



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA MELATONINA:
INIBIÇÃO DE ENZIMAS PRÓ-OXIDANTES E AÇÃO
CONTRA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Adriana Teixeira

Departamento de Ciências Farmacêuticas – CIF - UFSC

Julho, 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA MELATONINA:
INIBIÇÃO DE ENZIMAS PRÓ-OXIDANTES E AÇÃO
CONTRA A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Neurociências e Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Adriana Teixeira

Departamento de Ciências Farmacêuticas – CIF - UFSC

Julho, 2003

AGRADECIMENTOS

À DEUS que me concedeu o Dom da Vida, pois sem ele estaria impossibilitada de ver, falar, escrever, andar e principalmente sentir Fé. Fé que alegra os corações e nos faz caminhar seguramente para alcançar nossos objetivos.

À Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pela sua orientação e oportunidade para o início da minha vida científica que foram imprescindíveis para a minha formação. Seu caráter profissional e sua seriedade sevirão de exemplo para minha carreira futura.

À Carla Cristina Thober Charão, pelo ensino e amizade nas horas difíceis, onde nunca esquecerei de sua palavra amiga para continuar e renovar os ânimos.

Aos professores e coordenação da Pós-Graduação em Neurociência pela compreensão e oportunidade para a realização deste trabalho. Em especial, à profa. Dra Mariana pela ajuda na localização neuroanatômica das estruturas e à profa. Dra Carla pela atenção, simpatia e também por aceitarem fazer parte da minha banca.

À profa. Dra Yara, coordenadora da Pós Graduação em Neurociências, pelo seu interesse em melhorar o desempenho de nosso curso e apoiar o avanço da pesquisa científica viabilizando recursos para que o aluno possa participar de congressos.

Ao prof. Dr Carlos Alexandre Netto, pela sua atenção e por aceitar participar da minha banca.

Ao Nivaldo, secretário da Pós Graduação em Neurociências, pela sua paciência, dedicação e interesse em ajudar os alunos.

Meus agradecimentos para todos os colegas e amigos do laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, Csele, Daniela, Heloísa, Juliana, Rober e Tiago pelos bons momentos de convivência e alegria que passamos juntos. Em especial à Clarissa que muito colaborou na realização deste trabalho. Aos colegas Marcos Paulo e Vânia pela troca de conhecimentos e apoio dispendido neste trabalho. Ao Marlon pelo ensinamento de informática e bons momentos de descontração. À amiga Ilana pela sua preocupação, dedicação, apoio nas horas necessárias e risadas para afastar o estresse.

Às colegas Cláudia, Michela, Patrícia, Isabel e Silvia do curso de Pós-graduação em Neurociência pela colaboração que contribuíram para engrandecer minha formação.

À Renata Souza Agostinho Costa e Daniela B. Balz do curso de doutorado em Farmacologia pela amizade, companheirismo, descontração e esclarecimento de dúvidas que ajudaram engrandecer meus conhecimentos.

Aos inúmeros amigos e colegas aqui não mencionados que muito contribuíram, de uma maneira ou outra, para a realização deste sonho.

Ao meu irmão Walter R. Teixeira Júnior pelos bons momentos de descontração.

Ao meu irmão Herlon Teixeira, juntamente com minha cunhada Carina e minha sobrinha Roberta pela confiança, apoio e alegria proporcionado nas horas difíceis.

À minha irmã Anna Maria Teixeira pelo empréstimo de seu computador para ajudar na realização deste trabalho.

Ao meu pai, Walter R. Teixeira pela confiança no meu desempenho.

À minha mãe Rosita dos Santos Teixeira, pelo apoio, dedicação e ajuda para poder alcançar meus objetivos.

Aos pais do Júnior, Lúcia e Osvaldo, pelo carinho e amor dedicado.

Ao meu marido Júnior (Manoel O. Mello Jr), pela paciência, pelo incansável apoio e principalmente pelo amor durante este longo caminho percorrido. Dedico esta conquista à você, pois consegui chegar até aqui.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ESQUEMAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE EQUAÇÕES	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico.....	1
1.2. Melatonina.....	2
1.2.1. Biossíntese.....	5
1.2.2. Fonte Endógena e Exógena.....	8
1.2.3. Propriedades Fisiológicas e Farmacológicas.....	11
1.2.4. Conseqüências Fisiopatológicas do Declínio.....	12
1.3. Espécies Reativas e Melatonina.....	13
1.4. Antioxidantes e Melatonina.....	24
1.5. Patologias e Melatonina.....	26
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
3. JUSTIFICATIVA	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Reagentes.....	33
4.1.1. Reagentes da Sigma.....	33

4.1.2. Reagentes da Merck.....	33
4.1.3. Reagentes de Outras Marcas.....	34
4.2. Animais Utilizados.....	34
4.3. Preparação de Melatonina.....	35
4.4. Preparação de Lipossomas.....	35
4.5. Preparação de Microsomas.....	36
4.6. Preparação do Homogeneizado de Cérebro.....	37
4.7. Preparação do Homogeneizado de Cerebelo.....	37
4.8. Preparação do Homogeneizado de Pulmão.....	38
4.9. Determinação da Concentração de Proteína.....	38
4.10. Preparação para a Síntese de Peroxinitrito.....	39
4.11. Análise da Ação Seqüestradora de Espécies Reativas da Melatonina.....	39
4.11.1. Monitoramento do Radical DPPH.....	39
4.11.2. Formação e Monitoramento do Radical Óxido Nítrico (NO•).....	40
4.11.3. Avaliação da Lipoperoxidação Induzida pelos Radicais Hidroxil (•OH) e Ascorbil (Asc•) em Lipossomas, Homogeneizado e Microsomas.....	40
4.11.4. Avaliação da Peroxidação Lipídica Induzida pelo Peroxinitrito (ONOO•).....	41
4.12. Análise da Ação da Melatonina sobre Enzimas Pró-oxidantes.....	42
4.12.1. Análise da Atividade da Xantina Oxidase (XO).....	42
4.12.2. Análise da Atividade da Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS).....	42
4.12.3. Análise da Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	43
4.13. Análise Estatística.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Análise da Ação da Melatonina Frente à Peroxidação Lipídica.....	48
5.2. Análise da Ação da Melatonina sobre Enzimas Pró-oxidantes.....	60
6. DISCUSSÃO.....	65
7..CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXO.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da melatonina sobre o radical livre DPPH.....	46
Figura 2. Efeito da melatonina sobre o radical óxido nítrico (NO [•]).....	47
Figura 3. Efeito da melatonina em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito.....	49
Figura 4. Efeito da melatonina em lipossomas de asolecitina de soja (ASO) sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito.....	51
Figura 5. Efeito da melatonina em microsomas de cérebro de ratos sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito.....	52
Figura 6. Efeito da melatonina em microsomas de fígado de ratos sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito.....	53
Figura 7. Efeito da melatonina em homogeneizado de cérebro de rato sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil, e ânion peroxinitrito.....	54
Figura 8. Comparação do efeito seqüestrador da melatonina sobre a peroxidação lipídica induzida pelo radical hidroxil em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina, microsomas de cérebro e fígado de ratos, e homogeneizado de cérebro de ratos.....	57
Figura 9. Comparação do efeito seqüestrador da melatonina sobre a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina, microsomas de cérebro e fígado de ratos, e homogeneizado de cérebro de ratos.....	58
Figura 10. Comparação do efeito seqüestrador da melatonina sobre a peroxidação lipídica induzida pelo ânion peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina, microsomas de cérebro e fígado de ratos, e homogeneizado de cérebro de ratos.....	59
Figura 11. Efeito da melatonina na atividade da enzima xantina oxidase (XO).....	60
Figura 12. Efeito da melatonina na atividade da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) presente em homogeneizado de cerebelo de rato.....	62
Figura 13. Efeito da melatonina na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) presente em pulmão de rato.....	63

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Localização da glândula pineal no cérebro.....	1
Esquema 2. Fórmula estrutural da melatonina.....	3
Esquema 3. Biossíntese da melatonina no pinealócito através da serotonina e N-acetilserotonina.....	5
Esquema 4. Síntese de melatonina pela glândula pineal de mamíferos evidenciada no ciclo 24h claro-escuro (dia-noite).....	7
Esquema 5. Nível de melatonina coletado no ciclo dia e noite em soro humano de diferentes idades.....	9
Esquema 6. Fórmula estrutural da indolamina representando pelo anel indólico, grupamento metoxi e grupamento amino (nitrogênio) que estão envolvidos na capacidade seqüestradora dessa molécula.....	17
Esquema 7. Esquema da melatonina seqüestrando tanto o peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e radical hidroxil ([•] OH), excretando respectivamente seus metabólicos N-acetil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e 3-hidroximelatoninacíclica (3-OHM) na urina.....	18
Esquema 8. Diagrama da síntese do radical óxido nítrico (NO [•]) através da oxidação da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e formação do ânion peroxinitrito. Além da geração do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e sua metabolização.....	22
Esquema 9. Produção do ácido hipocloroso (HOCl) pela enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos ativados.....	23
Esquema 10. Patologias relacionadas ao excesso de espécies reativas de oxigênio.....	29
Esquema 11. Esquema representativo da bicamada lipídica.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos Receptores de Melatonina segundo a União Internacional de Farmacologia (IUPHAR).	4
Tabela 2. Concentração de melatonina no sangue nas diferentes fases da vida, em homens chineses.....	8
Tabela 3. Concentração de melatonina em diferentes tipos de alimentos, referido a cada 1g de produto.....	11
Tabela 4. Principais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs).....	15
Tabela 5. Abreviaturas utilizadas nos gráficos.....	45
Tabela 6. Tabela comparativa do efeito da melatonina em diferentes membranas lipídicas, para avaliação dos parâmetros de lipoperoxidação induzida pelos $\cdot\text{OH}$, $\text{Asc}\cdot$ e ONOO	56

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Reação de Fenton.....	16
Equação 2. Reação de Haber-Weiss.....	16
Equação 3. Reação do NO^\bullet com o O_2 formando dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet).....	19
Equação 4. Reação do NO_2^\bullet com NO^\bullet formando trióxido de dinitrogênio (N_2O_3).....	19
Equação 5. Reação do NO_2^\bullet com outra molécula de NO_2^\bullet formando tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4).....	19
Equação 6. Reação do NO^\bullet com radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) formando o ânion peroxinitrito (ONOO^-).....	20
Equação 7. Dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela enzima superóxido dismutase (SOD), reduzindo-o enzimaticamente a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio(O_2).....	21
Equação 8. Formação do ácido hipocloroso (HOCl) através da reação do H_2O_2 e Cl^-	23
Equação 9. Reação do ácido hipocloroso com o superóxido formando o radical hidroxil.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

1. **Asc[·]** = radical ascorbil;
2. **CAT** = catalase;
3. **CO₂** = dióxido de carbono;
4. **DPPH[·]** = radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazina;
5. **EROs** = espécies reativas de oxigênio;
6. **ERNs** = espécies reativas de nitrogênio;
7. **EGTA** = ácido etilenoglicol-tetracético;
8. **FAD** = flavina adenina dinucleotídeo;
9. **FMN** = flavina mononucleotídeo;
10. **GPx** = glutationa peroxidase;
11. **GRd** = glutationa redutase;
12. **GSH** = glutationa reduzida;
13. **GSSG** = glutationa oxidada;
14. **GSTs** = glutationas S-transferases;
15. **G-6PDH** = glicose-6-fosfato desidrogenase;
16. **GMPc** = guanosina monofosfato cíclico;
17. **5-HTP** = 5-hidroxitriptofano descarboxilase;
18. **5-HT** = serotonina;
19. **HIOMT** = hidroxindol-O-metiltransferase;
20. **H₂O₂** = peróxido de hidrogênio;
21. **NAT** = serotonina-N-acetiltransferase;
22. **NADPH** = nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida;
23. **NMDA** = N-metil- D- aspartato;
24. **NOR** = noradrenalina;
25. **NSQ** = núcleo supraquiasmático;
26. **MPO** = mieloperoxidase;

27. **NOS** = óxido nítrico sintase;
28. **nNOS** = óxido nítrico sintase neuronal;
29. **eNOS** = óxido nítrico sintase endotelial;
30. **iNOS** = óxido nítrico sintase induzida;
31. **NO[·]** = radical óxido nítrico;
32. **NO₂⁻** = nitrito;
33. **NO₃⁻** = nitrato;
34. **ONOO⁻** = ânion peroxinitrito;
35. **·OH** = radical hidroxil;
36. **O₂** = oxigênio molecular;
37. **O₂^{·-}** = radical ânion superóxido;
38. **PVN** = núcleo paraventricular;
39. **TCA** = ácido tricloroacético;
40. **TBA** = ácido tiobarbitúrico;
41. **TBH₄** = tetrahidrobiopterina;
42. **TPH** = triptofano-5-hidroxilase;
43. **SOD** = superóxido dismutase;
44. **SCG** = gânglio cervical superior;
45. **XO** = xantina oxidase;

RESUMO

Foram investigadas as ações da melatonina contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ascorbil ($\text{Asc}\cdot$) e ânion peroxinitrito (ONOO^-) em diversos modelos de membranas, assim como seu efeito na atividade de enzimas pró-oxidantes como a xantina oxidase (XO), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e mieloperoxidase (MPO). Dentre as membranas testadas estão lipossomas de fosfatidilcolina (LipPC) e asolecitina (LipASO), microssomas de cérebro (MicC) e fígado (MicF) e homogeneizado de cérebro (HC) de ratos. Também foi avaliada a reatividade da melatonina com os radicais 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH) e óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$).

De fato, a melatonina preveniu a peroxidação lipídica, embora com potenciais diferentes, em todas as membranas lipídicas analisadas na seguinte ordem de eficiência: LipPC < MicF < MicC < LipASO < HC para $\cdot\text{OH}$, LipPC < MicC < HC < LipASO < MicF para $\text{Asc}\cdot$ e HC < MicF < LipASO < LipPC < MicC para ONOO^- .

