceptível ao ataque de radicais hidroxila, gerando compostos reativos com o TBA, é a desoxirribose, a qual sofre ruptura do anel da pentose formando aldeídos. A condição padrão para os ensaios de degradação da desoxirribose foi estabelecida baseada no trabalho de Halliwell & Gutteridge (1981), com algumas modificações visando melhorar o rendimento do ensaio. Utilizamos como sistema oxidativo o H_2O_2 na presença do quelato Fe^{+3}/NTA .

A figura 12 mostra o efeito da MLT sobre a degradação oxidativa da desoxirribose induzida pelo H_2O_2 (1,4 mM), na presença do complexo de Fe^{+3}/NTA (25 e 100 μM , respectivamente). O valor médio da absorbância do ensaio foi tomado como 100% de oxidação. O efeito antioxidante da MLT foi expresso em termos da porcentagem da redução de oxidação da desoxirribose. A partir da curva calculou-se o IC_{50} (concentração que inibiu 50% a oxidação da desoxirribose) da MLT (tabela 7).

Inibição da degradação oxidativa da desoxirribose

Antioxidante	IC ₅₀ (mM)	Potência Relativa
Manitol	3	1
Glutathiona	0,15	20
Melatonina	0,015	200
Trolox	0,001	3000

Foram realizados ensaios expostos ao sistema oxidativo de Fe⁺³/NTA/H₂O₂ na presença de sequestradores conhecidos de radicais hidroxila: manitol, glutathiona e trolox (curvas A, B e C da figura 13; respectivamente).

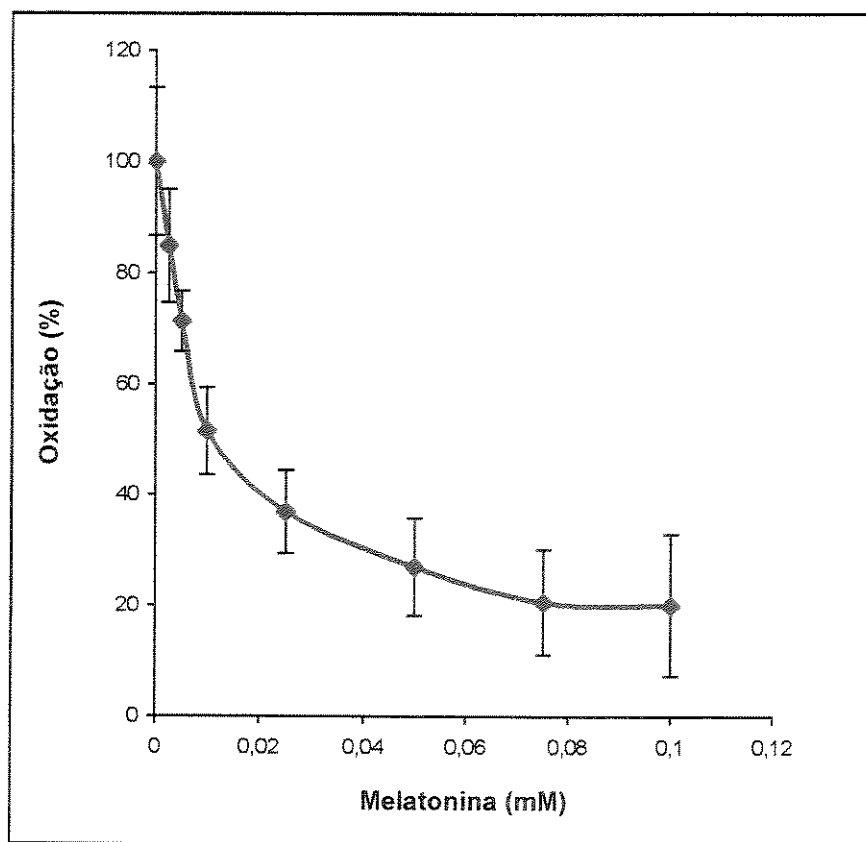


Figura 12. Efeito da melatonina sobre a degradação oxidativa da desoxirribose. Desoxirribose (2,8 mM) foi incubada por 20 minutos a 37°C, na presença de H₂O₂/Fe⁺³/NTA (1,4 mM; 25 µM e 100 µM, respectivamente) e concentrações crescentes de MLT. Ao final da incubação, procedeu-se à reação com o TBA e quantificação dos adutos formados por espectroscopia a 532 nm, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.4.1). Os pontos representam valores médios de 2 experimentos independentes.

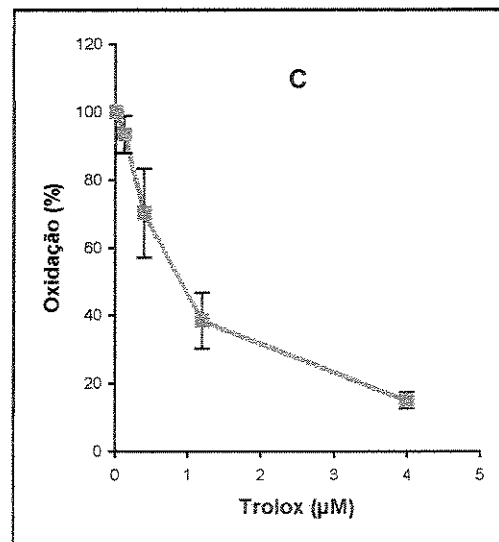
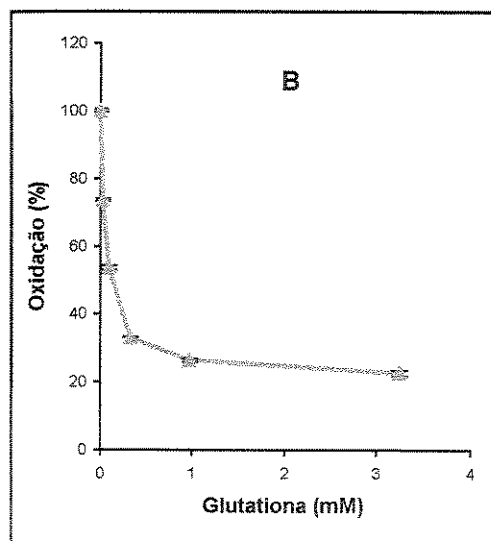
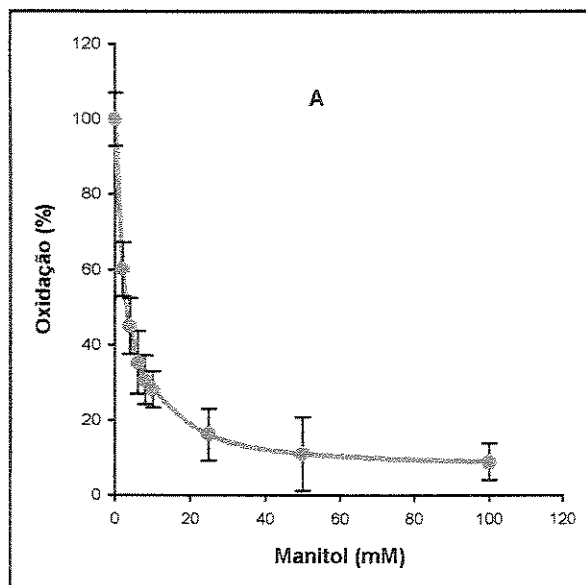


Figura 13. Efeito dos antioxidantes sobre a degradação oxidativa da desoxirribose Desoxirribose (2,8 mM) foi incubada por 20 minutos a 37°C, na presença de H₂O₂/Fe⁺³/N⁻ (1,4 mM; 25 µM e 100 µM, respectivamente) e concentrações crescentes dos antioxidantes manitol (painel A), glutaciona (painel B) e Trolox (painel C). Ao final da incubação, procedeu-se à reação com o TBA e quantificação dos adutos formados por espectroscopia a 532 nm, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.4.1). Os pontos representam valores médios de experimentos independentes.

4.2. Efeito Antioxidante da Melatonina em Culturas de Células V79:

Na etapa seguinte, foram realizados estudos para avaliar a capacidade da MLT em proteger as células contra danos causados por EROs. Primeiramente, a atividade antioxidante da MLT foi determinada pela medida de seu efeito protetor sobre a inibição da proliferação celular de fibroblastos V79, causada pelo oxidante H₂O₂. Para isso, as células foram expostas ao H₂O₂ (50 µM em PBS), na presença de concentrações crescentes da MLT (0,001 a 0,1 mM), medindo-se a proliferação celular ocorrida no intervalo de 24 horas após o tratamento. A concentração de H₂O₂ de 50 µM foi escolhida com base em uma curva dose-resposta, como a concentração que inibiu cerca de 60% da proliferação celular.

Verificou-se que a MLT atenua parcialmente (50 ± 7%) o efeito do H₂O₂ na concentração mais efetiva, a 0,001 mM. Este valor é comparável ao valor encontrado para o antioxidante padrão tiourea, a 10 mM. Em concentrações iguais ou maiores que 0,01 mM não houve efeito significativo de proteção sobre a inibição da proliferação celular.

A seguir, analisou-se o efeito protetor da MLT sobre a inibição da viabilidade celular em fibroblastos V79, causada por oxidantes, através do ensaio de MTT. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de redução do MTT em relação ao ensaio controle (células não tratadas). A figura 15 mostra que a MLT, numa ampla faixa de concentração (0,0001 a 1,0 mM), não mostrou efeito protetor significativo sobre a inibição da redução do MTT, induzida pelo H₂O₂ a 2,5 mM (foi utilizada a ferramenta ANOVA para executar o teste de comparação múltipla de Tukey, considerando $\alpha = 0,05$). A concentração de H₂O₂ de 2,5 mM foi escolhida com base em uma curva dose-resposta, como a concentração que inibiu cerca de 40% a redução do MTT. Neste ensaio, obteve-se um efeito protetor da tiourea (10 mM) praticamente total (90 ± 5%), sobre a inibição da redução do MTT.

Nas mesmas condições, a MLT também não protegeu a membrana mitocondrial contra os danos causados pelo hidroperóxido de cumeno (figura 16). A concentração de HPC de 2,5 mM foi escolhida com base em uma curva dose-resposta, como a concentração que inibiu cerca de 50% a redução do MTT. Para o antioxidante padrão, a tiourea (10 mM), foi observado um efeito protetor sobre a viabilidade celular de 60 ± 6%. Esses resultados

mostram que a MLT não protege os fibroblastos V79 contra os danos induzidos pelo H_2O_2 e pelo HPC a nível da atividade da desidrogenase succínica.

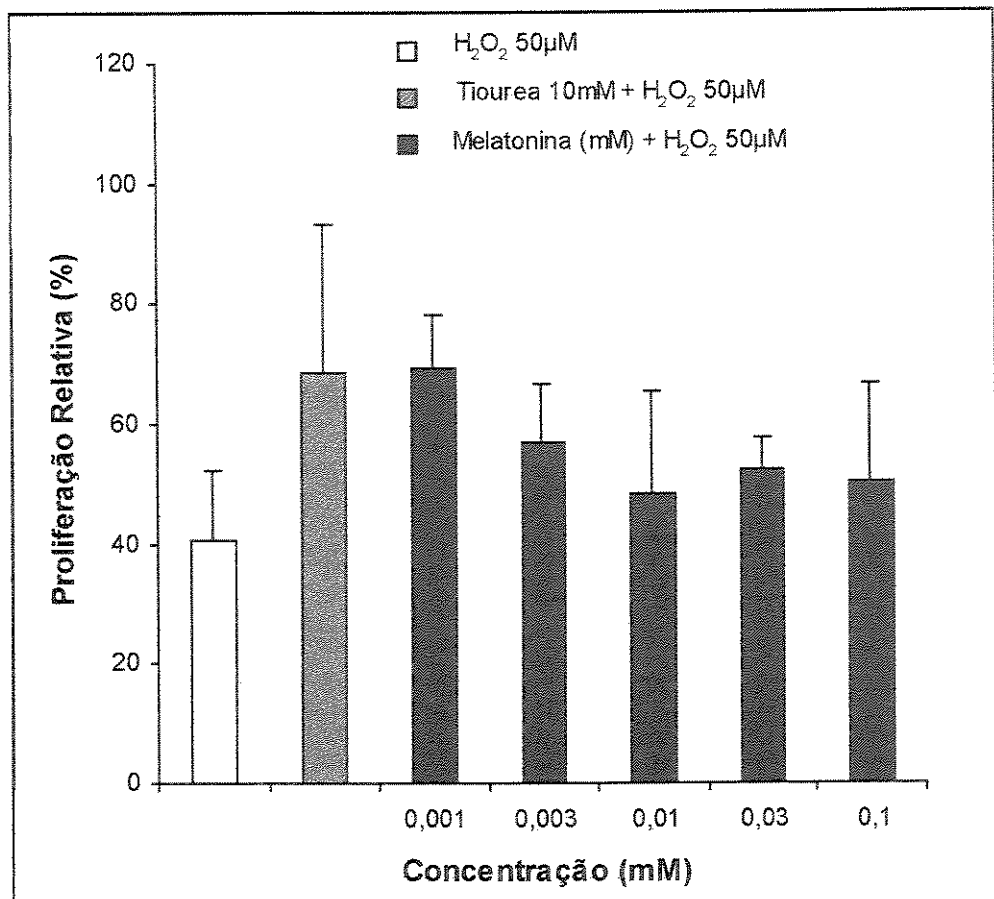


Figura 14. Efeito da melatonina sobre a inibição da proliferação celular, induzida por H₂O₂. Fibroblastos V79, em fase exponencial de crescimento, foram expostos a concentrações crescentes de MLT ou tiourea (10 mM), na presença de 50 µM de H₂O₂ por 30 min a 37°C. Após o tratamento, as células foram cultivadas por mais 24 hs, e o aumento da população celular foi avaliado medindo-se a absorbância dos lisados a 260 nm em relação ao ensaio controle, como descrito em materiais e métodos (item 2.3.2). Os pontos representam valores médios de 3 experimentos independentes.

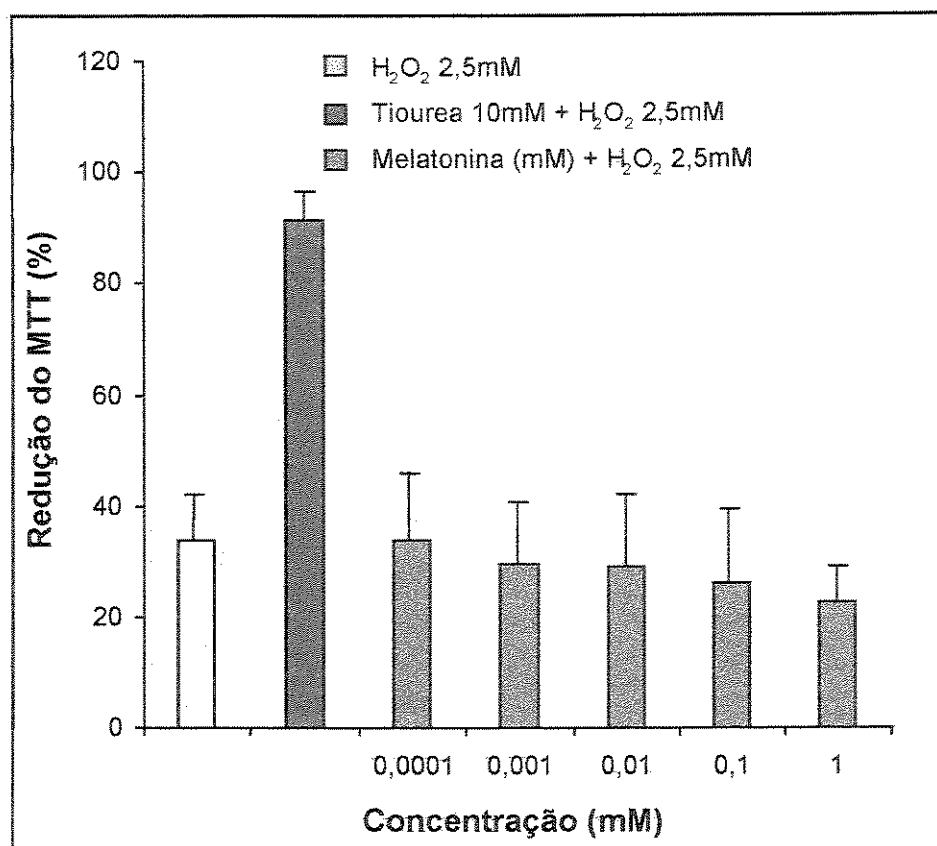


Figura 15. Efeito da melatonina sobre a inibição da viabilidade celular, induzida por H₂O₂. Fibroblastos V79, em fase exponencial de crescimento, foram expostos (2 hs, 37°C) a concentrações crescentes de MLT ou tiourea (10 mM), na presença de H₂O₂ (2,5 mM), em meio DMEM sem SFB. As células foram, então, incubadas com MTT (1 mg/ml, por 1 h, a 37°C) e o corante reduzido foi extraído e quantificado por sua absorvância a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de redução do MTT em relação ao ensaio controle, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.3.3). Os pontos representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de um experimento típico, dentre, pelo menos, 3 experimentos independentes.