As IC_{50} s de melatonina contra $\cdot\text{OH}$, $\text{Asc}\cdot$ e ONOO^- em LipPC foram $0,25 \pm 0,05$ mM; $0,28 \pm 0,02$ mM e $0,78 \pm 0,08$ mM; em LipASO $0,53 \pm 0,09$ mM; $1,20 \pm 0,03$ mM e $0,77 \pm 0,07$ mM, respectivamente. Já para os MicC e MicF de ratos as IC_{50} s foram $0,43 \pm 0,03$ mM e $0,30 \pm 0,03$ mM para $\cdot\text{OH}$, $0,90 \pm 0,03$ mM e $1,23 \pm 0,13$ mM para $\text{Asc}\cdot$, $0,93 \pm 0,05$ mM e $0,65 \pm 0,06$ mM para ONOO^- , respectivamente. Em HC as IC_{50} s foram $0,60 \pm 0,10$ mM para $\cdot\text{OH}$, $1,09 \pm 0,10$ mM para $\text{Asc}\cdot$ e $0,32 \pm 0,1$ mM para ONOO^- . Os $\text{K}_{0,5}$ determinados nos ensaios com XO, nNOS e MPO foram respectivamente $0,80 \pm 0,1$ mM, $2,0 \pm 0,1$ mM e $0,063 \pm 0,003$ mM. A melatonina demonstrou uma baixa reatividade com o radical DPPH e um fraco efeito seqüestrador de $\text{NO}\cdot$, não alcançando a IC_{50} com esses radicais.

Os resultados obtidos confirmam as propriedades antioxidantes da melatonina como seqüestradora de EROs e ERNs e como inibidora de enzimas pró-oxidantes. Baseados nessas observações e informações prévias sobre a atividade antioxidante desse neurohormônio, sugere-se que a melatonina possa ser utilizada adicionalmente aos tratamentos tradicionais de patologias severas, incluindo câncer, AIDS ou em procedimentos associados com estresse oxidativo tal como reperfusão no caso de transplante de órgãos.

ABSTRACT

We have investigated the action of melatonin against lipid peroxidation induced by the hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), ascorbyl ($\text{Asc}\cdot$) radicals and anion peroxyxynitrite (ONOO^-) in different models of membranes, as well as its effect on the activity of pro-oxidant enzymes such as xanthine oxidase (XO), constitutive neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and myeloperoxidase (MPO). Between the membranes tested are asolectin (ASO) and phosphatidylcholine (PC) liposomes, brain (MicB) and liver (MicL) microsomes and brain homogenate (BH) of rats. It was also investigated the reactivity of melatonin with 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) and nitrogen monoxide ($\text{NO}\cdot$) radicals.

In fact, melatonin prevented lipid peroxidation, although with different potencies, in all lipid membranes examined in this work in the following order of efficacy: $\text{PC} < \text{MicL} < \text{MicB} < \text{ASO} < \text{BH}$ for $\cdot\text{OH}$, $\text{PC} < \text{MicB} < \text{BH} < \text{ASO} < \text{MicL}$ for $\text{Asc}\cdot$ and $\text{BH} < \text{MicL} < \text{ASO} < \text{PC} < \text{MicB}$ for ONOO^- .

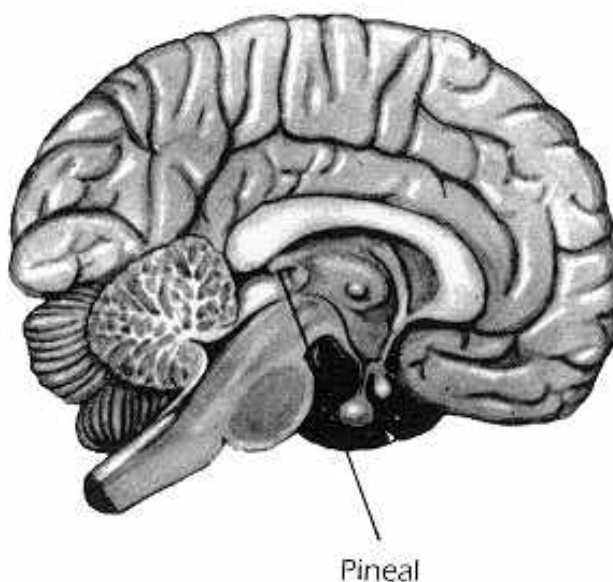
The IC_{50} s of melatonin against $\cdot\text{OH}$, $\text{Asc}\cdot$ radicals and ONOO^- in PC were 0.25 ± 0.05 mM; 0.28 ± 0.02 mM and 0.78 ± 0.08 mM; in ASO were 0.53 ± 0.09 mM; 1.20 ± 0.03 mM and 0.77 ± 0.07 mM, respectively. For MicB and MicL of rats the IC_{50} s were 0.43 ± 0.03 mM and 0.30 ± 0.03 mM for $\cdot\text{OH}$, 0.90 ± 0.03 mM and 1.23 ± 0.13 mM for $\text{Asc}\cdot$, 0.93 ± 0.05 mM and 0.65 ± 0.06 mM with ONOO^- , respectively. The IC_{50} s for BH were 0.60 ± 0.10 mM for $\cdot\text{OH}$, 1.09 ± 0.10 mM with $\text{Asc}\cdot$ and 0.32 ± 0.1 mM with ONOO^- . The $\text{K}_{0.5}$ determined in experiments with XO, cnNOS and MPO were respectively 0.80 ± 0.1 mM, 2.0 ± 0.1 mM and 0.063 ± 0.003 mM, respectively. Melatonin showed a low reactivity with DPPH radical and showed a weak effect as $\text{NO}\cdot$ scavenger.

The results observed confirmed the antioxidant properties of melatonin as a ROS and RNS scavenger and as an inhibitor of pro-oxidant enzymes. Based on our observations and previous reports about antioxidant activity of this hormone, we suggest that melatonin could be administered associated with the traditional treatments of several pathologies, including cancer, AIDS or in processes connected with oxidative stress such as organ reperfusion in the case of transplantation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A glândula pineal ou epífise é uma estrutura tímica, de formato piriforme, localizada na parte posterior, superior do diencéfalo no epítalamo (Esquema 1), que está envolvida na transdução de sinal da informação ambiental para o sistema neuroendócrino. A informação luminosa chega a pineal através de um circuito polisináptico que se inicia na retina e finaliza-se pela secreção da melatonina pelos pinealócitos (REITER, 1991-1998; ARENDT et al., 1999; LIEBMANN et al., 1997).



Esquema 1. Localização da glândula pineal no cérebro.

Esta substância (MELAS = escuro e TONEIN = secretora) foi isolada primeiramente na glândula pineal bovina, identificada por Lerner e colaboradores em 1958 (LERNER et al., 1958-1959; TAN et al., 2003).

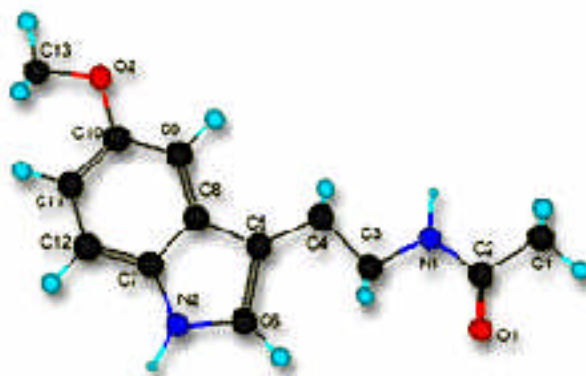
Embora os invertebrados não possuam glândula pineal, produzem melatonina pelos mesmos caminhos bioquímicos dos animais vertebrados que possuem esta glândula (peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos). A pineal funciona como um transdutor capaz de informar às partes internas do organismo sobre as condições de iluminação ambiental, ou seja, quando a pineal libera melatonina, informa ao organismo se está escuro. Dita como agente endócrino da escuridão, à noite a melatonina banha as células e tecidos fornecendo uma série de informações rítmicas, permitindo a diferenciação entre o dia e a noite (FERREIRA & MARKUS, 2001; LIEBMANN et al., 1997).

1.2. Melatonina

A melatonina, ou N-acetil-5-metoxitriptamina (Esquema 2), considerada como o principal hormônio produzido pela glândula pineal (Esquema 1) no nosso organismo. Além da pineal, a melatonina também pode ser secretada em menor quantidade pela retina, trato gastrointestinal e em resposta à quantidade e ao tipo de alimento que ingerimos; parece ser também secretada pelo intestino (REITER, 1991-1998; TAN et al., 2003).

A melatonina está relacionada de várias formas, com o ritmo circadiano e à regulação fisiológica do organismo, ajustando e mantendo o relógio biológico. Apresenta solubilidade *in vivo* em lipídios e água e *in vitro* em etanol absoluto e água. Seu peso molecular é de 232,28g e

sua fórmula molecular é $C_{13}H_{16}N_2O_2$ (REITER, 1991-1995-1998; SHIDA et al., 1994; TAN et al., 2002).



Esquema 2. Fórmula estrutural da melatonina (TAN et al., 2002).

Devido à sua lipofilicidade, a melatonina pode atuar sobre receptores de membrana ou diretamente no interior da célula interferindo com processos bioquímicos de grande relevância, penetrando facilmente em membranas biológicas, incluindo a placenta e a barreira hematoencefálica (SHIDA et al., 1994; COSTA et al., 1995; REITER, 1998, et al., 2000b).

Após a síntese da melatonina nos pinealócitos, esse neurohormônio é liberado imediatamente na corrente sanguínea, podendo agir pela ativação de receptores específicos acoplados à membrana e também por receptores nucleares e citosólicos (REITER, 1998; PACCHIEROTTI et al., 2001). Os sítios de ligação para a melatonina foram descritos a partir de ensaios com o análogo radioativo 2-[^{125}I] -iodomelatonina e estão presentes em diversas regiões do sistema nervoso central, em artérias cerebrais e em diversos tecidos periféricos, como as adrenais, órgãos linfóides primários e secundários, coração, glândulas mamárias, trato gastrointestinal, ducto deferente entre outros (REPERT et al., 1996; FERREIRA & MARKUS, 2001). Foram clonados três subtipos de receptores do tipo ML1 (Mel 1a, Mel 1b e Mel 1c), sendo que os receptores do subtipo Mel 1a estão presentes no núcleo supraquiasmático e na *pars tuberalis*

podendo estar relacionados aos efeitos reprodutivos e circadianos da melatonina. O receptor Mel 1b está envolvido no controle fotoperiódico de sensibilidade à luz na retina de mamíferos e aves. O subtipo Mel 1c foi descrito apenas em anfíbios, sendo o cDNA deste receptor o primeiro a ser clonado. Entretanto, estes receptores receberam uma nova nomenclatura recomendada pela União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) (REPPERT et al., 1996; FERREIRA & MARKUS, 2001). O receptor clonado Mel1b passa a ser chamado MT2, os receptores Mel 1a passam a MT1 e os do subtipo ML2 passam a ser denominados MT3. Em suma, os receptores de melatonina são encontrados no SNC, principalmente no núcleo supraquiasmático (NQS) do hipotálamo anterior (supra-óptico), núcleo paraventricular e retina, caracterizados em três grupos distintos, conforme mostrado na Tabela 1 (YU et al., 2000; KOOP et al., 2000).

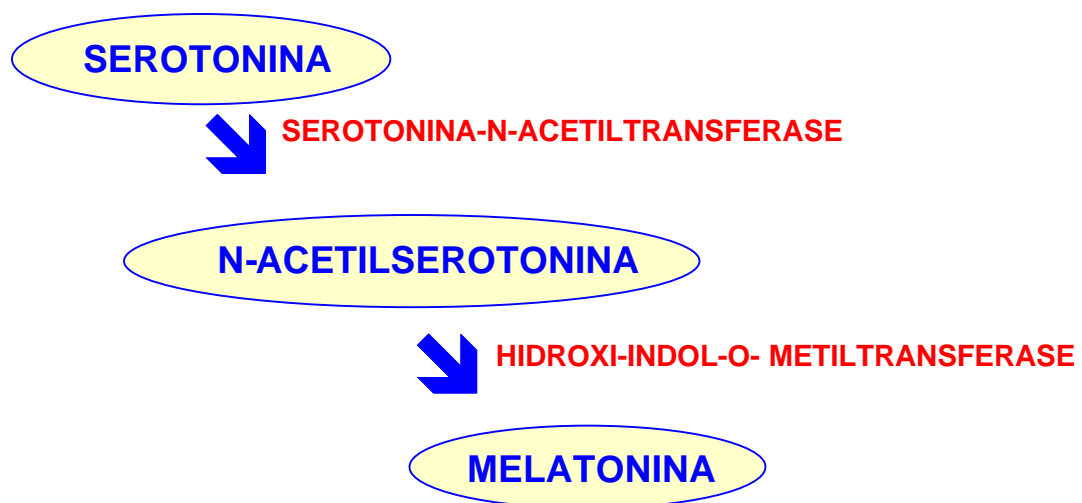
CLASSIFICAÇÃO		CARACTERIZAÇÃO
IUPHAR	ANTIGA	ESTRUTURA
MT1	Mel 1a (ML1)	Clonado e acoplado à proteína G
MT2	Mel 1b	Clonado e acoplado à proteína G
Anfíbios	Mel 1c	Clonado e acoplado à proteína G
MT3	ML2	Acoplado à proteína G e fosfolipase C

Tabela 1. Classificação dos Receptores de Melatonina segundo a União Internacional de Farmacologia (REPPERT et al., 1996; FERREIRA & MARKUS, 2001).

O núcleo supraquiasmático (NSQ), tem como função gerar o ritmo circadiano endógeno (período de aproximadamente 24 horas) que pode ser sincronizado pela luz e pela melatonina. Lesões nesses núcleos abolem o ritmo circadiano de locomoção e de beber, a ritmicidade de corticosterona na adrenal de ratos, dentre outros. É interessante que os núcleos supraquiasmáticos continuam ciclando mesmo quando isolados do resto do cérebro de ratos, ou *in vitro* em preparações de fatias de hipotálamo. Estas propriedades rítmicas conferem aos mesmos a função de relógio biológico (LEWY et al., 2001; PACCHIEROTTI et al., 2001; SLOTTEN et al., 2000).