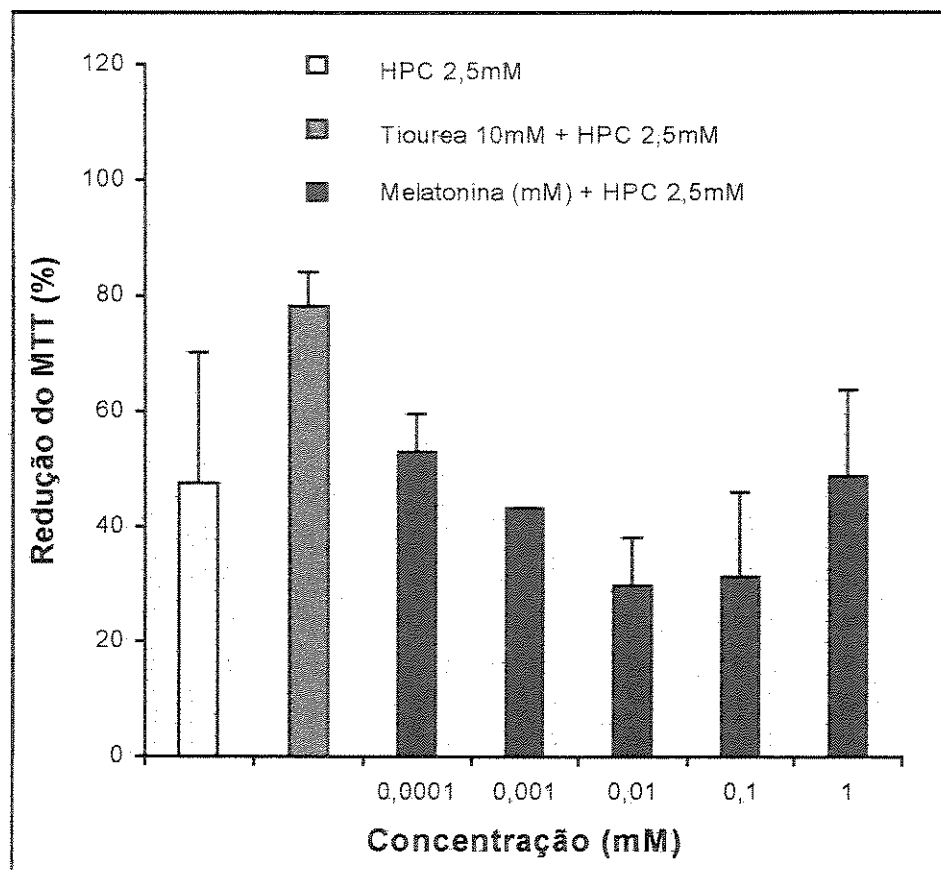


Figura 16. Efeito da melatonina sobre a inibição da viabilidade celular, induzida por HPC. Fibroblastos V79, em fase exponencial de crescimento, foram expostos (2 hs, 37°C) a concentrações crescentes de MLT ou tiourea (10 mM), na presença de HPC (2,5 mM), em meio DMEM sem SFB. As células foram, então, incubadas com MTT (1 mg/ml, por 1 h, a 37°C) e o corante reduzido foi extraído e quantificado por sua absorbância a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem de redução do MTT em relação ao ensaio controle, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.3.3). Os pontos representam valores médios de 3 ensaios \pm desvio padrão de um experimento típico, dentre, pelo menos, 3 experimentos independentes.

4.3. Efeito Antioxidante da Melatonina em Eritrócitos Humanos:

A seguir, procurou-se analisar a capacidade da MLT em proteger a membrana de eritrócitos humanos contra danos oxidativos, através da quantificação da peroxidação lipídica induzida por H_2O_2 .

A condição padrão para os ensaios de peroxidação lipídica de membrana de eritrócitos foi determinada baseada no trabalho de Stocks & Dormandy (1971), com algumas adaptações realizadas por Pereira *et al.* (1998; trabalho submetido a publicação). A peroxidação lipídica foi determinada através da reação do TBA com os produtos da degradação oxidativa dos lipídios da membrana celular, induzida por H_2O_2 . Para uma suspensão de células com o equivalente de 0,5 mM de hemoglobina, quantidades crescentes de malondialdeído foram obtidas com concentrações crescentes de H_2O_2 (1 a 10 mM).

Conforme mostra a figura 17, houve grande variação individual na sensibilidade ao H_2O_2 . A amostra do indivíduo A foi mais susceptível à peroxidação lipídica causada pelo oxidante. Devido a esta susceptibilidade, o indivíduo A foi escolhido para seguir a avaliação do efeito da MLT sobre a peroxidação lipídica em eritrócitos. A figura 18 mostra que a MLT produziu um efeito protetor significativo sobre a peroxidação lipídica induzida por H_2O_2 (5 mM). Esse efeito foi observado nas concentrações entre 0,3 e 3,0 mM, de forma dose-dependente.

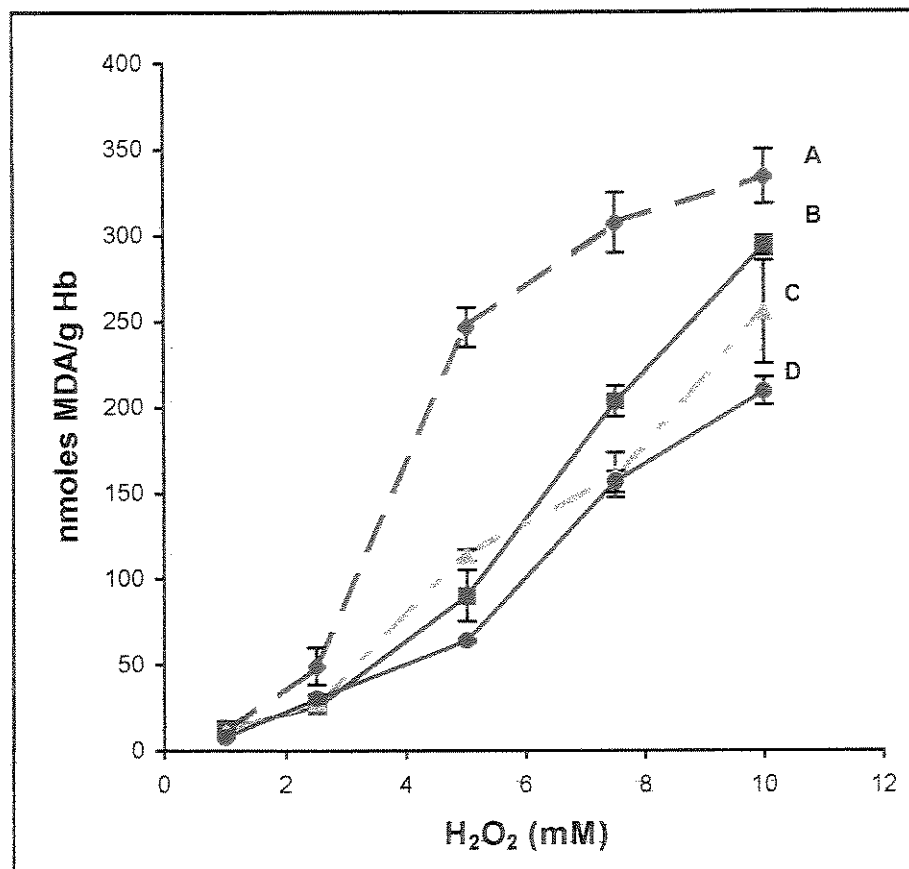


Figura 17. Indução de peroxidação lipídica em eritrócitos humanos por H₂O₂. Hemáceas humanas foram incubadas (30 min, 37°C), numa concentração equivalente a 0,5 mM de Hb, com diferentes concentrações de H₂O₂ em PBS, na presença de Az (2 mM). Os produtos da peroxidação lipídica foram quantificados pela sua reação com o TBA, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.4.4). Os valores foram expressos pela quantidade de malondialdeído (MDA) formado por grama de Hb. Os pontos representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de cada indivíduo (A, B, C e D).