Além, do ciclo dia-noite ou claro-escuro, outros fatores como a regulação genética, a idade, a dieta e a estação do ano modulam os níveis séricos desse neurohormônio da pineal em humanos (REITER, 1991-1998; PACCHIEROTTI et al., 2001).

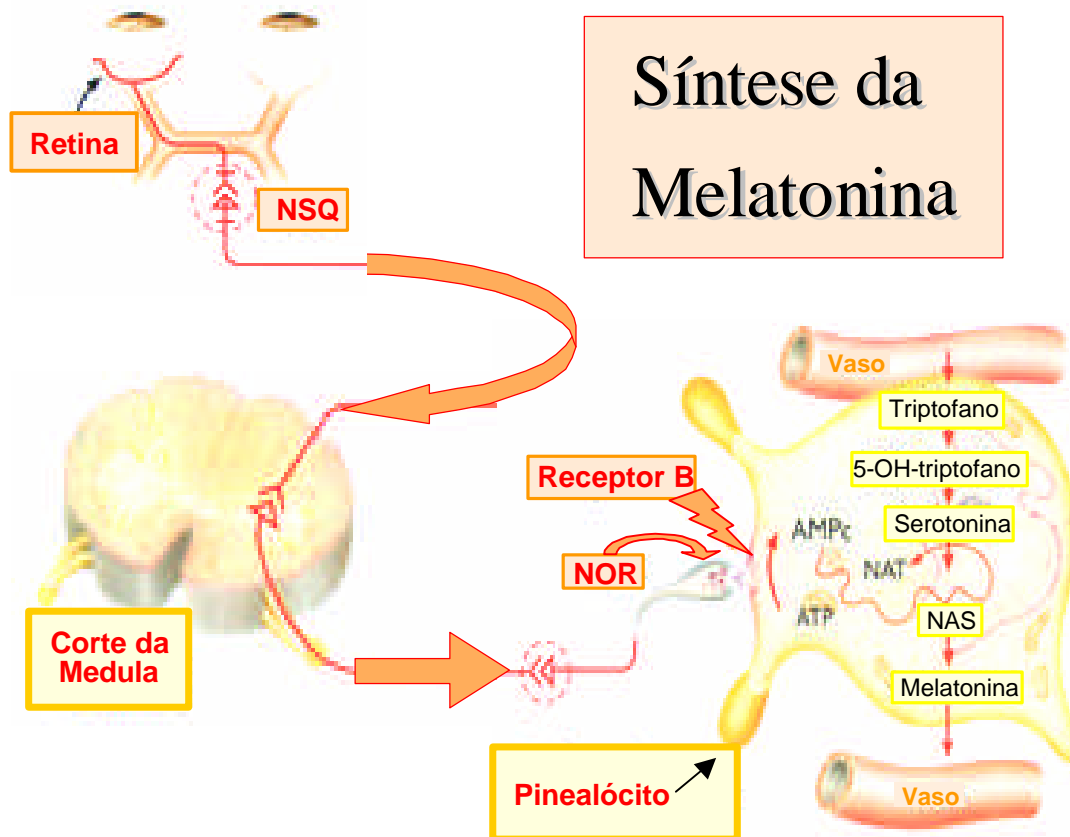
1.2.1. Biossíntese



Esquema 3. Biossíntese da melatonina no pinealócito, a partir da serotonina e N-acetilserotonina (REITER, 1991; PACCHIEROTTI et al., 2001).

A melatonina é uma indolamina sintetizada a partir neurotransmissores serotoninérgicos nos pinealócitos, onde a serotonina é acetilada a N-acetilserotonina, que posteriormente é O-metilada, resultando na melatonina. As enzimas responsáveis por estas duas fases são serotonina-N-acetiltransferase (NAT) e a hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (REITER, 1991; LIEBMANN et al., 1997).

A síntese da melatonina é determinada pelo ciclo de 24h claro-escuro, e inicia-se quando as fibras retinohipotalâmicas captam a ausência de luminosidade do ambiente e transmitem essa informação na forma de estímulos elétricos para o núcleo supraquiasmático (NSQ) que tem conexão anatômica com a área retroquiasmática do hipotálamo denominada de núcleo paraventricular (PVN). O PVN por sua vez, faz conexão com a coluna intermediolateral da medula espinhal que emite as fibras pré-ganglionares para o gânglio cervical superior (SCG). A partir deste gânglio originam-se fibras simpáticas pós-ganglionares que liberam noradrenalina (NOR) e adenosina trifosfato (ATP). Na fase clara, os neurônios simpáticos estão quiescentes, e na fase escura ocorre sua ativação e liberação de noradrenalina e ATP, como mencionado anteriormente. Esse neurotransmissor (NOR) atua diretamente sobre adrenoceptores do subtipo α_1 e β_1 , já o ATP atua sobre purinoceptores P2Y1 localizados na membrana dos pinealócitos. A noradrenalina induz a produção de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) que ativa a enzima chave, serotonina-N-acetiltransferase (NAT), a sintetizar melatonina. A estimulação dos adrenoceptores α_1 , através de um mecanismo dependente de cálcio leva a uma potenciação da resposta β_1 -adrenérgica na síntese desse neurohormônio. Da mesma forma que a serotonina-N-acetiltransferase (NAT), as enzimas triptofano hidroxilase (TPH) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) também parecem ser ativadas pelo cálcio (LIEBMANN et al., 1997; REITER, 1991; FERREIRA & MARKUS, 2001).



Esquema 4. Síntese de melatonina pela glândula pineal de mamíferos evidenciada no ciclo 24h claro-escuro (dia-noite), em que o sinal fótico é transmitido da retina chegando até o pinealócito por fibras simpáticas pós-ganglionares (LIEBMANN et al., 1997).

Além da inervação autonômica simpática, onde a noradrenalina é neurotransmissor e o ATP neuromodulador, a glândula pineal também recebe inervação autonômica parassimpática. Essas fibras nervosas contêm o Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP), Peptídeo Histidina-Isoleucina (PHI) e a enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção de óxido nítrico. A NOS também está presente nas células endoteliais dos vasos da glândula pineal. Portanto esta inervação nitrérgica pode influenciar tanto o metabolismo da glândula pineal como o fluxo de sangue através da glândula (REITER, 1991; FERREIRA & MARKUS, 2001).

1.2.2. Fonte Endógena e Exógena

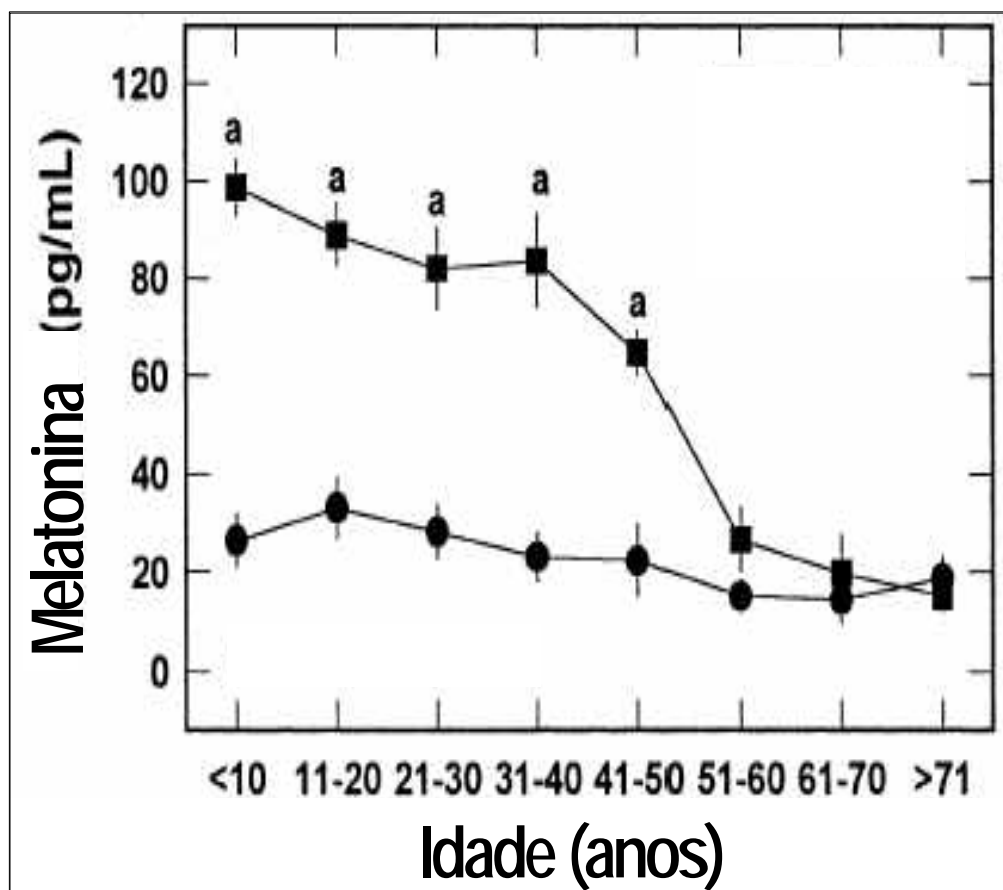
A maior produção da melatonina pela pineal acontece na adolescência e no adulto jovem, começando a decair após os quarenta anos. A partir dos setenta ou oitenta anos de idade, a secreção desse neurohormônio encontra-se severamente diminuída ou quase nula. Com o envelhecimento, o pico do nível de melatonina ocorre 1h antes que o normal e seu máximo atingem somente 50% do nível de jovens e adultos (LIEBMANN et al., 1997; REITER, 1995, et al., 2002). Como podemos observar na Tabela 2, a importante diferença entre a produção noturna e diurna de melatonina, bem como correlacionar as variações do seu pico noturno entre o grupo pré-puberdade, fase adulta e senil.

CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA NO SANGUE EM ng/mL		
IDADE	DIURNO	NOTURNO
PRÉ-PUBERDADE	21,8	97,2
ADULTA	18,2	77,2
SENIL	16,2	36,2

Tabela 2. Concentração de melatonina no sangue nas diferentes fases da vida, em homens chineses (LIEBMANN et al., 1997; REITER, 1995).

A produção desse hormônio tem períodos variados de aumento e redução, que se relacionam com o período do dia, tendo seu pico mais elevado à noite e nos meses de inverno. A melatonina depois de sintetizada pela pineal, pode ser encontrada no fígado e traços na urina por onde é eliminada do organismo (LIEBMANN et al., 1997; REITER, 1995, et al., 2002).

O funcionamento da pineal é importante para que o corpo mantenha-se adaptado às condições de necessidade, como por exemplo atividades durante o dia e repouso durante a noite.



Esquema 5. Nível de melatonina coletado no ciclo dia (●) e noite (■) em soro humano de diferentes idades (REITER et al., 2002).

As crianças recém-nascidas possuem a glândula pineal muito pequena e a secreção de melatonina não está regularizada. É possível que esta seja uma das explicações sobre o sono imprevisível das crianças (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001; REITER et al., 1994). Com o envelhecimento ocorre a diminuição na produção de melatonina. Isso acaba fazendo com que alguns pacientes idosos reclamem da qualidade do sono ou de insônia, porém, pode ser que

durmam com facilidade quando não deveriam, durante o dia (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001; REITER et al., 1994-2002).

Segundo a revisão feita por Reiter em 1998, após os setenta anos de idade o chamado relógio biológico perde a sua eficiência em produzir melatonina, propiciando o aparecimento de patologias como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, diminuição da resistência a infecções, diabetes mellitus, dentre outras. Talvez, essa diminuição na produção de melatonina pela pineal associado à outros fatores predominantes como o envelhecimento da glândula e do próprio organismo, possibilite a formação dessas patologias (REITER, 1998).

O nível plasmático de melatonina tem sido considerado um excelente marcador de fase do relógio biológico endógeno por vários grupos de pesquisadores. Foi constatado que este ritmo varia entre diferentes indivíduos, mas é extremamente constante quando medido em dias diferentes na mesma pessoa (FERREIRA & MARKUS, 2001). A melatonina também pode ser secretada, causando sonolência e relaxamento, após uma refeição muito rica em carboidratos, após um banho quente prolongado e após a exposição ao sol. Estudos comprovam que a administração de pequenas doses de melatonina, equivalentes às produzidas naturalmente pelo organismo, pode não só repor os níveis hormonais como também regularizar o ciclo do sono sem causar dependência (REITER, 1991; TAN et al., 2003; PACCHIEROTTI et al., 2001).

De acordo com o exposto acima, o consumo de alimentos que contenham melatonina poderia suprir as deficiências diárias. Foi demonstrado que vários alimentos possuem melatonina, conforme demonstrado na Tabela 3 (NOWAK & ZAWILSKA, 1998).

Em virtude da melatonina atuar como hormônio através de receptores e ser encontrada nos alimentos, é considerada por TAN e colaboradores como vitamina, fazendo-se uma comparação com a vitamina D₃ que por ter sido encontrada também em alimentos foi considerada vitamina (TAN et al., 2003).

CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA EM ALIMENTOS (pg/g)	
AVEIA	1,80
MILHO	1,37
ARROZ	1,01
GENGIBRE	583
TOMATE	460
CEVADA	378

Tabela 3. Concentração de melatonina em diferentes tipos de alimentos, referido a cada 1g de produto (NOWAK & ZAWILSKA,1998).

1.2.3. Propriedades Fisiológicas e Farmacológicas

Como já mencionado, a ação da melatonina varia de acordo com a hora em que é liberada e sua função mais conhecida é coordenar ritmos biológicos. Em animais cujo ciclo reprodutivo é regido pelas estações do ano, esse neurohormônio sinaliza as mudanças sazonais estimulando ou inibindo o desenvolvimento dos órgãos genitais (ARENDRT et al., 1999; REITER, 1991-1995).

Na literatura, inúmeros dados demonstram as funções neuroendócrinas da melatonina destacando seu efeito neuroprotetor e anti-apoptótico, em distúrbios neurodegenerativos crônicos e agudos evitando a apoptose neuronal (PAPPOLLA et al., 1997-2001; REITER et al., 1994-2001b; SHEN et al., 2002a/b); sua ação antitumoral ou oncostática, amplifica a atividade antitumoral da interleucina-2 (LIEBMANN, 1997; MAESTRONI, 2001; TIAN et al., 2001; WEBB & PUIG-DOMINGO, 1995); sua ação anticonvulsivante, protege e reduz a atividade motora nos ataques epiléticos (CABRERA et al., 2000; CAMMER, 2001; EL-SOKKARY et al., 1998; LAPIN et al., 1998; YAMAMOTO & MOHANAN, 2002); sua atividade ansiolítica,

mantém o estado emocional normal (PACCHIEROTTI et al., 2001; KOOP et al., 2000); seu efeito sedativo, induz naturalmente o sono e regula o ritmo circadiano (PACCHIEROTTI et al., 2001); sua ação imunoestimulante (LIEBMANN, 1997; MAESTRONI, 2001); sua utilização como agente facilitador da memória de curta duração (ARGYOU et al., 1998; SHEN et al., 2002a/b); seu efeito antinociceptivo (YU et al., 2000); sua ação hepatoprotetora, reduz toda a formação de pigmentos biliares sem causar toxicidade (REITER et al., 2001a; MEKI & HUSSEIN, 2001); sua ação anti-inflamatória, utilizada nos processos inflamatórios crônicos e agudos (CUZZOCREA & REITER, 2001-2002); como também sua utilização na síndrome de mudança de fuso horário para restabelecer esse distúrbio (Jet-lag) (REITER, 1998; ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001).

1.2.4. Conseqüências Fisiopatológicas do Declínio

- a. Desordens do sono (REITER, 1991-1998; ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001)
- b. Declínio da atividade imunológica (LIEBMANN, 1997; MAESTRONI, 2001);
- c. Alteração do humor (PACCHIEROTTI et al., 2001; KOOP et al., 2000);
- d. Tendência a desenvolver depressão endógena (PACCHIEROTTI et al., 2001);
- e. Aceleração do envelhecimento cerebral (ANTUNES et al., 1999; REITER, 1998; OKATANI et al., 2002);
- f. Tendência a aumentar o LDL-colesterol (BECKMAN et al., 1990; SARAN et al., 1990);
- g. Aumento na incidência de determinados tipos de câncer (principalmente o câncer de mama) (LIEBMANN, 1997; TIAN et al., 2001).

1.3. Espécies Reativas e Melatonina

Os termos espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são expressões utilizadas na literatura que trata dos radicais livres, mas não são definidas normalmente. Fisiologicamente, as EROs e ERNs são originadas na produção de adenosina trifosfato (ATP) pela mitocôndria. O ATP é a maior fonte de energia química dos organismos vivos como bactérias, plantas e animais. O grupo fosfato terminal é transferido para uma variedade de biomoléculasceptoras, e posteriormente são transformadas quimicamente para a realização dos trabalhos celulares dos organismos vivos. Essas espécies reativas normalmente são produzidas em ambiente oxigenado e são inevitáveis, podendo estar relacionados a várias patologias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; KEHRER, 1993; THOMAS & KAKYANARAMAN, 1997).

A enzima citocromo oxidase, responsável pela redução catalítica de O_2 em H_2O nos organismos aeróbicos, através da adição de quatro elétrons, utiliza 90% do oxigênio total consumido. Em 1986, Jones relacionou mais de 30 diferentes enzimas além da citocromo oxidase, em rins de mamíferos, os quais necessitam de oxigênio no seu metabolismo. Cada uma destas enzimas possui uma afinidade específica pelo O_2 e estão envolvidas em vários processos metabólicos. Dentro destes processos podemos citar o metabolismo de amins biológicas, prostaglandinas, purinas, esteróides, aminoácidos e carnitina e de outras atividades celulares incluindo auto-oxidação de pequenas moléculas tais como as flavinas, catecolaminas e hidroquinonas, ação das redutases de flavoproteínas e dos citocromos P_{450} (JONES et al., 1986).

Dentre as EROs geradas pelos processos metabólicos, menciona-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($\bullet OH$), radical hidroperoxil ($\bullet OH_2$), radical peroxil (RO_2^{\bullet}) e o

radical alcoxil (RO^\bullet). Frequentemente, o termo EROs é utilizado para designar radicais livres derivados do oxigênio molecular, mas também para espécies derivadas do oxigênio, que não são radicais livres, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), entre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; THOMAS & KAKYANARAMAN, 1997). Alguns óxidos de nitrogênio, como monóxido de nitrogênio (NO^\bullet) e dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) que são considerados radicais livres e o peroxinitrito (ONOO^\bullet) que é um não-radical, são chamados de ERNs. Outra forma popularmente utilizada para estas espécies é o termo “oxidante” (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; KEHRER, 1993).

Todos os componentes celulares são susceptíveis às EROs, particularmente aos radicais hidroxil. Eles atacam proteínas causando modificações em aminoácidos, provocam oxidação de grupos sulfidril resultando em mudanças conformacionais o que altera atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas bem como modificações em glicoproteínas, pela perda de metal em metaloproteínas e aumento na susceptibilidade à proteólise (SIES, 1993). Essas espécies reativas ainda podem causar alterações no DNA, provocando mutações nas bases nitrogenadas e alterações nos ácidos graxos polinsaturados como o ácido araquidônico, provocando lipoperoxidação. Lipídeos que fazem parte de membranas biológicas também são modificados quimicamente por radicais livres alterando a permeabilidade da membrana ao cálcio, com conseqüente ativação de fosfodiesterase, e eventual ruptura da membrana (SIES, 1993; KEHRER, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Com a deterioração da membrana celular, acredita-se que o acúmulo dos produtos formados na lipoperoxidação (malonildialdeído e 4-hidroxiálquênol), aumenta a rigidez e diminui a eficiência funcional da membrana causando o envelhecimento gradual das células (REITER, 1998; KEHRER, 1993).

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

RADICAIS

Superóxido, $O_2^{\bullet-}$
 Hidroxil, $\bullet OH$
 Peroxil, RO_2^{\bullet}
 Alcoxil, RO^{\bullet}
 Hidroperoxil, HO_2^{\bullet}

NÃO-RADICAIS

Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
 Ácido hipocloroso, $HOCl$
 Ácido Hipobromoso $HOBr$
 Ozônio, O_3
 Oxigênio singlete, $^1\Delta g$

ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

RADICAIS

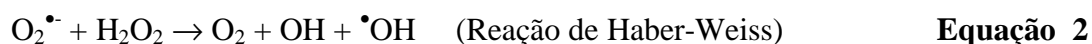
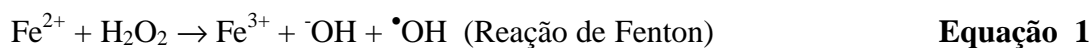
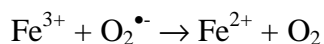
Monóxido de Nitrogênio, NO^{\bullet}
 Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\bullet}

NÃO-RADICAIS

Ácido Nitroso, HNO_2
 Cátion nitrosônio, NO^+
 Ânion Nitroxil, NO^-
 Tetróxido de Dinitrogênio, N_2O_3
 Peroxinitrito, $ONOO^-$
 Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$
 Cátion Nitril, NO_2^{\bullet}
 (exemplo, NO_2Cl , cloreto nitril)
 Peroxinitrito Alquil, $ROONO$

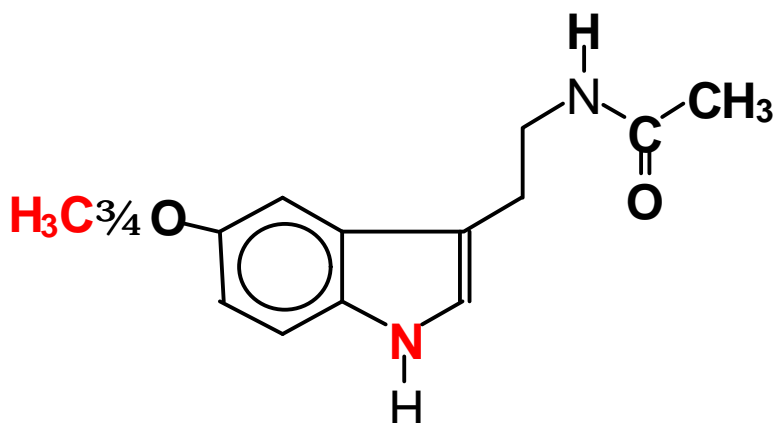
Tabela 4. Principais Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) (THOMAS & KAKYANARAMAN, 1997).

A maioria da produção *in vivo* de radical hidroxil, o mais reativo destas espécies mencionadas, provém da reação de H_2O_2 com o superóxido (reação de Haber-Weiss), a qual tem dois passos e é dependente de ferro (Fe^{3+}) e algumas vezes de cobre (Cu^{3+}), envolvendo a reação de Fenton (Equação 1) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Ambas reações estão ilustradas abaixo:



Diversos trabalhos têm investigado o papel da melatonina em estudos com espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Foi observada a potente ação desse neurohormônio como seqüestrador de radical hidroxil, radical ânion superóxido, radical monóxido de nitrogênio, oxigênio molecular (singlete), ânion peroxinitrito, peróxido de hidrogênio (TAN et al., 1993-2002; REITER et al., 2001; PAPPOLLA et al., 2001), e possivelmente radicais peroxil (PIERI et al., 1994-1995), que são gerados por reações em cadeia de lipoperoxidação de ácidos graxos polinsaturados presentes amplamente no cérebro (PAPPOLLA et al., 2001). Em 1993 evidenciou-se, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a atividade da melatonina como potente seqüestradora de espécies reativas em ratos (TAN, et al.,1993).

O nitrogênio na estrutura dessa molécula, é um elemento importante e necessário para interagir com espécies reativas (EROs e ERNs) e formar um novo composto seqüestrador (Esquema 7) excretado na urina (TAN et al., 2002; REITER et al., 2002). Quando o grupo metoxi do carbono 5 é substituído pelo grupo hidroxil a capacidade antioxidante da melatonina aumenta, essa reação ocorre provavelmente envolvendo doação de elétrons. Contudo, o custo dessa mudança pode diminuir o seu potencial lipofílico (TAN et al., 2002).

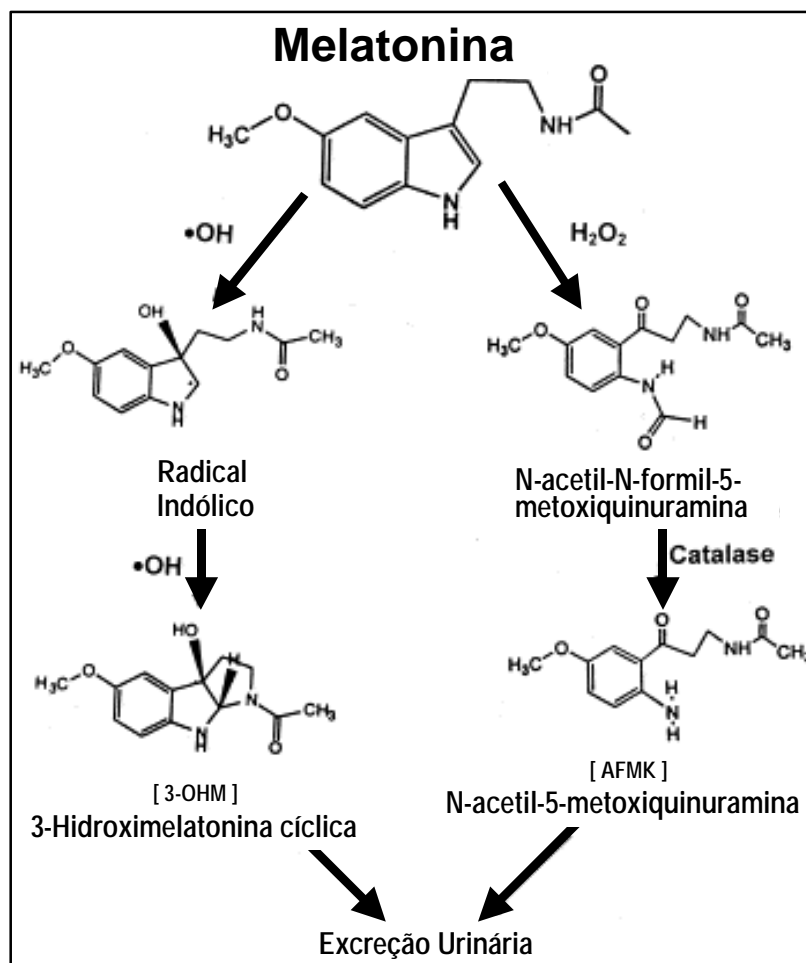


MELATONINA

Esquema 6. Fórmula estrutural da indolamina representada pelo anel indólico, grupamento metoxi e grupamento amino (nitrogênio) que estão envolvidos na capacidade sequestradora dessa molécula (REITER, 1991; LIEBMANN et al., 1997; ANTUNES et al., 1999).

Os principais órgãos onde ocorre a metabolização da melatonina são o fígado e o cérebro. No fígado ocorre a hidroxilação da melatonina formando 6-hidroximelatonina, seguida de uma conjugação com sulfato ou glucoronato, sendo posteriormente excretada na urina. Quando a melatonina reage com o peroxinitrito (ONOO^-) forma o metabólito 6-hidroximelatonina que manifesta uma atividade antioxidante superior em determinados modelos *in vitro* (REITER et al., 2002; BLANCHARD et al., 2000).

No tecido cerebral, a melatonina é convertida em N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina que sofre degradação imediata à N-acetil-5-metoxiuramina (REITER et al., 2002; BLANCHARD et al., 2000; TAN et al., 2002). O efeito antioxidante da melatonina pode ser somado aquele dos metabólitos secundários produzidos durante sua metabolização (REITER et al., 1999-2002; BURKHARDT et al., 2001; TAN et al., 2002).



Esquema 7. Esquema da melatonina sequestrando tanto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\bullet OH$), excretando respectivamente seus metabólitos N-acetil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e 3-hidroxi-melatonina cíclica (3-OHM) na urina (TAN et al., 2002).