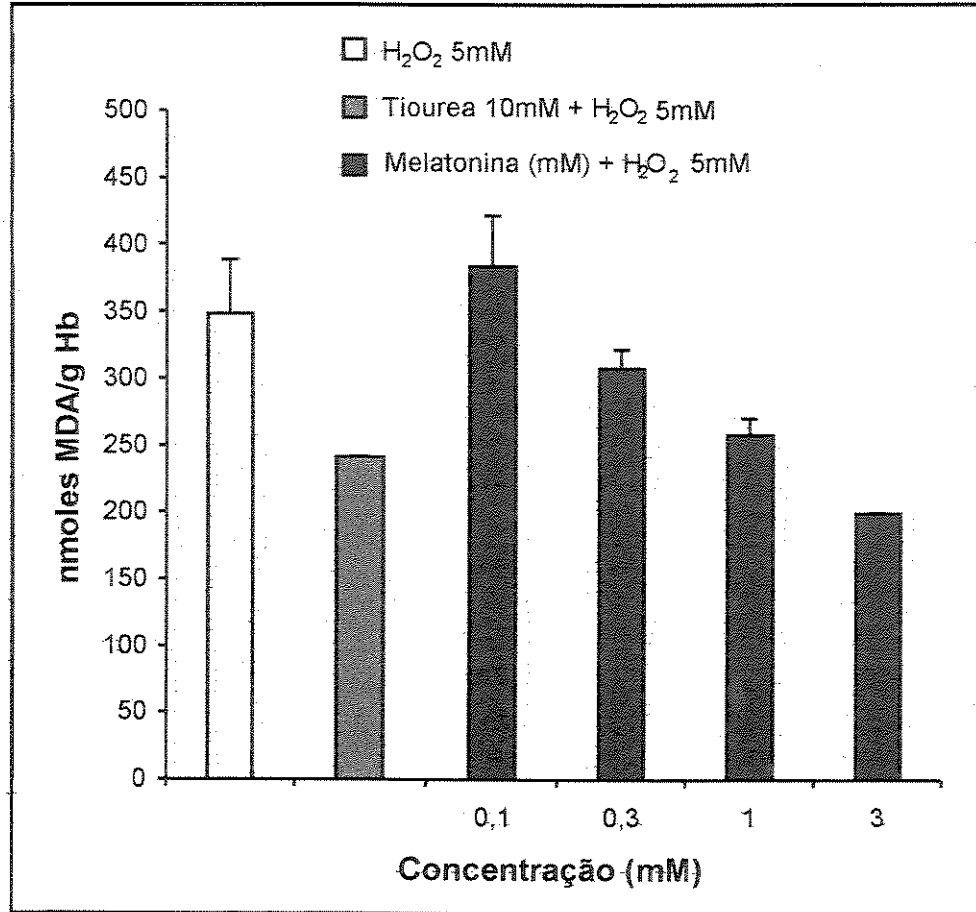


Figura 18. Efeito da melatonina sobre a peroxidação lipídica em eritrócitos, induzida por H₂O₂. Hemáceas humanas, numa concentração equivalente a 0,5 mM de Hb, foram pré incubadas (10 min, 37°C) com diferentes concentrações de MLT ou tiourea (10mM), em PBS na presença de Az (2 mM). Após este período, as células foram incubadas (30 min, 37°C) com H₂O₂ a 5 mM, na presença ou ausência dos antioxidantes. Os produtos da peroxidação lipídica foram quantificados pela sua reação com o TBA, como descrito em Materiais e Métodos (item 2.4.4). Os valores foram expressos pela quantidade de malondialdeído (MDA) formado por grama de Hb. Os pontos representam valores médios de 3 ensaios ± desvio padrão de um experimento típico.

DISCUSSÃO

A descoberta recente de que o neurohormônio, MLT, apresenta outras funções independentes da presença de receptores de membranas nas células, despertou o interesse pela sua utilização farmacológica pela população. A utilização populacional da MLT requer extensos estudos toxicológicos, como a avaliação de sua genotoxicidade e citotoxicidade.

Um dos objetivos deste trabalho foi analisar o potencial genotóxico e citotóxico da MLT. Em alguns estudos sobre seu potencial tóxico, a MLT foi dissolvida em solventes como DMSO ou etanol, pois sua solubilidade em água é baixa (Neville *et al.*, 1989; Vijayalaxmi *et al.*, 1996). Já Shida *et al.* (1994) utilizaram vesículas lipídicas contendo uma concentração de MLT em até 5 mM para tentar solubilizá-la em água.

A fim de obter concentrações farmacológicas de MLT em sistemas aquosos, foi utilizado o processo de sonicação que auxilia a solubilização de concentrações maiores de MLT, sem a necessidade de se utilizar vesículas lipídicas. Para tanto, foi necessário avaliar, através de métodos analíticos, se este processo estaria decompondo a molécula do hormônio. Primeiramente, a MLT foi caracterizada através de seu ponto de fusão. O valor obtido para o ponto de fusão foi 117°C, praticamente o mesmo observado em literatura: 116-118°C (The Merck Index, 1983). O composto utilizado nos experimentos, realmente era a MLT, e tinha uma pureza relativamente alta, uma vez que o ponto de fusão é tido como a impressão digital de compostos químicos.

Após esta avaliação, o método de cromatografia de camada delgada foi utilizado. De acordo com os resultados, houve a formação de apenas uma mancha na placa de sílica, para cada solução analisada (solução sonicada, não sonicada e padrão), com os seus R_fs semelhantes ao obtido pela solução padrão (0,84, 0,85 e 0,83, respectivamente). Estes resultados mostram que não houve decomposição da molécula de MLT. Os resultados puderam ser comprovados através da leitura do valor de absorbância na região do UV, logo após a solubilização (figura 5). Este método analítico auxiliou, também, na análise da estabilidade da solução aquosa de MLT (sonicada e não sonicada) após 10 dias de estocagem (figura 6). Pela lei de Beer (Jeffery *et al.*, 1992), a absorbância (A) na região do ultra violeta está diretamente relacionada ao caminho óptico da cubeta de quartzo (b), à concentração da amostra em solução (c) e ao seu coeficiente de extinção molar, ϵ . Através

desta equação, foi possível calcular o valor da concentração da MLT em cada solução ($\epsilon_{223\text{nm}} = 27.550 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Estes valores estão mostrados na tabela 1.

O pequeno aumento obtido nas concentrações de MLT da solução sonicada em relação à solução não sonicada, só mostra que o processo de sonicação possibilitou a maior solvatação do composto pelas moléculas de água, melhorando sua solubilização.

Os espectros de absorção na região do IV (figura 7) dos cristais obtidos da solução sonicada e não sonicada da MLT, mostram que as duas soluções são idênticas entre si, com os mesmo picos de absorção nos comprimentos de onda característicos para cada estiramento. De acordo com a tabela 2, as bandas de absorção obtidas experimentalmente foram características para cada grupo funcional da molécula da MLT, em comparação com as bandas de absorção teórica. Estes resultados obtidos pelas três técnicas analíticas utilizadas, mostram que a substância presente nas soluções aquosas (sonicada e não sonicada) é a MLT, e ela não foi modificada estruturalmente após o processo de solubilização e estocagem.

Depois de verificada a estabilidade do hormônio após a solubilização e estocagem, deu-se início ao estudo do seu potencial genotóxico através do teste de Ames. O ensaio detecta, eficientemente, tanto agentes mutagênicos que causam mutações pontuais (substituição de pares de bases no DNA), quanto mutagênicos que provocam “frameshift mutations” (defasagem no quadro de leitura), por adição ou deleção de pares de bases no genoma (Ames *et al.*, 1975). Para se obter uma resposta confiável, três diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* foram utilizadas (cepas TA97, TA100 e TA102), na presença e ausência de ativação metabólica. A mutação, nas linhagens TA100 e TA102, é detectada pela substituição de pares de bases (G•C para TA100 e A•T para TA102 como pontos críticos de reversão). Na linhagem TA97, a mutação é detectada por defasagem de leitura (Levin *et al.*, 1982).

O teste de Ames detecta também mutagênicos indiretos que, quando metabolizados, produzem compostos oxidados que, por sua vez, são genotóxicos. A metabolização das drogas ocorre nas células hepáticas animais, pelas enzimas constituintes do complexo citocromo P450. A ativação metabólica *in vitro* pode ser realizada através do isolamento do complexo enzimático por centrifugação diferencial de um homogenato de células de fígado

de rato, separando-se a fração sobrenadante, ou fração S₉, do sedimento mitocondrial, a qual contém os microssomos hepáticos. A esta fração adicionou-se cofatores (NADP, glicose-6-fosfato), obtendo-se um sistema completo de ativação metabólica (S₉ mix).

Como se pode observar nas tabelas 4, 5 e 6, a MLT não apresentou efeito mutagênico para as linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA100 e TA102), na presença ou na ausência de ativação metabólica, durante o teste de Ames, apresentando um valor de IM menor que 2,0. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Neville *et al.* (1989), onde eles não observaram mutagenicidade da MLT (dissolvida em DMSO até 5000 µg/ml) e seu principal metabólito, 6-hidroxi-melatonina, nas linhagens TA97, TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*. Estes resultados indicam que a MLT não induziu mutação por substituição de pares de bases (G•C para TA100 e A•T para TA102), nem por defasagem de leitura (linhagem TA97 e TA98 por Neville *et al.*, 1989).

A figura 8 mostra, novamente, que a MLT não induziu mutagenicidade e mostra, também, que protegeu as células de *Salmonella typhimurium* (linhagem TA102) contra a mutação induzida pelo H₂O₂ (0,5 mM), de forma dose-dependente (29 - 464 µg/placa). O termo “antimutagênico” foi usado originalmente por Waters *et al.* (1990), para descrever aqueles compostos que reduzem a frequência ou a razão da mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido. Neste caso, a mutação está sendo induzida pelos EROs formados a partir do H₂O₂, na linhagem TA102 sensível ao stress oxidativo (Levin *et al.*, 1982). As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser uma das classes de mutagênicos mais importantes que contribuem para o envelhecimento e para o câncer (Emerit, 1994).

Desta maneira, o uso de antioxidantes pode reduzir a mutagenicidade, ao sequestrar radicais livres formados pelos compostos oxidantes. A MLT, como um antioxidante eficiente (Tan *et al.*, 1993), pode estar sequestrando diretamente o radical hidroxila formado pelo H₂O₂, evitando a formação de lesões no DNA, indutoras da substituição de pares de base A•T na linhagem TA102. Musatov *et al.* (1998) chegaram a resultados similares utilizando outros oxidantes, como 1,2-dimetilhidrazina, bleomicina e mitomicina C. De acordo com Kasai *et al.* (1986), provavelmente esta lesão pode estar ocorrendo na posição C-8 do resíduo da desoxiguanina no DNA, que é hidroxilada para formar o produto 8-

hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG). Estes resultados mostram que a MLT não é mutagênica, além disso, ela protege as células de *Salmonella* contra a mutagenicidade de oxidantes.

A atividade citotóxica da MLT foi primeiramente determinada através da medida da capacidade da célula em reduzir o MTT a azul de formazan pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Este método foi escolhido por ser amplamente utilizado no mundo científico, como um bom parâmetro para verificar toxicidade de compostos químicos (Cervinka *et al.*, 1994). A figura 9 mostra que a MLT não inibiu a atividade mitocondrial de redução do MTT na faixa de concentração testada (0,0001 a 1 mM). Sua citotoxicidade foi novamente avaliada por outro método mais sensível, a inibição da proliferação celular, numa faixa de concentração maior (0,01 a 5 mM) uma vez que não foi observada citotoxicidade na redução do MTT. Após curta exposição (30 min), a MLT não produziu alteração significativa da proliferação celular de fibroblastos V79, em concentrações entre 0,01 e 5 mM (figura 10). O 1-heptanol, utilizado como padrão de citotoxicidade (Shopsis & Sathe, 1984), inibiu a proliferação celular a 4 mM, e a 5 mM houve perda da adesão celular. Comparando estes resultados, a MLT não apresentou citotoxicidade nas concentrações até 5 mM. Entretanto, os dados sugerem que pode existir uma tendência de inibição da proliferação para este hormônio, nas concentrações superiores a 4 mM. Para avaliar mais profundamente esta provável ação citotóxica da MLT, o ensaio foi repetido com exposição prolongada (24 horas) à droga.

Neste ensaio, foi observada uma inibição da proliferação celular de forma dependente da dose, tanto para a MLT quanto para o 1-heptanol (figura 11). O IC_{50} (concentração que inibiu em 50% a proliferação celular) encontrado para a MLT ficou em 2,3 mM e para o irritante severo em 1,4 mM. Através deste gráfico pode-se dizer que a MLT foi 1,6 vezes menos citotóxica que o irritante severo, 1-heptanol.

Alguns trabalhos têm mostrado o efeito antiproliferativo da MLT em células tumorais (Sze *et al.*, 1993). *In vitro* as dosagens requeridas para afetar o crescimento depende do tipo e do período de exposição ao composto celular (Carossino *et al.*, 1996). Por exemplo, em células de melanoma de hamster, doses fisiológicas e sub-fisiológicas (10^{-15} M, 10^{-12} M, 10^{-9} M) de MLT não produzem nenhum efeito, enquanto concentrações

milimolares reduzem o crescimento celular, e concentrações micromolares estimulam o crescimento. As respostas celulares para o crescimento dependem, também, da passagem celular. Carossino *et al.* (1996) verificaram que a MLT possui efeito antiproliferativo em fibroblastos de pele humana normal e de esclerodérmica, de forma dose-dependente, na faixa de concentração entre 0,03 mM e 2 mM. Este foi o único trabalho encontrado, no qual dissolveram a MLT em água, aquecendo a fase aquosa a 50°C durante a solubilização.

Nestes ensaios, foram utilizadas dosagens relativamente altas de MLT para tentar encontrar sua citotoxicidade, uma vez que se conseguiu solubilizá-la em soluções aquosas. A MLT é vendida nos USA em uma concentração máxima de 5 mg/comprimido. De acordo com Wei-Li *et al.* (1997), sua biodisponibilidade está em torno de 30%. Então, após ingestão de um comprimido contendo 5 mg do hormônio, o indivíduo terá por volta de 0,002 mM da droga em seu plasma sanguíneo, uma concentração muito abaixo do valor de IC₅₀ encontrado no ensaio de proliferação (2,3 mM). Por estes cálculos, seria necessário ingerir 5,3 g de MLT para obter uma concentração citotóxica na corrente sanguínea.

Tendo em vista os resultados obtidos das avaliações mutagênicas e citotóxicas da MLT em diferentes concentrações, deu-se início ao estudo sobre sua atividade antioxidante em soluções e em sistemas contendo células. Primeiramente, foram realizados ensaios em solução contendo o sistema oxidativo Fe⁺³/NTA/H₂O₂ na presença e na ausência de MLT (figura 12), e de sequestradores conhecidos de radicais hidroxila, como: manitol, glutathiona e trolox (curvas A, B e C da figura 13; respectivamente). A tabela 7 apresenta um resumo dos dados obtidos nos gráficos das figuras 12 e 13. Com base nos valores de IC₅₀ (concentração que reduziu em 50% a oxidação da desoxirribose), calculou-se a potência relativa para cada antioxidante, tendo como base o IC₅₀ do manitol. De acordo com a tabela 7, a MLT foi 10 vezes mais eficaz que a glutathiona, e 200 vezes mais eficaz que o manitol. Apenas o trolox (derivado hidrossolúvel da vitamina E) mostrou ser 15 vezes mais eficaz que a MLT neste ensaio.

O radical hidroxila é o radical mais tóxico encontrado nos organismos (Halliwell & Gutteridge, 1990). Esta espécie de radical livre inicia uma produção em cascata de espécies reativas de oxigênio, provocando danos irreparáveis sobre as biomoléculas como lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Ao contrário do radical ânion superóxido, o radical hidroxila

não pode ser detoxificado pela ação enzimática. É bem conhecido que alguns antioxidantes, como o ascorbato, promovem a formação de radical hidroxila na presença de metais (Peterkofsky & Prathers, 1977). Estes compostos exercem danos pro ou anti-oxidativo, dependendo das condições fisiológicas do organismo. Entretanto, os resultados obtidos por Poeggeler *et al.*, (1993) sugerem que a MLT não participa no ciclo redox, na geração de radicais hidroxila, não possuindo efeito pro-oxidante.

Certamente, as doses de MLT usadas neste ensaio em solução excedem as concentrações fisiológicas no sangue, e o nível intracelular de MLT não é conhecido. Mas, a dose ideal de MLT *in vivo* como um sequestrador de radicais livres, não pode ser determinada por este estudo, somente. Pode-se sugerir uma correlação através de estudos em células. Isto é óbvio, entretanto, que comparada a outros sequestradores de radicais hidroxila, glutationa e manitol, a MLT é certamente mais eficiente como antioxidante nestes estudos (tabela 7). Poeggeler *et al.* (1994) sugerem que o mecanismo de sequestro de radicais hidroxila da MLT é altamente específico e depende da estrutura química da molécula. Eles sugerem que a amina indólica participa do mecanismo de sequestro formando um radical cátion indólico intermediário, que sequestra o radical ânion superóxido, formando por fim N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (figura 4). De acordo com a tabela 7, o trolox foi 15 vezes mais eficaz que a MLT no sequestro de radicais hidroxil, neste ensaio. O mecanismo de “scavenger” do trolox ocorre no radical hidroxila do anel aromático, formando um radical aniônico através da doação de um átomo de hidrogênio. O trolox pode estar evidenciando maior eficácia devido ao mecanismo de sequestro ser diferente. Para outros radicais, como o peroxila, ela também tem apresentado boa eficácia como antioxidante, sendo duas vezes mais efetiva que a vitamina E (Pieri *et al.*, 1994).

Já em sistemas contendo células, a MLT não mostrou ser tão eficiente no sequestro de radicais hidroxila. Por possuir lipofilicidade, a MLT permea a membrana plasmática, chegando até o núcleo das células de mamíferos (Menendez-Pelaez *et al.*, 1993a; Menendez-Pelaez *et al.*, 1993b). Por esta característica, a MLT pode proteger as células contra danos causados por EROs nas organelas, inclusive nos núcleos. Neste trabalho, foi observada uma proteção parcial (50 ± 7%) da MLT (somente na concentração de 0,001 mM) contra a inibição da proliferação celular, induzida por H₂O₂.

O método de proliferação é extremamente sensível a pequenas variações no metabolismo celular. Uma vez que o H_2O_2 atravessa livremente a membrana celular induzindo danos no DNA (Hoffmann & Meneghini, 1979) e em proteínas (Gabai *et al.*, 1994), é provável que a inibição da proliferação celular resulte da inibição da replicação do DNA em virtude da presença de danos nessa molécula, ou da inibição de enzimas e fatores envolvidos no processo de replicação ou no controle do ciclo celular. Assim, a MLT deve estar atuando como antioxidante em alguns desses processos, diretamente como sequestrador de radicais livres, ou impedindo a formação de danos no DNA e/ou proteínas. Além disso, por ser capaz de estimular a atividade da glutathione peroxidase (Pablos *et al.* 1995; Hara *et al.*, 1996), a MLT pode ainda estar atuando indiretamente na melhoria do sistema de defesa celular contra os radicais livres.