Os compostos excretados na urina N-acetil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e 3-hidroxi-melatonina cíclica (3-OHM), são produtos da reação da melatonina com o H_2O_2 e $\bullet OH$, respectivamente (Esquema 7) e podem ser identificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Esses metabólitos secundários formados na cascata de reações da melatonina com oxidantes, contribuem significativamente para aumentar a eficácia dessa molécula em reduzir o dano oxidativo (REITER et al., 2002; TAN et al., 2002).

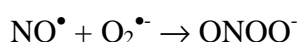
Neste sentido, outros estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a melatonina pode proteger os neurônios contra a excitotoxicidade do glutamato, do kainato (um agonista do subtipo não NMDA), do ácido quinolínico (um ligante endógeno do receptor NMDA), do cianeto de potássio e de qualquer dano produzido por toxinas ou processos traumáticos (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2001; LAPIN et al., 1998; CABRERA et al., 2000; CAMMER, 2001; HSU et al., 2002; YAMAMOTO & MOHANAN, 2002; EL-SOKKARI et al., 1998).

O óxido nítrico é um radical livre sintetizado no organismo por uma família de enzimas denominada óxido nítrico sintase (NOS), através da oxidação da L-arginina pelo O₂, muito conhecido principalmente pelo seu potencial de provocar vasodilatação (MONCADA et al., 1997; REITER, 1998; NODA et al., 1999). A presença de alguns co-fatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADPH), flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e tetrahidrobiopterina (TBH₄) são essenciais para a síntese do NO[•] (MONCADA et al., 1994).

O NO[•] é um neurotransmissor que reage rapidamente com o O₂, sendo inativado, formando nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻). Durante este processo podem ocorrer diversas reações resultando na formação de ERNs. Na presença de O₂, outros produtos podem ser formados quando reagem com o NO[•], conforme o dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) na Equação 3, o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) na Equação 4 e tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄) na Equação 5 (MONCADA et al., 1997; NODA et al., 1999; REITER, 1998).



O óxido nítrico (NO^\bullet) também pode interagir com radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) produzindo o ânion peroxinitrito (ONOO^-) conforme mostra o Esquema 8 e a Equação 6 (RADI et.al., 2001; SARAN et al., 1990). A maioria do NO^\bullet produzido pelos macrófagos é convertido em ONOO^- (CUZZOCREA & REITER, 2001).



Equação 6

Durante a pré-eclampsia, o aumento da peroxidação lipídica em artérias umbilicais humanas provoca dano no endotélio vascular e na placenta (hipóxia fetal e/ou isquemia de reperfusão). Com a redução do peróxido de hidrogênio pela melatonina, por seqüestrar diretamente radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e peroxil (LOO^\bullet) ocorre vasodilatação pelo aumento na produção de NO^\bullet (WAKATSUKI & OKATANI, 2000). De acordo com Noda e colaboradores a melatonina seqüestra diretamente o NO^\bullet (NODA et al., 1999).

O peroxinitrito, apesar de não ser um radical livre, é um poderoso oxidante e pode causar danos em moléculas biológicas, como lipídeos e proteínas (KEHRER, 1993). Além de causar oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), estando assim envolvido em doenças cardiovasculares e na formação de placas na aterosclerose (BECKMAN et al., 1990; SARAN et al., 1990; RADI, 2001). Ambos, NO^\bullet e ONOO^- fazem parte das ERNs e a melatonina é capaz de interferir em seus efeitos deletérios (REITER, 1998; PAPPOLLA et al., 2001; BLANCHARD et al., 2000; NODA et al., 1999).

O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode reagir com vários alvos além do NO^\bullet (Esquema 8), essas reações acontecem *in vivo* nas células cerebrais e no endotélio do tecido nervoso (REITER, 1998). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ sofre dismutação pela enzima superóxido dismutase (SOD), que o reduz em

peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), conforme mostra a Equação 7 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; REITER, 1998; RODRÍGUES et al., 1998).



Equação 7

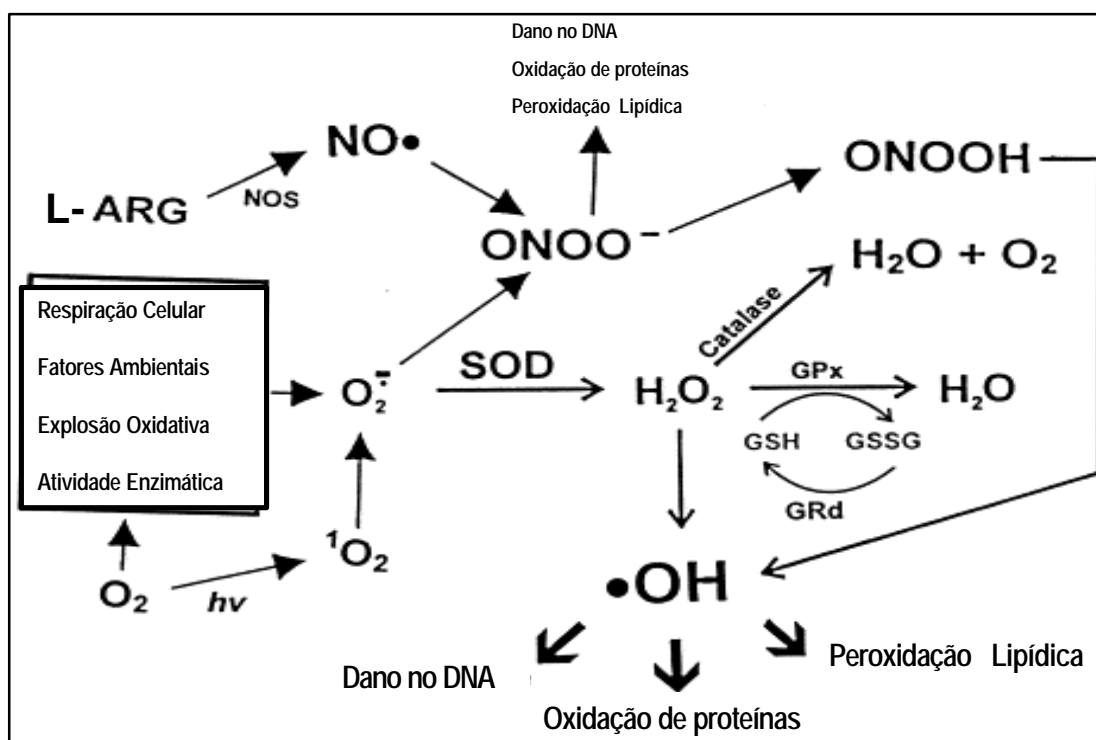
O superóxido também pode ser produzido *in vivo* através da reação de oxidação da hipoxantina à xantina catalisada pela enzima xantina oxidase (VIVOT et al., 2001). Em concentrações adequadas o $\text{O}_2^{\bullet-}$ tem sido mencionado como sinalizador na comunicação celular, principalmente no tecido vascular (REITER, 1998; RODRÍGUES et al., 1998).

A melatonina não reage diretamente com superóxido, todavia controla seu nível modulando a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Acredita-se que quando a melatonina reage com o radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), seqüestre secundariamente o radical ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduzindo o seu nível no interior da célula (RODRÍGUES et al., 1998; MARSHALL et al., 1996; REITER, 1998).

O radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}) formado durante a acidose tecidual na isquemia é um poderoso oxidante e agente redutor com alta capacidade para formar peróxido de hidrogênio (REITER, 1998).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido principalmente pela reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ na presença de íons metálicos de transição (ferro ou cobre) é capaz de formar radicais livres altamente reativos e danosos, como o HO_2^{\bullet} e $^{\bullet}\text{OH}$ através da reação de Fenton (Equação 1) (REITER, 1998; BAYDAS et al., 2002). Além da superóxido dismutase (SOD), outras enzimas podem gerar o H_2O_2 , como a urato oxidase, a monoamino oxidase (MAO), a glicolato oxidase e a L-aminoácido oxidase (REITER, 1998). O restante do H_2O_2 que não é inativado pela catalase,

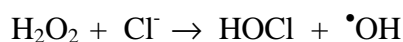
glutationa peroxidase (GPx) e por outras peroxidases, pode difundir-se e reagir com vários alvos, danificando as células (Esquema 8) (REITER, 1998, et al., 2002).



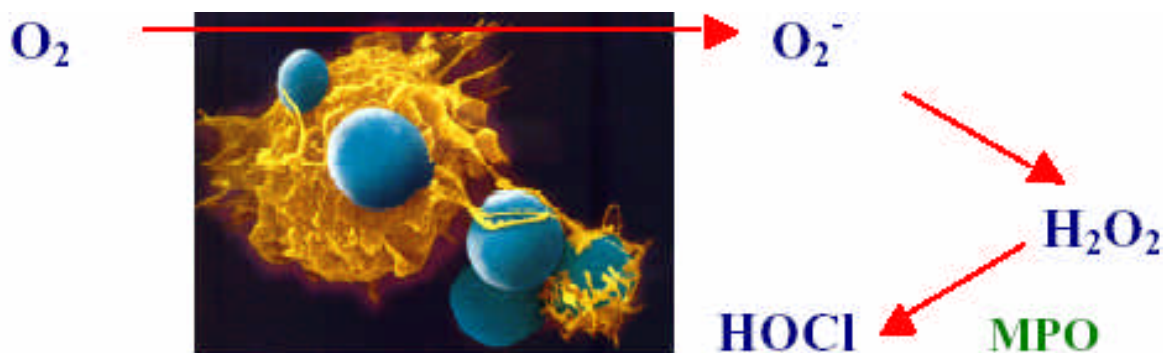
Esquema 8. Diagrama da síntese do radical óxido nítrico ($NO\bullet$) através da oxidação da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e formação do ânion peroxinitrito. Além da geração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e sua metabolização (REITER, 1998).

A melatonina seqüestra diretamente o H_2O_2 e também ativa a expressão gênica do RNAm da enzima catalase (Esquema 7) formando o N-acetil-5-metoxiquinuramina (AFMK) que é excretado diretamente na urina (REITER et al., 2002; TAN et al., 2002).

O ácido hipocloroso (HOCl), é produzido fisiologicamente pela enzima mieloperoxidase (MPO), presente principalmente em neutrófilos ativados. A atividade fisiológica predominante desta enzima é converter H_2O_2 e Cl^- em HOCl, conforme mostra a Equação 8 (KETTLE & WINTERBOURN, 2001; MARQUEZ & DUNFORD, 1996).

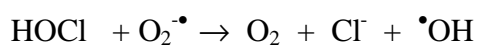


Equação 8



Esquema 9. Produção do ácido hipocloroso (HOCl) pela enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos ativados.

O HOCl possui uma vital importância na função de morte de microorganismos invasores, tendo alta reatividade e habilidade para danificar biomoléculas pela oxidação direta ou pela decomposição para formar o gás cloro (Cl_2), como também pode reagir diretamente com superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dando origem ao $\cdot\text{OH}$, conforme a Equação 9 (KETTLE & WINTERBOURN, 2001).



Equação 9

O $\cdot\text{OH}$ é um agente oxidante extremamente tóxico, agressivo e altamente reativo; sua geração *in vivo* dura alguns micro-segundos e ele pode rapidamente combinar-se com outras moléculas que estejam em sua vizinhança (REITER, 1998).

Desde 1993 a melatonina tem se revelado um eficiente sequestrador de espécies reativas. Na literatura, em estudos realizados *in vivo*, constatou-se que a melatonina é cinco vezes mais

efetiva que a vitamina E para detoxificar $\cdot\text{OH}$ e duas vezes mais eficaz para neutralizar o radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$). Pois, uma molécula de melatonina pode sequestrar quatro ou mais espécies reativas tornando-se o mais potente protetor tissular para ser administrado adicionalmente ao tratamento tradicional de patologias como Mal de Alzheimer e Parkinson, dentre outras (REITER et al., 2002; TAN et al., 2002; PAPPOLLA et al., 2001; PIERI et al., 1994).

1.4. Antioxidantes e Melatonina

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato. O desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante para causar uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As células apresentam defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas destacam-se as enzimas catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutatona redutase (GRd) e o conjunto das glutatona S-transferases (GSTs). As glutatona S-transferases, embora não atuem diretamente contra os radicais livres, são importantes na defesa celular pois estão associadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação do tripeptídeo glutatona em sua forma reduzida (GSH) com esses compostos, aumentando a sua solubilidade e facilitando a sua excreção (KEHRER, 1993). Dentre os antioxidantes não enzimáticos menciona-se os endógenos como a glutatona reduzida (GSH) e os exógenos como a vitamina E, C, A e

carotenóides (licopeno e β -caroteno). Além de compostos fenólicos, como flavonóides e outras moléculas derivadas de fontes vegetais (KEHRER, 1993). As defesas antioxidantes endógenas têm como função remover radicais livres tóxicos ou convertê-los em produtos intermediários não tóxicos (REITER, 1998, et al., 2001b). Da mesma forma, a melatonina mantém aumentado o nível de glutatona intracelular pela estimulação da síntese do RNAm da enzima γ -glutamylcisteína sintase (REITER et al., 2001b).

A melatonina é capaz de atuar na regulação da expressão gênica das seguintes enzimas ativando-as: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GRd), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6PDH) (TAN et al., 2000-2002; REITER et al., 2000b-2001b-2002; BAYDAS et al., 2002). Essa molécula também pode inibir enzimas pró-oxidantes como óxido nítrico sintase (NOS), lipoxigenases (5-LPO) e ciclooxigenase (COX) (PAPPOLLA et al., 2001; REITER et al., 2001b).

A base molecular da ação antioxidante da melatonina baseia-se na sua capacidade de atuar como um doador de elétrons em processos não enzimáticos e também de inibir enzimas da família citocromo P₄₅₀. Além de ser um poderoso agente antioxidante, a melatonina parece retardar o processo de envelhecimento das células (REITER et al., 2000a/b; 2002; TAN et al., 2002), proporcionando uma excelente proteção ao cérebro e reduzindo o estresse oxidativo (REITER et al., 2000a/b).

Além disso, a melatonina tem várias vantagens como antioxidante: pode preservar a estrutura e função das organelas, alterar a fluidez da membrana modificando a afinidade do receptor com o ligante endógeno, diminuir o nível dos produtos de peroxidação lipídica (malondialdeído e 4-hidroxiacetonil), manter estabilizada a membrana celular a fim de retardar o

processo de envelhecimento (COSTA et al., 1995; GARCIA et al., 2001; REITER et al., 1994-2001b; ANTUNES et al., 1999).

A concentração fisiológica da melatonina depende do compartimento do organismo que está sendo considerado (TAN & REITER, 2003b). Alguns autores sugerem que a concentração fisiológica da melatonina é aquela medida no soro sanguíneo (faixa picomolar e nanomolar). Entretanto, tem sido observado que na bile e no líquido cérebro espinhal do terceiro ventrículo as concentrações da melatonina são algumas ordens de magnitude maiores que no sangue (TAN et al., 1999; TAN & REITER, 2003b; TRICOIRE et al., 2002). De qualquer forma, foi também relatado que a melatonina é efetiva contra o estresse oxidativo tanto em concentrações fisiológicas como farmacológicas (PARLAKPINAR et al., 2002; KILIC et al., 2002). A concentração fisiológica de melatonina sofre redução com a idade (REITER, 1995, et al., 2002) e esse declínio pode ser associada ao agravamento de doenças relacionadas com o envelhecimento e o desequilíbrio antioxidante endógeno (REITER, 1995, et al., 1994 -2002). Na literatura, vários trabalhos relatam um aumento do tempo de vida em camundongos que recebem melatonina por longos períodos (OKATANI et al., 2001-2002).

1.5. Patologias e Melatonina

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera (78%), seguido do oxigênio (21%). O cérebro por necessitar de uma grande quantidade de oxigênio para exercer suas funções, é mais susceptível aos constantes ataques de EROs e ERNs do que qualquer outra parte do organismo humano (REITER, 1998, et al., 2001b).

Além de o cérebro possuir poucas defesas antioxidantes endógenas, também contém grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados, ferro, ácido ascórbico e lipídeos na membrana neural (ácido linoleico e ácido araquidônico), o que contribui significativamente para o estresse oxidativo celular. Esse estresse oxidativo se dá principalmente pela riqueza de fosfolipídeos poliinsaturados (PUFAS), que são facilmente oxidáveis gerando reações em cadeia de lipoperoxidação formando novos radicais como o peroxil (LOO[•]) (REITER, 1995-1998, et al., 2001b; PIERRI et al., 1994-1995).

À medida que o ser humano envelhece (após os 45 anos de idade), os níveis de melatonina caem, podendo haver um concomitante declínio na função cerebral e propiciar o aparecimento de transtornos neurodegenerativos. Pois, com o envelhecimento o sistema imunológico vai perdendo o desempenho vigilante, diminuindo as defesas e permitindo que o organismo fique mais vulnerável às constantes agressões. Quando um organismo aeróbico sofre algum tipo de dano seja por infecção, trauma, estresse, toxinas ou qualquer outro insulto ambiental, ocorre a geração de espécies reativas (EROs e/ou ERNs), que são a principal causa do estresse oxidativo (Esquema 10). O estresse oxidativo está relacionado ao desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e a atividade do sistema de defesa antioxidante do organismo (REITER, 1995-1998; OKATANI et al., 2002).

Em alguns casos as ações destrutivas dessas espécies reativas são benéficas ao organismo, como no caso de células fagocíticas na destruição de microorganismos invasores. Entretanto, seu excesso pode estar relacionado a uma série de patologias humanas como distúrbios neurodegenerativo (Mal de Alzheimer e Parkinson), inflamações, câncer, artrite reumatóide, aterosclerose, diabetes, doenças cardiovasculares, dano de isquemia/reperfusão, hiperplasia de próstata dentre outras (NOWAK & ZAWILSKA, 1998; REITER et al., 1994-2001b-2002-2003;

SHEN et al., 2002b; WAKATSUKI & OKATANI, 2000; PAPPOLLA et al., 1997-2001; PACCHIEROTTI et al., 2001).

No cérebro acometido com Mal de Alzheimer, ocorre intensa degeneração pela proteína β -amilóide (PBA) (principal constituinte da placa senil) e hiperfosforilação da proteína TAU (principal formação do emaranhado neurofibrilar), como também intenso estresse oxidativo. A literatura sugere que, além da utilização de anticolinesterásico associado com a vitamina E, a melatonina seja eficaz para prevenir essa degeneração neuronal, impedindo a apoptose neuronal. Esse neurohormônio pode inibir a expressão gênica do RNAm das enzimas fosfolipase A_2 , cicloxigenases (COX-1 e COX-2), 5-lipoxigenase e diminuir a toxicidade da proteína β -amilóide (PBA) (PAPPOLLA et al., 1997-2001). A melatonina também tem um efeito sobre a retenção de memória, tendo sido efetiva na reversão da perda de memória em animais velhos e em modelos de Alzheimer (SHEN et al., 2002a/b; ARGYRIOU et al., 1998).

Experimentos clínicos têm evidenciado uma ação positiva da melatonina como coadjuvante em terapia com interleucina-2 (IL-2), com o objetivo de reduzir a dose administrada dessa citocina pela sua alta toxicidade. O interferon-gama é capaz de estimular a síntese de melatonina pela glândula pineal e a IL-2 pode abolir o ritmo noturno de melatonina. Esses trabalhos possibilitam evidenciar o uso clínico da melatonina em doenças neoplásicas, facilitando a redução do tumor em humanos que estão em processo avançado de câncer de pulmão e coloretal, com metástases cerebrais (WEBB & PUIG-DOMINGO, 1995; MAESTRONI, 2001; LIEBMANN et al., 1997).

PATOLOGIAS RELACIONADAS A EROs:

- Mutações;
- Câncer;
- Aterosclerose;
- Artrite Reumatóide;
- Doenças Auto-imunes;
- Disfunção Renal Pós-transplante;
- Lesão Pós-isquemia e reperfusão de cérebro, fígado, pulmões, coração, pele, intestino, rins, pâncreas e músculos;

Esquema 10. Patologias relacionadas ao excesso de espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em modelos de estudo nos quais se utiliza o ácido quinolínico, o kainato e o glutamato para induzir o estresse oxidativo celular, foi verificada a ação protetora da melatonina reduzindo este fenômeno e diminuindo sua neurotoxicidade (CAMMER, 2001; LAPIN et al., 1998; CABRERA et al., 2000). Esta mesma ação protetora, foi também verificada contra a ação de substâncias tóxicas como ocratoxina A, uma micotoxina produzida pelo *Aspergillus ochraceus* e outros fungos que contaminam principalmente alimentos (MEKI & HUSSEIN, 2001). De acordo com esses dados, a literatura mostra que os transtornos neurológicos causados por processos traumáticos e/ou toxinas podem ser revertidos pela melatonina (CAMMER, 2001; MEKI & HUSSEIN, 2001; CABRERA et al., 2000; LAPIN et al., 1998; REITER, 1998).

Em indivíduos propensos a desenvolver litíase biliar, foi verificado que o tratamento com melatonina reduziu toda a formação de pigmentos biliares sem causar nenhuma toxicidade ao organismo; além de mostrar-se um excelente protetor hepático (SHIESH et al., 2000; REITER et al., 2001a).

A gentamicina é largamente utilizada no tratamento contra infecções por bactérias gram-negativas e o seu uso prolongado causa nefrotoxicidade. Verificou-se que a melatonina, além de proteger a célula contra o efeito nefrotóxico desse antibiótico, tem ação protetora contra o dano oxidativo e a apoptose celular (SENER et al., 2002).

Diante do potencial antioxidante da melatonina, será realizada nesse trabalho uma abordagem diferente do que a literatura do tema apresenta. O efeito da melatonina contra a lipoperoxidação em modelos de membranas com diferentes constituições lipídicas, comparando o seu efeito protetor entre as membranas artificiais e as naturais. Visto que, este produto da glândula pineal apresenta a capacidade de atravessar todas as barreiras biológicas, incluindo a hematocefálica e placenta. Será investigado também o efeito da melatonina sobre as atividades de enzimas pró-oxidantes, ainda não relatado na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial antioxidante da melatonina como sequestrador de radicais livres, frente à peroxidação lipídica em modelos de membranas lipídicas e frente a enzimas pró-oxidantes.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a reatividade da melatonina com os radicais DPPH[•] e NO[•];

Avaliar o efeito da melatonina na proteção contra lipoperoxidação, em membranas com diferentes constituições lipídicas, induzida pelos radicais hidroxil ([•]OH) e ascorbil e pelo ânion peroxinitrito (ONOO⁻) em:

- Lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina;
- Microsoma de cérebro e fígado de ratos
- Homogenato de cérebro de ratos

Avaliar o efeito da melatonina sobre as atividades da xantina oxidase (XO), óxido nítrico sintase neuronal (cnNOS) e mieloperoxidase (MPO), através da determinação das constantes de inibição ($K_{0,5}$).

3. JUSTIFICATIVA

Devido à elevada incidência relacionada com doenças neurodegenerativas associadas ao aumento de espécies reativas no organismo, o estudo da ação desse neurohormônio justifica-se, tendo em vista a diminuição de sua produção após os 45 anos de idade (REITER et al. 2002).

O estudo justifica-se também pela busca incessante dos pesquisadores por novos fármacos, que previnam o envelhecimento celular causado por agentes oxidantes e diversos fatores ambientais. A proposta desse trabalho é estender os dados existentes na literatura analisando o efeito da melatonina como antioxidante especificamente como sequestrador de EROs e ERNs, como protetor de membranas biológicas e como inibidor de enzimas pró-oxidantes.

Estudos promissores, clínicos e pré-clínicos, já apontam a melatonina como passível de utilização em imunodeficiências congênitas ou adquiridas (JIMENEZ et al.,2001), envelhecimento celular e também como coadjuvante na terapia de distúrbios neurodegenerativos, controlando várias patologias (REITER, 1998; TAN et al., 2002).

A importância deste estudo para a biomedicina é a busca de uma melhor qualidade de vida, proporcionando a diminuição da carga alostática diária adquirida, fator dominante no processo de envelhecimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram do mais alto grau de pureza disponível no mercado.

4.1.1. Reagentes da Sigma

Ácido ascórbico, ácido tiobarbitúrico (TBA), albumina sérica bovina (BSA), DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazina), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), fosfatidilcolina, fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), melatonina, mioglobina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), nitrobluetetrazolium (NBT), reagente de folin, triton X-100, tetrahydrobiopterina (TBH_4), xantina e xantina oxidase (XO).

4.1.2. Reagentes da Merck

2 α -Naftil-etilenodiamina, ácido clorídrico (HCl), ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), ácido orto-fosfórico (H_3PO_4), cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de ferro (FeCl_3), cloreto de magnésio (MgCl_2), cloreto de sódio (NaCl), éter etílico, etanol absoluto, fosfato dibásico de

sódio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4), hidróxido de sódio (NaOH), nitrato de sódio (NaNO_3), nitrito de sódio (NaNO_2), nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tricina, sacarose, sulfanilamida, sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4).

4.1.3. Reagentes de Outras Marcas

Ácido tricloroacético (TCA), **SynthÒ ou QuimilaborÒ**; asolecitina de soja , **FlukaÒ**; carbonato de sódio (Na_2CO_3), **EcibraÒ**; membrana de diálise - **DianormÒ**.

4.2. Animais Utilizados

No modelo experimental de microsomas e homogeneizados foram utilizados ratos machos Wistar adultos com 55-60 dias, pesando de 160-190g, provenientes do laboratório da prof. Dra Fátima R.M.da Silva, mantidos a temperatura ambiente de 22-25°C, com água e ração *ad libitum* de acordo com recomendações éticas.

No dia da chegada ao Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, os animais foram alojados em caixas plásticas em grupos de 2 e permaneceram no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina por 3 dias para adaptação, utilizando o ciclo claro-escuro de 12 horas com as luzes ligadas às 7 horas e desligadas às 19 horas. Após esse período,

os animais foram decapitados para a retirada do cérebro, do fígado e dos pulmões imediatamente antes do início dos experimentos.

Os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA145).

4.3. Preparação de Melatonina

A melatonina foi preparada separadamente para cada ensaio. Inicialmente, foi realizada a pesagem da substância para ser dissolvida em 1% de etanol absoluto, a solubilização completa-se quando a solução foi submetida por 20 min ao ultra-som e finalmente a solução etanólica foi diluída em água ou tampão do ensaio. A melatonina após seu preparo, permanece estável por até o máximo de 5 dias no refrigerador.

4.4. Preparação de Lipossomas

Os lipossomas foram preparados conforme o método descrito por SONE et al, 1977, o qual baseia-se na solubilização dos lipídeos em um tampão contendo tricina 10 mM, colato de sódio 20 g/L e desoxicolato de sódio 10 g/L (CRECZYNSKI-PASA & GRÄBER, 1994; CRECZYNSKI-PASA et al., 1997).

Os lipídeos utilizados em diferentes experimentos, foram a fosfatidilcolina (PC) e a asolecitina de soja (ASO), que é uma mistura de lipídeos composta majoritariamente de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina. Após a solubilização, a solução foi

submetida a diálise em banho-maria a 30°C por 5 horas, contra o tampão de reconstituição de lipossomas contendo cloreto de magnésio 0,25 mM + Tricina 1 mM (pH = 8,0). Depois de preparados os lipossomas foram submetidos aos vários ensaios de danos oxidativos.

4.5. Preparação de Microssomas

Os cérebros dos ratos, depois de retirados foram imediatamente colocados e mantidos no gelo para posterior pesagem e preparação de microssomas. Os fígados depois de retirados dos animais e lavados em uma solução de NaCl 0,9 g/L, foram também mantidos no gelo para posterior pesagem e preparação de microssoma.

Os microssomas foram obtidos pela homogeneização destes órgãos e posterior centrifugação diferencial pela agregação com cálcio. A homogeneização foi realizada em 10mM de tampão Tris-sacarose (pH = 7,4), contendo 17g % de tecido e centrifugados a 600g por 5 min a 4°C. A fração mitocondrial foi obtida centrifugando-se o sobrenadante a 12000g por 10 min. A fração microssomal resultou da precipitação do sobrenadante da fração anterior adicionando 80 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂). Finalmente, o precipitado (fração microssomal) foi lavado com 8 mL de uma solução contendo KCl 150 mM / Tris-HCl 10 mM (pH = 7,4) e centrifugado a 25000g por 15 min (SCHENKMAN & CINTI, 1978; BUEGE & AUST, 1978).