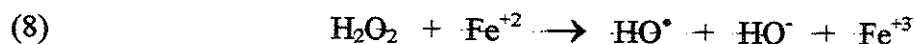
Estudou-se, então, a possibilidade da MLT estar atuando na proteção contra danos oxidativos sobre a membrana mitocondrial, através do método MTT. A figura 15 mostra que a MLT não protegeu as células contra a inibição da viabilidade celular, induzida pelo H_2O_2 (2,5 mM). Uma vez que este hormônio mostrou ser um bom sequestrador de radicais peroxila em solução (Pieri *et al.*, 1994), sua proteção contra danos causados pelo hidroperóxido de cumeno (HPC) também foi avaliada. Novamente, não foi observada nenhuma proteção contra a inibição da redução do MTT (figura 16). Neste método, o dano oxidativo é observado através da reação dos oxidantes diretamente sobre a enzima succinato desidrogenase mitocondrial, ou indiretamente pela formação de radicais hidroxila (pelo H_2O_2) ou peroxila (pelo HPC). Entretanto, o antioxidante hidrossolúvel padrão, a tiourea (10 mM), protegeu eficazmente a enzima mitocondrial contra os danos causados pelos dois oxidantes (figura 15 e 16).

Dada a permeabilidade da membrana para a MLT, e sua capacidade de sequestrar tanto radicais hidroxila como peroxila, a ausência de proteção observada no ensaio do MTT sugere que a inativação da enzima pode estar sendo causada por reações de oxidação direta da proteína pelos peróxidos H_2O_2 ou HPC, e não via radicais livres. Entretanto, estudos mostram que a MLT protege, direta ou indiretamente, a enzima succinato desidrogenase mitocondrial contra danos oxidativos causados por outros oxidantes, como peroxinitrito em macrófagos (Gilard *et al.*, 1997), e oxigênio singlete em células neurais (Cagnoli *et al.*, 1995).

Por outro lado, ela pode estar protegendo outros alvos, tais como a membrana celular. Por ser lipossolúvel, pode ser que a maior parte do hormônio esteja situado na membrana. Assim, a proteção observada contra a inibição da proliferação celular pode estar ocorrendo na membrana citoplasmática. Daniels *et al.* (1996) mostraram esta maior afinidade, comparando a eficácia em sequestrar radicais livres entre a serotonina (hidrossolúvel) e a MLT.

Os componentes fosfolípidicos da membrana celular são altamente vulneráveis a danos oxidativos pela susceptibilidade de seus ácidos graxos poliinsaturados de sofrerem peroxidação. Isto pode levar a modificação nas características de fluidez e permeabilidade da membrana (Urano *et al.* 1988). Peroxidação lipídica pode ser iniciada por um radical livre capaz de extrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno reativo do ácido graxo insaturado (revisado por Porter *et al.*, 1995).

As células vermelhas do sangue são particularmente susceptíveis aos danos oxidativos devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana, e da alta concentração de oxigênio e hemoglobina (Clemens & Waller, 1987). Em condições normais, as células vermelhas do sangue são continuamente expostas internamente e externamente às EROs. Nestas células, é estimado que mais que 3% de Hb-Fe⁺² é convertido a Hb-Fe⁺³ (metHb), com a produção concomitante de radicais ânion superóxido (Minetti *et al.*, 1993). Entretanto, estes danos são prevenidos por um sistema antioxidante, que consiste em um número de compostos antioxidante e enzimas. Durante um estresse oxidativo, os radicais peroxilas de lipídios são formados após uma ataque de radicais na membrana lipídica, e convertidos a lipoperóxidos pela ação da vitamina E. Na presença de H₂O₂ e ions ferro, a reação de lipoperoxidação é aumentada, devido à formação de radicais hidroxila (HO[•]), pela reação de Fenton (Gutteridge, 1994), os quais são iniciadores da lipoperoxidação (8).



No presente trabalho, a peroxidação lipídica foi determinada através da reação do TBA com os produtos da degradação oxidativa dos lipídeos da membrana celular, induzida por H₂O₂. A figura 17 mostra uma curva dose-resposta relativa ao H₂O₂, de 4 indivíduos diferentes. Estas variações na sensibilidade ao H₂O₂ está relacionada às condições

individuais de cada doador, que podem interferir diretamente na composição de ácidos graxos insaturados da membrana, como também na composição de antioxidantes endógenos. O indivíduo A foi escolhido para avaliar a proteção da MLT contra a peroxidação lipídica, por mostrar ser mais susceptível aos danos oxidativos causados pelo H₂O₂.

A concentração de 5 mM de H₂O₂ foi usada em uma suspensão de células vermelhas com concentração equivalente de 0,5 mM de hemoglobina, correspondendo a uma relação H₂O₂:Hb de 10. Nestas circunstâncias, a oxidação do Fe⁺² da hemoglobina resulta na formação de ferrilhemoglobina, ou ferrilHb (Giulivi & Davies, 1990). A entrada de H₂O₂ na célula procede muito rapidamente e gera radicais ferrilHb (no qual o radical está localizado na globina), ou radical hidroxila, que reage diretamente com qualquer composto à sua vizinhança (Winterbourn, 1990). A figura 18 mostra que a MLT protegeu a membrana dos eritrócitos contra a peroxidação lipídica, induzida pelo H₂O₂ (5 mM). O gráfico mostra, também, que, na concentração mais elevada de MLT (3 mM), obteve-se uma inibição máxima de 43%, maior que aquela produzida por 10 mM de tiourea (31%). Estes resultados sugerem que a MLT é um eficiente protetor de danos oxidativos em membrana celular, provavelmente pela sua capacidade de se inserir na membrana e sequestrar os radicais livres iniciadores e propagadores da peroxidação lipídica.

Entretanto, se a MLT pode funcionar como um antioxidante *in vivo*, protegendo o indivíduo contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres é uma questão ainda em discussão. Nossos dados mostram que a MLT possui ação antioxidante em concentração de μM a mM; porém, a concentração plasmática da indolamina se encontra na faixa de pM (Tan *et al.*, 1994; Carossino, *et al.*, 1996). Dúvidas existem com relação à concentração plasmática da MLT em indivíduos sob tratamento (Wei-Li Di *et al.*, 1997), uma vez que é rapidamente metabolizada no fígado. Estudos adicionais se tornam necessários para se avaliar a concentração efetiva do hormônio como um antioxidante *in vivo*.

CONCLUSÕES

1) O processo de solubilização e estocagem não alteraram a estrutura da molécula de MLT, facilitando sua utilização em sistemas biológicos em concentrações farmacológicas (figuras 5, 6 e 7).

2) A MLT não apresentou efeito mutagênico para as linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA100 e TA102), na presença ou na ausência de ativação metabólica, durante o teste de Ames (tabela 4, 5 e 6).

3) A MLT exibiu uma curva dose-dependente na proteção contra a mutação induzida pelo H₂O₂ (figura 8), inibindo completamente o efeito do oxidante na concentração de 232 µg/placa.

4) A MLT não inibiu a atividade mitocondrial de redução do MTT numa ampla faixa de concentração testada (0,0001 a 1 mM), indicando que ela é atóxica para fibroblastos V79 (figura 9).

5) A MLT não produziu alteração significativa da proliferação celular de fibroblastos V79, em concentrações entre 0,01 a 5 mM, após curta exposição (figura 10). Entretanto, após exposição prolongada das células, a MLT apresentou citotoxicidade de forma dose-dependente (figura 11).

5) A MLT mostrou ser um eficiente antioxidante em sistema livre de células, inibindo a oxidação degradativa da desoxirribose, induzido pelo sistema H₂O₂/Fe⁺³/NTA (figura 12), em baixas concentrações (IC = 0,015 mM).

6) A MLT, a 0,001 mM, protegeu parcialmente (50 ± 7%) os fibroblastos V79 contra a inibição da proliferação celular induzida pelo H₂O₂ (figura 14).

7) A MLT, até 1 mM, não foi hábil para proteger fibroblastos V79 contra o dano mitocondrial induzido pelo H_2O_2 e HPC, como medida pela redução do MTT (figuras 15 e 16).

8) A MLT produziu um efeito protetor significativo sobre a peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, induzida por H_2O_2 (5 mM), nas concentrações entre 0,3 e 3 mM, de forma dose-dependente (figura 18).

SUMMARY

The melatonin, hormone produced by the pineal gland, presents a great interest at the present time due to the demonstration of its antioxidant action as *in vitro* as *in vivo*. In this work, the potential of toxicological risk of the melatonin was investigated in bacterias and in mammal cells, and its antioxidant activity was examined in cell free systems, in human fibroblast V79 and in erythrocyte.