Depois de lavados, os microssomas foram resuspendidos em tampão de conservação contendo 20% de glicerol (SCHENKMAN & CINTI, 1978). Uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração de proteína e o restante da fração microssomal foi imediatamente congelado em criotubos de 1mL e mantida a -80°C para posterior utilização.

4.6. Preparação do Homogeneizado de Cérebro

Os cérebros dos animais foram homogeneizados sob banho de gelo, em um triturador de tecidos na proporção 1:5 (p/v), em tampão de solubilização contendo KH_2PO_4 20 mM (pH = 7,4), NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 10 min, o sobrenadante foi retirado e dividido em alíquotas para determinação de proteínas. O restante do homogeneizado foi imediatamente congelado em criotubos de 1 mL e mantido a -80°C para posterior análise da ação da melatonina (KNOWELS et al., 1990).

4.7. Preparação do Homogeneizado de Cerebelo

Os cerebelos foram homogeneizados sob banho de gelo, em um triturador de tecidos na proporção de 1:4 (p/v), em tampão de solubilização contendo Tris-HCl 50 mM (pH = 7,6) e fluoreto de fenilmetilsulfonila 200 mM (PMSF). O homogeneizado foi centrifugado a 4°C por 10 min, o sobrenadante foi retirado e dividido em alíquotas para a determinação da concentração de proteínas. O restante do homogeneizado foi utilizado para a análise da atividade da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) conforme descrito no item 4.12.2 (KNOWELS et al., 1990; GROSS, 1996).

4.8. Preparação do Homogeneizado de Pulmão

Os pulmões dos animais depois de retirados e lavados em uma solução de NaCl 0,9 g/L foram imediatamente colocados no gelo, para posterior pesagem e preparação do homogeneizado. Os pulmões dos animais foram homogeneizados sob banho de gelo, em um triturador de tecidos contendo 0,5% (v/v) de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTMAB) e 50 mM de tampão fosfato (NaH_2PO_4) (pH = 6,0), como descrito por RAO et al., 1994. As amostras foram submetidas ao congelamento e descongelamento por três vezes consecutivas e centrifugadas a 12000g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e dividido em alíquotas de 1mL para ser congelado em freezer -80°C (RAO et al., 1994; KETTLE & WINTERBOURN, 2001; MARQUEZ & DUNFORD, 1996).

O homogeneizado foi utilizado para a análise da atividade da mieloperoxidase (MPO), conforme descrito no item 4.12.3.

4.9. Determinação da Concentração de Proteína

Este método tem como objetivo determinar a concentração de proteínas totais da amostra a ser analisada, através do Método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Foi utilizada uma solução padrão de albumina bovina. O método baseia-se na reação entre Cu^{+2} com as ligações peptídicas das proteínas e a redução dos sais de fosfomolibdato-fosfotungstato do reagente de Folin, resultando numa cor azulada analisada espectrofotometricamente a 660 nm.

4.10. Preparação para a Síntese de Peroxinitrito

A síntese de peroxinitrito foi realizada pela reação de nitrito de sódio com peróxido de hidrogênio em ácido nítrico, utilizando-se um conector tipo T. O produto foi coletado sobre uma solução de hidróxido de sódio. O peróxido de hidrogênio residual foi então removido através da adição de óxido de manganês. A concentração final do ânion peroxinitrito foi determinada espectrofotometricamente a 302 nm em hidróxido de sódio utilizando um coeficiente de extinção molar de $1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (RADI, 1996; KU, 1996).

4.11. Análise da Ação Seqüestradora de Espécies Reativas da Melatonina

4.11.1. Monitoramento do Radical DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazina) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Este radical é utilizado como ferramenta para estudar a ação de compostos como seqüestradores de radicais livres, sendo uma técnica independente de qualquer atividade enzimática. Quando o DPPH recebe um elétron ou um átomo de hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. A técnica consiste na incubação dos compostos em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 200 μM por 30 minutos a 37°C com posterior leitura das absorbâncias. O percentual de inibição da absorção de DPPH é calculado através de comparação com o grupo controle de 100% DPPH (VIVOT et al., 2001).

4.11.2. Formação e Monitoramento de Radical Óxido Nítrico (NO[•])

O óxido nítrico (NO[•]) foi liberado pela incubação de nitroprussiato de sódio 40 mM (NaNPS) em um meio contendo fosfato monobásico de sódio 20 mM (NaH₂PO₄) pH = 8,0 em temperatura ambiente. A liberação de NO[•] foi quantificado indiretamente pela formação de íons nitrito (NO₂⁻) pela posterior reação com o reagente de Griess (α -naftiletlenodiamina 0,1% e ácido sulfanílico 1%) na presença e na ausência de melatonina. A análise espectrofotométrica foi avaliada a 543 nm e o resultado expresso utilizando a curva padrão de nitrito de sódio (GREEN et al., 1981-1982).

4.11.3. Avaliação da Lipoperoxidação Induzida pelos Radicais Hidroxil ([•]OH) e Ascorbil (Asc[•]) em Lipossomas, Homogeneizado e Microssomas

Este método baseia-se na oxidação induzida pelos radicais hidroxil ([•]OH) e ascorbil (Asc[•]) das diferentes membranas lipídicas. Em um meio de reação, contendo lipídeo 2,5 mg/mL, o radical hidroxil ([•]OH) foi produzido pela reação de ácido ascórbico 0,1 mM e cloreto de ferro 20 μ M, peróxido de hidrogênio com 2,8 mM em tampão fosfato 10 mM; e para o radical ascorbil foi produzido pela reação de ácido ascórbico 0,1 mM com sulfato ferroso 25 μ M em tampão Tris-HCl 1 M. Em todos os ensaios de microssomas e homogeneizado a concentração de proteína foi mantida em 2 mg/mL, para todas as preparações de membranas. Após a preparação das reações mencionadas acima, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 37°C por 40 min, seguidos da adição de ácido tricloroacético (TCA 12%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73%) e

novamente incubados a 100°C por 30 min. A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de coloração rósea nas soluções analisadas pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). O nível de lipoperoxidação é indicado pela formação majoritária de malondialdeído e outras substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo acompanhado por análise espectrofotométrica a 535 nm (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1981-1987; BIRD & DRAPER, 1984; OHKAWA et al., 1979).

O teste avaliou o dano celular induzido pelos radicais hidroxil e ascorbil e a ação protetora da melatonina. Os resultados foram expressos em percentagem, tomando-se os valores médios das absorbâncias dos ensaios, tendo como valor controle 100% peroxidação lipídica para os lipossomas, homogeneizado e microssomas (BIRD & DRAPER, 1984; BUEGE & AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979; SANZ et al., 1994).

4.11.4. Avaliação da Lipoperoxidação Induzida pelo Peroxinitrito (ONOO⁻)

Este ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 1 M (pH = 7,4) e a concentração do ânion peroxinitrito utilizada foi de 2,64 mM, para lipossomas e microssomas. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora nos tubos “eppendorf”, e submetidas à ação de ácido tricloroacético (TCA 12%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73%) para novamente serem incubadas a 100°C por 30 min, conforme método descrito anteriormente no item 4.11.3 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1987; BIRD & DRAPER, 1984; OHKAWA et al., 1979; BUEGE & AUST, 1978).

4.12. Análise da Ação da Melatonina sobre Enzimas Pró-oxidantes

4.12.1. Análise da Atividade da Xantina Oxidase (XO)

A enzima xantina oxidase utiliza a xantina ou hipoxantina como substrato para formar o radical superóxido e ácido úrico. O monitoramento do ácido úrico foi realizado espectrofotometricamente a 295 nm para avaliar a atividade desta enzima, em uma solução contendo xantina 100 μ M, tampão fosfato 25 mM (pH = 7,8) e xantina oxidase 0,01 U / 250 μ L. (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988).

4.12.2. Análise da Atividade da Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS)

Este método baseia-se no monitoramento espectrofotométrico da oxidação da mioglobina pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}), resultando num aumento progressivo na absorbância a 405 nm. A mioglobina adquirida comercialmente é reduzida pelo tratamento prévio com ditionite 0,5 mg/mL e eluída pela adição de tampão Tris 50 mM, sendo que a concentração final de mioglobina obtida foi de 400 μ M. A formação de NO^{\bullet} é iniciada pela adição de 10 μ L do homogeneizado de cerebelo 8 mg/mL, em um meio contendo KH_2PO_4 50 mM (pH = 7,2), MgCl_2 1,2 mM, CaCl_2 0,25 mM, L-valina 60 mM, citrulina 1,2 mM, L-Arginina 0,25 μ M, DTT 1 mM, FAD 4 μ M, FMN 4 μ M, TBH_4 10 μ M, NADPH 120 μ M e mioglobina 0,1 nmol (KNOWLES et al.,1990; GREEN et al., 1981-1982), na ausência ou na presença de diferentes concentrações de

melatonina. Foi utilizado um controle na presença de EGTA 1 mM para caracterizar a atividade da iNOS.

A atividade da nNOS foi determinada através da relação entre a inclinação da reta formada após 10 minutos de incubação, analisada espectrofotometricamente a 405nm. A taxa de oxidação em densidade óptica por minuto foi convertida em nmol NO/min utilizando um fator de conversão previamente estabelecido (GROSS, 1996).

4.12.3. Análise da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Este método baseia-se na dosagem da atividade da mieloperoxidase através da formação de ácido hipocloroso a partir do H_2O_2 presente no meio de reação contendo 275 μ L de NaH_2PO_4 50 mM (pH = 6,0), 45 μ L de o-dianisidina-2-HCl 0,167 mg/mL e 13,8 μ L de H_2O_2 0,005 %. A atividade da enzima é avaliada continuamente em intervalos de 5 segundos durante 90 segundos, determinadas através da análise de regressão da velocidade da curva padrão monitorada em 450 nm. Os testes foram realizados adicionando-se o homogeneizado de pulmão na ausência ou na presença de diferentes concentrações de melatonina e os resultados foram expressos em Δ D.O. por segundo (RAO et al., 1994; KETTLE & WINTERBOURN, 2001; MARQUEZ & DUNFORD, 1996).

4.13. Análise Estatística

Todos os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão (SD) de triplicatas de experimentos independentes. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes (n total de 3 a 6). Os valores das IC₅₀ estão representados nos experimentos de curva dose-resposta.

Para a análise estatística quando necessária foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste *t* de Bonferroni para Múltiplas Comparações e para a tabela comparativa das IC₅₀ foi utilizada a análise de variância de duas vias (TWO-WAY) sendo considerados estatisticamente significativos valores de *P* menores que 0,05 (**P* < 0,05).

5. RESULTADOS

Todas as abreviaturas utilizadas nos gráficos na apresentação dos resultados estão relacionadas na Tabela 5.

Lip	–	Lipossomas
ASO	–	Asolecitina de Soja
PC	–	Fosfatidilcolina
Mic	–	Microssomas
C	–	Cérebro de Rato
F	–	Fígado de Rato
HC	–	Homogenato de Cérebro
Asc[•]	–	Radical Ascorbil
[•]OH	–	Radical Hidroxil
ONOO⁻	–	Ânion Peroxinitrito
DPPH[•]	–	Radical 1,1-Difenil-2-picril hidrazina
NO[•]	–	Radical Óxido Nítrico
XO	–	Xantina Oxidase
nNOS	–	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
MPO	-	Mieloperoxidase

Tabela 5. Abreviaturas utilizadas nos gráficos

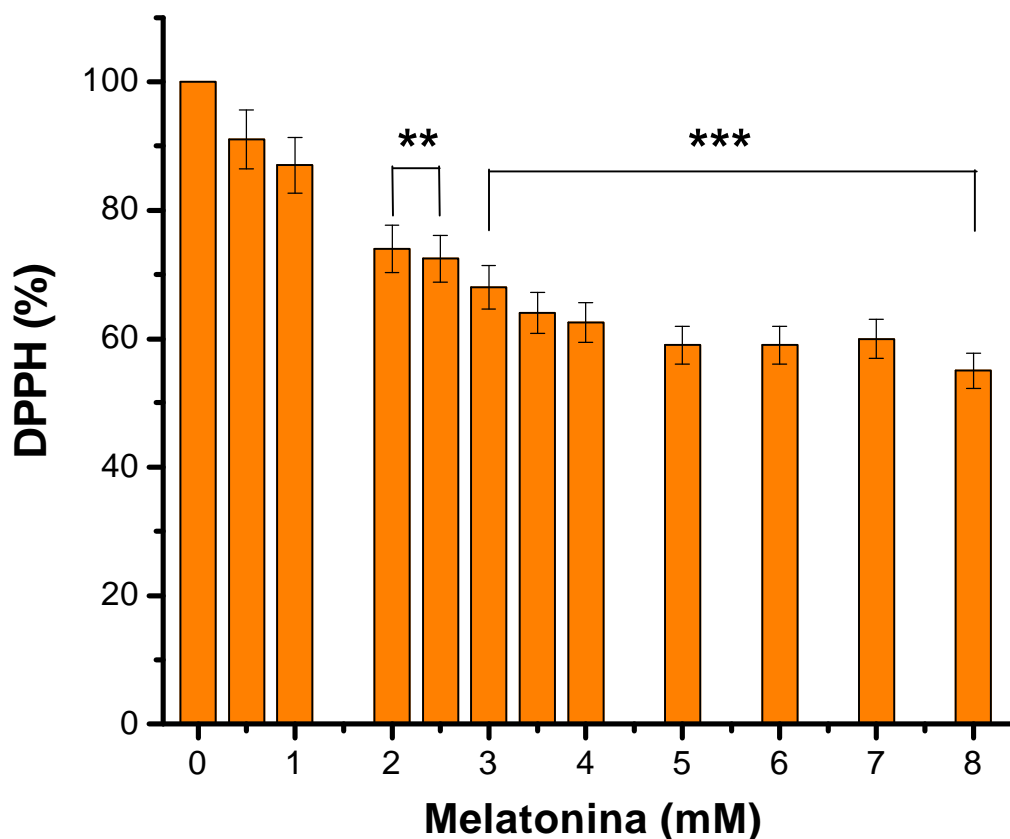


Figura 1. Efeito da melatonina sobre o radical livre DPPH. O radical DPPH foi incubado por 30 min na ausência (100% DPPH) e na presença de melatonina, nas concentrações indicadas na figura. A análise espectrofotométrica foi realizada em 517nm. O resultado está expresso pela média \pm SD de triplicatas ($n = 6$) quando comparado com o controle 100% de DPPH. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Na Figura 1 estão representados os dados relacionados à reatividade da melatonina, nas concentrações indicadas na figura com o radical DPPH. Observa-se que a absorção do DPPH não diminui com o aumento da concentração de melatonina até 8 mM e que o efeito máximo alcançado pela melatonina foi atingido na concentração de 4 mM como podemos verificar no gráfico. A IC_{50} não foi calculada, uma vez que o máximo de redução de DPPH alcançada foi 45%, todavia os resultados foram estatisticamente significantes.