The mutagenicity of the melatonin was determined by Ames Test, in the presence and in the absence of metabolic activation (S9-fraction), in the strains of *Salmonella typhimurium* TA97, TA100 and TA102. The exposition of cultures by 30 minutes, to different melatonin concentrations (29 to 1,160 µg/plate) didn't induce any significant increase of the number of reverted colonies, after 48 hours of cultivation, so much in the presence as in the absence of metabolic activation. The melatonin also showed, a dose-dependent reversion (29 to 232 µg/plate) of the mutagenics effects caused by the hydrogen peroxide (0.5 mM), in the TA102 strain. The cytotoxic activity of the melatonin to V79 Chinese hamster fibroblasts was determined by the measure of its effects on proliferation. The melatonin didn't change the cellular viability measured by the reduction of MTT, in the concentration range from 0.0001 to 1 mM. The exposition of the cells for 30 minutes to different melatonin concentrations (0.01 – 5 mM) didn't cause significant inhibition of the cellular growth, in the period of subsequent 24 hours of treatment.

However, the exposition of the cells for 24 hours to increasing melatonin concentrations between 0.5 and 5 mM, caused significant inhibition in the cellular growth, in dependent way of the dose. The melatonin showed to be a highly efficient antioxidant in solution, inhibiting the degradative oxidation of the deoxyribose, induced by the system $H_2O_2/Fe^{3+}/NTA$, in a dependent way to the dose. This hormone was more than 10 times efficient than the glutathione and 200 times more efficient than the manitol, when scaveng the hydroxil radical. Even so, the trolox was more than 15 times effective than the melatonin. However, when evaluating cellular growth in fibroblasts V79, the melatonin just showed a partial protection ($50 \pm 7\%$) of the inhibition effect induced by H_2O_2 (50 µM), in low concentration (0.001 mM). However, the melatonin up to 1mM didn't protect the mitochondrial membrane of fibroblasts V79 against the attacks of the hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide (2.5 mM), as demonstrated by the absence of protection related

to the inhibition of the MTT reduction induced by these oxidizers. Yet in human erythrocytes, it showed to be an efficient antioxidant against lipid peroxidation, induced in the membrane by hydrogen peroxide (5 mM), presenting a dose-dependent protecting effect.

These results indicate that melatonin is not mutagenic; besides, it inhibits mutations induced by H_2O_2 . The analysis of melatonin toxicity through the cells V79 showed that melatonin is cytotoxic, only when it is present in high concentrations, for a long time. Melatonin showed to be an efficient antioxidant in a cell free system, but in cultures of fibroblasts V79 it showed just a partial protection against the effects of H_2O_2 . However, in erythrocytes, it showed an efficient protection against membrane injuries caused by this oxidant.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; PABLOS, M. I.; MENENDEZ-PELAEZ, A. et al.
Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Commun.Chem. Pathol. Pharmacol.*, v. 82, p. 253-256, 1993.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; PABLOS, M. I.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; et al.
Characterization of high-affinity melatonin bindings sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal. Res.*, v. 16, p. 100-113, 1994.
- AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/Mammalian Microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 31, p. 347-364, 1975.
- BALDWIN, W. S.; BARRETT.; J. C. Melatonin attenuates hydrogen peroxide toxicity in MCF7 cells only at pharmacological concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 250, p. 602-605, 1998.
- BARCHAS, J.; DaCOSTA, F.; SPECTOR, S. Acute pharmacology of melatonin. *Nature*, v. 214, p. 919-920, 1967.
- BENITEZ-KING, G.; ANTON-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, v. 49, p. 635-641, 1993.
- BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxic. in Vitro*, v. 2, p. 1-6, 1988.
- BRAINARD, G. C.; PETTERBORG, L. J.; RICHARDSON, B. A.; REITER, R. J. Pineal melatonin in Syrian hamster: Circadian and seansonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology*, v. 35, p. c342-348, 1982.
- BREEN, A. P., MURPHY, J. A. Ractions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 18, p. 1033-1077, 1995.

- BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide in human skin: current status and future prospects. *J. Invest. Dermatol.*, v. 110, p. 1-7, 1998.
- BURDON, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad. Biol. Med.*, v 18, p. 775-794, 1995.
- CAGNOLI, C. M.; ATABAY, C.; KHARLAMOVA, E.; MANEV, H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal. Res.*, v.18, p 222-226, 1995.
- CAO, G.; CUTLER, T. G. Protein oxidation and aging. *Arch Biochem. Biophys.*, v. 320, p. 106-114, 1995.
- CAPUCCI, M. S.; HOFFMANN, M. E.; De GROOT, A.; NATARAJAN, A. T. Streptozotocin-induced toxicity in CHO-9 and V79 cells. *Environ. Mol. Mut.*, v. 26, p. 72-78, 1995.
- CAROLEO, M. C.; DORIA, G.; NISTICÒ, G. Melatonin restores immunodepression in aged and cyclophosphamide-treated mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 343-352, 1994.
- CAROSSINO, A. M.; LOMBARDI, A.; MATUCCI-CERINIC, M.; PIGNONE, A.; CAGNONI, M. Effect of melatonin on normal and sclerodermic skin fibroblast proliferation. *Clin Exp Rheumatol.*, v. 14, p. 493-498, 1996.
- CERVINKA, M.; PUZA, V.; HROCH, M.; CERVINKOVA, Z. *In vitro* cytotoxicity testing of metal alloys used in medicine: comparison of different approaches. *Toxic. in Vitro*, v. 8, p. 783-785, 1994.
- CHUNG, M. H.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; YU, B. P. Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 12, p. 523-525, 1992.

- CLEMEDSON, C.; McFARLANE-ABDULLA, E.; ANDERSON, M. et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part I Methodology of 68 in vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. *Atla*, v. 24, p. 251-256, 1996.
- CLEMENS, M. R.; WALLER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem. Phys. Lipids*, v. 45, p. 251-268, 1987.
- COHEN, M. R.; JOSIMOVICH, J. and BRZEZINSKI, A. Melatonin: from contraception to breast cancer prevention. Potomac, Maryland. Sheba Press, 1995.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, R. J. Introdução a métodos cromatográficos. 7 ed. Campinas. Editora da Unicamp, 1997.
- COSTA, E. J. X.; LOPES, R. H., LAMY-FREUND, M. T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.*, v. 19, p. 123-126, 1995.
- COTTON, M.L.; DUNFORD, H.B. Studies on horseradish peroxidase XI. On the nature of compounds I and II as determined from kinetics of the oxidation of ferrocyanide. *Can. J. Chem.*, v. 51, p. 582-587, 1973.
- CRAWFORD, D.; ABINDEN, I.; AMSTAD, P.; CERUTTI, P. Oxidant stress induces the protooncogenes *c-fos* and *c-myc* in mouse epidermal cells. *Oncogene*, v. 3, p. 27-32, 1988.
- CUTLER, R. G. Antioxidante and aging. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, Suppl. 1, p. 373S-379S, 1991.
- DANIELS, W. M. U.; RENSBURG, S. J. van; ZYL, J. M. van et al. Free radical scavenging effects of melatonin and serotonin: possible mechanism. *NeuroReport*, v. 7, p. 1593-1596, 1996.

- DAS, U. N. Melatonin: Is it a endogenous anti-mutegenic, oncostatic and anti-ageing molecule? *Med. Sci. Res.*, v. 22, p. 464-466, 1994.
- DONNELLY, T.; DECKER, D.; STEMP, M.; RHEINS, L.; LOGEMANN, P. A three-dimensional *in vitro* model for the study of ocular cytotoxicity and irritancy. *Toxic in Vitro*, v. 8, p. 631-633. 1994.
- EMERIT, I. Reactive oxygen species, chromossome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 16, p. 99-109, 1994.
- GABAI, V. L.; KABAKOV, A. E. Introduction of heat-shock protein synthesis and thermotolerance in EL-4 ascites tumor cells by transient ATP depletion after ischemic stress. *Exp. Mol. Pathol.*,v. 60, p. 88-99, 1994.
- GETTINGS, S. D.; LORDO, R. A.; HINTZE, K. L. et al. The CTFA Evaluation of Alternatives Program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) Surfactant-based formulations. *Fd. Chem. Toxic*, v. 34, p. 79-117, 1996.
- GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. A. A novel antioxidant role for hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 19453-19460, 1990. GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. A. A novel antioxidant role for hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 19453-19460, 1990.
- GREEN, M. J.; HILL, H. A. O. Chemistry of dioxygen. *Meth. Enzimol.*, v. 105, p. 3-22, 1984.
- GUARDIOLA-LEMAITRE, B. Toxicology of melatonin. *J. Biol. Rhythms*, v. 12, p. 697-706, 1997.
- GUTTERIDGE, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact.*, v. 91, p. 133-140, 1994.

- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The deoxyribose assay: an assay both for "free" hydroxyl radical and site-specific hydroxyl radical production. *Biochem J.*, v. 253, p. 931-933, 1988.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Formation of thiobarbituric acid - reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS letters*, v. 128, p. 347-352, 1981.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen is poisonous: an introduction to oxygen toxicity and free radicals. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Edition. Oxford. Clarendon Press., 1989a. p. 1-21.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Edition. Oxford. Clarendon Press, 1989b. p 22-85.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Edition. Oxford. Clarendon Press, 1989c. p 86-187.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Edition. Oxford. Clarendon Press, 1989d. p 188-276.
- HARA, M.; ABE, M.; SUZUKI, T. et al. Tissue Changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 78, p. 308-312, 1996.
- HARMAN, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 7124-7128, 1981.
- HARMAN, D. Free radical theory of aging. *Mutat. Res.*, v. 275, p. 257-260, 1992.

- HENDEN, T.; STOKKAN, K. A.; REITER, R. J. et al. The age-associated reduction in pineal β -adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. *Biol. Signals*, v. 1, p. 34-39, 1992.
- HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Action of hydrogen peroxide on human fibroblasts in culture. *Photochem. Photobiol.*, v. 30, p. 151-155, 1979.
- HUETHER, G. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 146-158, 1994.
- HUMBERT, W.; PEVET, P. The decrease of pineal melatonin production with age. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 43-63, 1994.
- JANKOVIC, B. D.; KNEZEVIC, Z.; KOJIC, L. et al. Pineal gland and immune system. Immune functions in the chick embryo pinealectomized ant 96 hours of incubation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 398-409, 1994.
- JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J. et al. Vogel, análise química quantitativa. Métodos Espectrofotométricos. 5ª. edição. R. J. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1992. p. 519-542.
- KASAI, H.; CRAIN, P. F.; KUCHINO, Y. et al. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, v.7, p. 1849-1851, 1986.
- KASS, G. E. N.; DUDDY, S.; ORRENIUS, S. Activation of protein kinase C by redox-cycling quinones. *Biochem. J.*, v. 260, p. 499-507, 1989.
- KOSUGI, H.; KIKUGAWA, K. Potential thiobarbituric acid-reactive substances in peroxidized lipids. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 7, p. 205-207, 1989.

- LESNIKOV, V. A.; PIERPAOLI, W. Pineal cross-transplantation (old-to-young and vice-versa) as evidence for an endogenous "aging clock". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 456-460, 1994.
- LEVIN, D. E.; HOLLSTEIN, M.; CHRISTMAN, M. F et al. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A•T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 7445-7449, 1982.
- MARION, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MELCHIORRI, D.; REITER, R. J.; SEWERYNEK, E.; et al. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *Faseb J.*, v. 9, p. 1205-1210, 1995.
- MENENDEZ-PELAEZ, A.; POEGGELER, B.; REITER, R. J. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell. Biochem.*, v. 53, p. 373-382, 1993a.
- MENENDEZ-PELAEZ, A.; POEGGELER, B.; REITER, R. J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.*, v. 15, p. 59-69, 1993b.
- MINETTI, M.; MALLOZZI, C.; SCORZA, G. et al. Role of oxygen and carbon radicals in hemoglobin oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 302, p. 233-244, 1993.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUSATOV, S. A.; ANISIMOV, V. N.; ANDRÉ, V. et al. Modulatory effects of melatonin on genotoxic response of reference mutagens in the Ames test and the comet assay. *Mutat. Res.*, v. 417, p. 75-84, 1998.

NEVILLE, S.; ARENDT, J.; IOANNIDES, C. A study of the mutagenicity of melatonin and 6-hydroxymelatonin. *J. Pineal Res.*, v. 6, p. 73-76, 1989.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Hormones. 2nd Edition. San Diego. Academic Press, 1997. p.485-495.

PABLOS, M. I.; AGAPITO, M. T.; GUTIERREZ, R. et al. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J. Pineal Res.*, v. 19, p. 111-115, 1995.

PEREIRA, A. L.; TORSONI, M. A.; OGO, S. H. The antioxidant effect of rutin and morin on the hemoglobin oxidation and lipid peroxidation of erythrocytes. 1998.

PETERKOFISKY, B.; PRATHER, W. Cytotoxicity of ascorbate and other reducing agents towards cultured fibroblasts as a result of hydrogen peroxide formation. *J. Cell. Phys.*, v. 90, p. 61-70, 1977.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F. et al. Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.*, v. 55, p. PL 271-276, 1994.

POEGGELER, B. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*, v. 78, p. 268-269, 1991.

POEGGELER, B.; REITER, R. J.; TAN, D. X. et al. Melatonin hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J. Pineal. Res.*, v. 14, p. 151-168, 1993.

POEGGELER, B.; SAARELA, S.; REITER, R. J. et al. Melatonin a high potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 419-420, 1994.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, v. 30, p. 277-290, 1995.

- POUCHERT, C. J. The Aldrich Library of Infrared Spectra. 3th Edition. Wisconsin. Aldrich Chemical Company, Inc., 1981. p. 1260.
- REITER, R. J. Action spectra, dose-reponse relationships, and temporal aspects of light's effects on the pineal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 453, p. 215-230, 1985.
- REITER, R. J. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.*, v. 30, p. 199-212, 1995.
- REITER, R. J.; MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E. et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, v. 18, p. 1-11, 1995.
- REITER, R. J.; ROBINSON, J. Melatonina. Rio de Janeiro. Distribuidora Record de Serviços de Imprensa S. A., 1996. p 25-37.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; POEGGELER, B. et al. Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 719, p. 1-11, 1994.
- REITER, R. J.; CARNEIRO, R. C. Melatonin in relation to cellular antioxidant defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.*, v. 29, p. 363-372, 1997.
- SHIDA, C. S.; CASTRUCCI, A. M. L.; LAMY-FREUD, M. T. High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal. Res.*, v. 16, p. 198-201, 1994.
- SHOPSIS, C.; SATHE, S. Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test: correlations with the Draize test. *Toxicology*, v. 29, p. 195-206, 1984.
- SLATER, T. F.; BLOCK, G. E. Antioxidant vitamins and β -carotene in disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 53, Suppl. 1, p. 189S-396S, 1991.

- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Espectrofotometria no ultravioleta. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 3ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Dois S.A., 1979 a. p. 203-223.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Espectrofotometria no ultravioleta. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 3ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Dois S.A., 1979 b. p. 65-140.
- SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E.; HOFFMANN, M. E. Mechanism of tetrahydroxy-1,4-quinone cytotoxicity: Involvement of Ca^{+2} and H_2O_2 in the impairment of DNA replication and mitochondrial function. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 20, p. 657-666, 1996.
- STANKOV, B.; REITER, R. J. Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses. *Life Sci.*, v. 46, p. 971-982, 1990.
- STOCKS, J.; DORMANDY, T. L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br. J. Haematol*, v. 20, p. 95-111, 1971.
- SZE, S. F.; NG, T. B.; LIU, W. K. Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. *J. Pineal Res.*, v. 14, p. 27-33, 1993.
- TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L. C. et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.*, v. 1, p. 57-60, 1993.
- TAN, D. X.; REITER, R. L.; CHEN, L. D. et al. Both physiological and pharmacological levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *J. Endocrinol.*, v. 90, p. 367-375, 1994.
- THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 10th Edition. Merck & Co., Inc., 1983.

- URANO, S.; YANO, K.; MATSUDO, M. Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α -tocopherol and its model compounds on the fluidity of lecitin liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 150, p. 469-475, 1988.
- VIJAYALAXMI; REITER, R. J.; LEAL, B. Z. et al. Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 351, p. 187-192, 1996.
- WARD, J. F.; BLAKELY, W. F.; JONER, E. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Rad. Res.*, v. 103, p. 383-392, 1985.
- WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.*, v. 238, p. 57-85, 1990.
- WEI-LI DI, M. D.; KADVA, A.; JOHNSTON, A. et al. Variable bioavailability of oral melatonin. *N. Engl. J. Med.*; p. 1028-1029, 1997.
- WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.*, v. 186, p. 265-272, 1990.

COMUNICAÇÕES
CIENTÍFICAS

Fanan, S.; Ckless, K. S.; Fonseca, M. B.; Henriques, J. A. P.; Hoffmann, M. E. "*Avaliação da ação citotóxica e mutagênica da melatonina*". Trabalho apresentado no 43° Congresso Nacional de Genética, realizado de 13 a 16 de agosto de 1997, na cidade de Goiânia - GO - Brasil.

Hoffmann, M. E. "*Atividade antioxidante e potencial de risco toxicológico da melatonina*". Palestra apresentada no Simpósio "Radicais Livres, Antioxidantes e Envelhecimento" - 43° Congresso Nacional de Genética, realizado de 13 a 16 de agosto de 1997, na cidade de Goiânia - GO - Brasil.

Hoffmann, M. E. "*Avaliação da atividade antioxidante e do potencial de risco da melatonina*". Palestra apresentada na mesa redonda "Aplicação em Biologia e Medicina II", no I Encontro Científico da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares e II Encontro de Biofísica e Biometria do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - R. J. - 1997. Resumo p. 221.

Fanan, S.; Picada, J. N.; Ckless, K.; Henriques, J. A. and Hoffmann, M. E. "*Evaluation of antimutagenic and antioxidant activities of melatonin*". Trabalho apresentado no 5° Congresso Latino-Americano de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, realizado de 15 a 20 de novembro de 1998, na cidade de Curitiba -PR - Brasil.