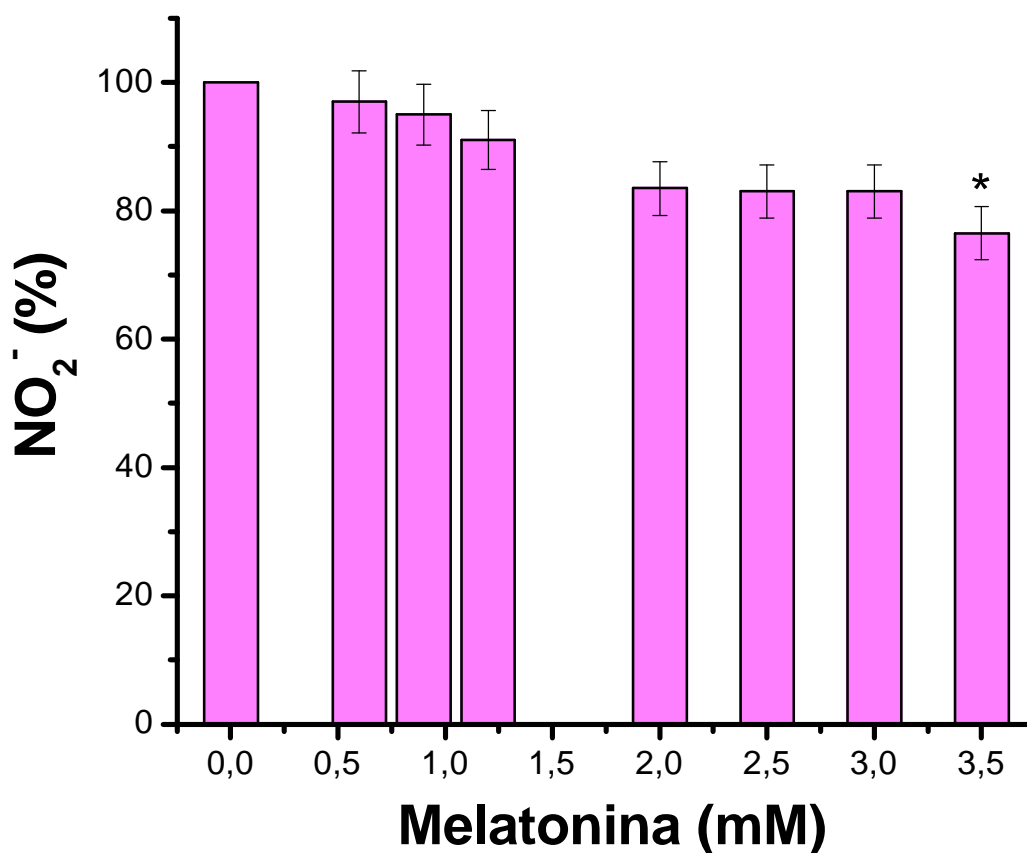


Figura 2. Efeito da melatonina sobre o radical óxido nítrico (NO[•]). O radical NO[•] foi produzido pela incubação de nitroprussiato de sódio (doador de NO[•]) em temperatura ambiente. A liberação de NO[•] na reação foi quantificada indiretamente pela percentagem de íons nitrito (NO₂⁻) formados no meio de reação na ausência (controle 100%) e na presença de melatonina, calculados a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) e analisado espectrofotometricamente a 543nm. O resultado está expresso pela média ± SD de triplicatas (n = 4) quando comparado com o controle 100% de íons nitrito formados.

Observa-se na Figura 2 que houve uma pequena diminuição da percentagem de íons nitrito formados em relação ao aumento das concentrações de melatonina, como mostrado no gráfico. Apesar de não ter atingido a IC₅₀, o resultado apresentou significância $P < 0,05$ quando

considerado a concentração de 3,5mM em comparação com o controle. A IC₅₀ não foi determinada, pois a melatonina apresentou baixa reatividade com NO^{*}, não atingindo os 50% de inibição.

5.1. Análise da Ação da Melatonina Frente à Peroxidação Lipídica

A ação da melatonina foi testada contra a peroxidação lipídica em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina de soja, microssomas de cérebro e fígado de ratos, e homogeneizado de cérebro de ratos. A peroxidação lipídica foi induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito, detectado em todos os casos pelo método de TBARS.

A Figura 3 ilustra a atividade antioxidante da melatonina contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil, ascorbil e ânion peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina (PC). A reação inicia-se após a incubação dos lipossomas por 30 min, seguido da adição de ácido tricloroacético (TCA 12%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 0,73%) em cada amostra, e novamente incubado a 100°C por mais 30 min. As concentrações de melatonina utilizadas variam na faixa de 0,045 mM-0,9 mM para hidroxil, 0,15 mM-1,8 mM para ascorbil e 0,45 mM-0,9 mM para peroxinitrito. As curvas dose-resposta demonstram que houve uma significativa redução da LPO à medida que as concentrações de melatonina foram aumentadas, para as três espécies reativas utilizadas, quando comparado com o controle 100%. Todavia observa-se que a melatonina apresenta uma maior capacidade de proteção contra a ação do radical hidroxil e menor contra a ação do peroxinitrito, sendo a membrana de PC o alvo da peroxidação.

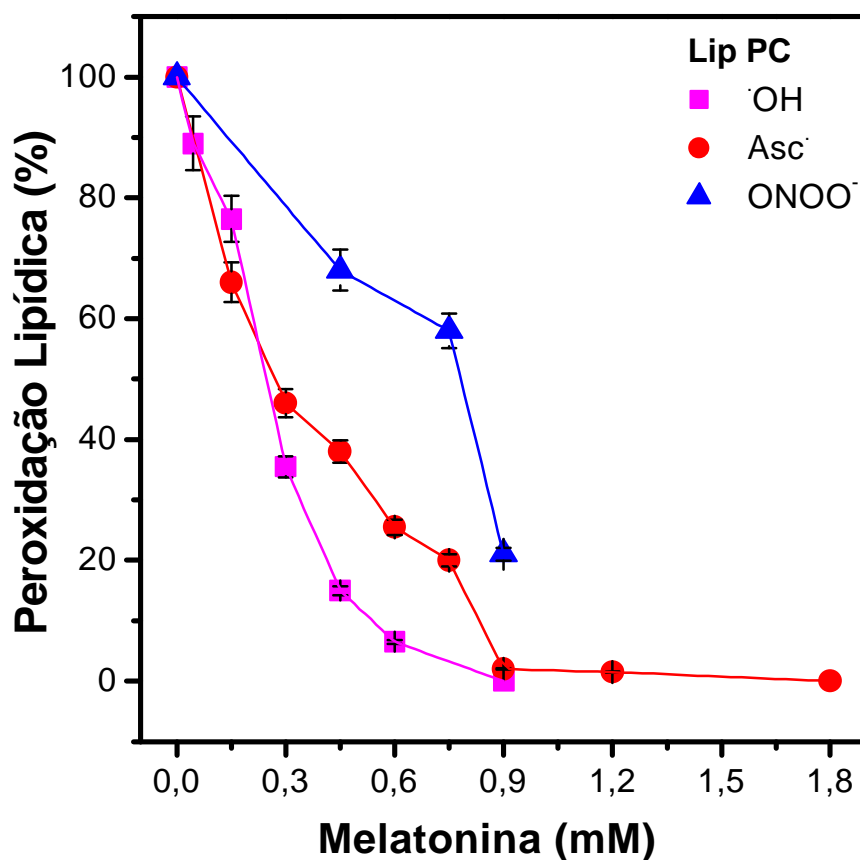


Figura 3. Efeito da melatonina em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito. Os radicais hidroxil e ascorbil foram gerados pelos sistemas Fe/H₂O₂/ ácido ascórbico e Fe/ ácido ascórbico, respectivamente. O peroxinitrito foi adicionado posteriormente à sua preparação. A concentração de fosfolípídeo nos três casos foi mantida em 2,5 mg/mL analisados espectrofotometricamente a 535 nm, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos pela média ± SD de triplicatas dos experimentos, comparado com o controle 100% de peroxidação lipídica (n = 6 para hidroxil, n = 3 para ascorbil e n = 3 para peroxinitrito). () Radical Hidroxil; (●) Radical Ascorbil; (▲) Ânion Peroxinitrito.

A Figura 4 ilustra a atividade antioxidante da melatonina contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito em lipossoma de asolecitina de soja (ASO). Neste caso, também observa-se uma significativa redução da peroxidação lipídica à medida que aumentamos as concentrações de melatonina (variam na faixa de 0,15 mM-1,2 mM para hidroxil, 0,1 mM-2,0 mM para ascorbil e 0,15 mM-0,9 mM para peroxinitrito), para as três espécies reativas testadas quando comparado com o controle de 100% de peroxidação lipídica. Neste tipo de membrana (ASO), como na membrana de PC, a melatonina apresentou maior capacidade de proteção contra a ação do radical hidroxil e neste caso menor contra o radical ascorbil.

A Figura 5 mostra o efeito protetor da melatonina contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito em microsomas de cérebro de ratos. O gráfico representado na Figura 5, indica que a peroxidação lipídica diminuiu à medida que as concentrações de melatonina foram aumentadas para as espécies reativas testadas. Estes resultados demonstram claramente através da curva dose-resposta, o potencial antioxidante *in vitro* da melatonina, sendo que, a concentração de melatonina utilizada para cada espécie reativa foi 0,1 mM-1,2 mM para hidroxil, 0,3 mM-2,2 mM para ascorbil e 0,3 mM-1,2 mM para peroxinitrito. Entretanto, da mesma maneira que em lipossomas de PC e ASO a ação protetora maior da melatonina contra o radical hidroxil, não apresentando diferença de reatividade contra o radical ascorbil e ânion peroxinitrito.

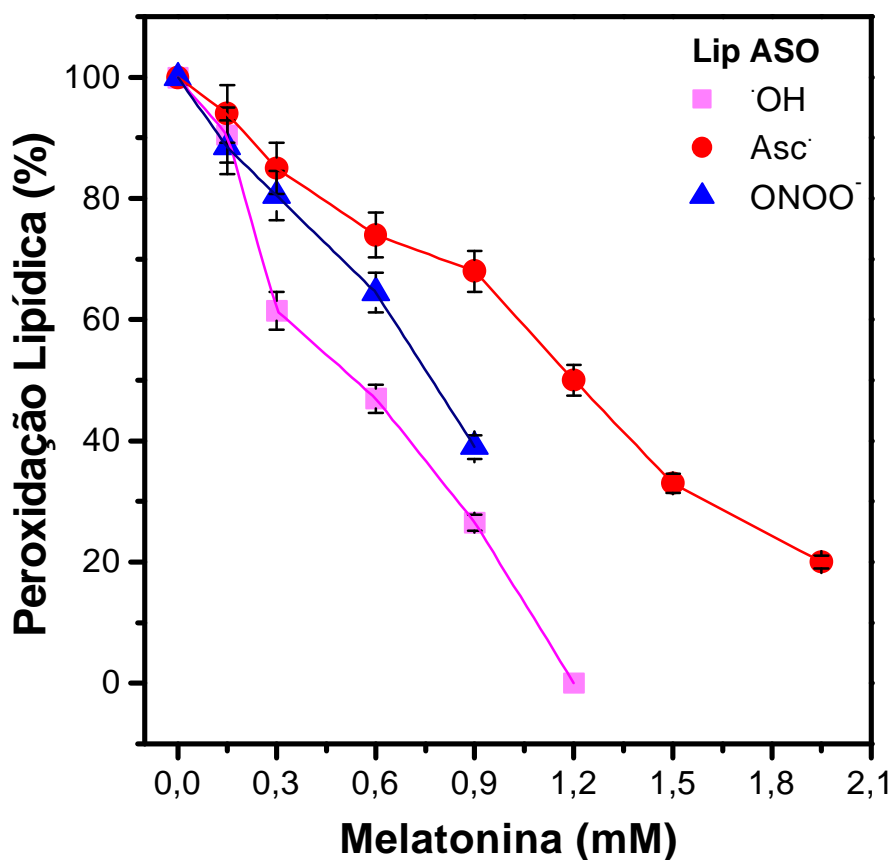


Figura 4. Efeito da melatonina em lipossomas de solecitina de soja (ASO) sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito. As concentrações de melatonina estão representadas no gráfico e a concentração de fosfolípido nos três casos foi mantida em 2,5 mg/mL. Os radicais hidroxil e ascorbil foram gerados pelos sistemas Fe/H₂O₂/ácido ascórbico e Fe/ácido ascórbico respectivamente. O peroxinitrito foi adicionado posteriormente à sua preparação, sendo que todas as espécies reativas foram analisadas espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados estão expressos pela média \pm SD de triplicatas dos experimentos quando comparado com o controle 100% de peroxidação lipídica, com n variável de acordo com cada experimento (n = 5 para hidroxil, n = 4 para ascorbil e n = 3 para peroxinitrito). () Radical Hidroxil; (●) Radical Ascorbil; () Ânion Peroxinitrito.

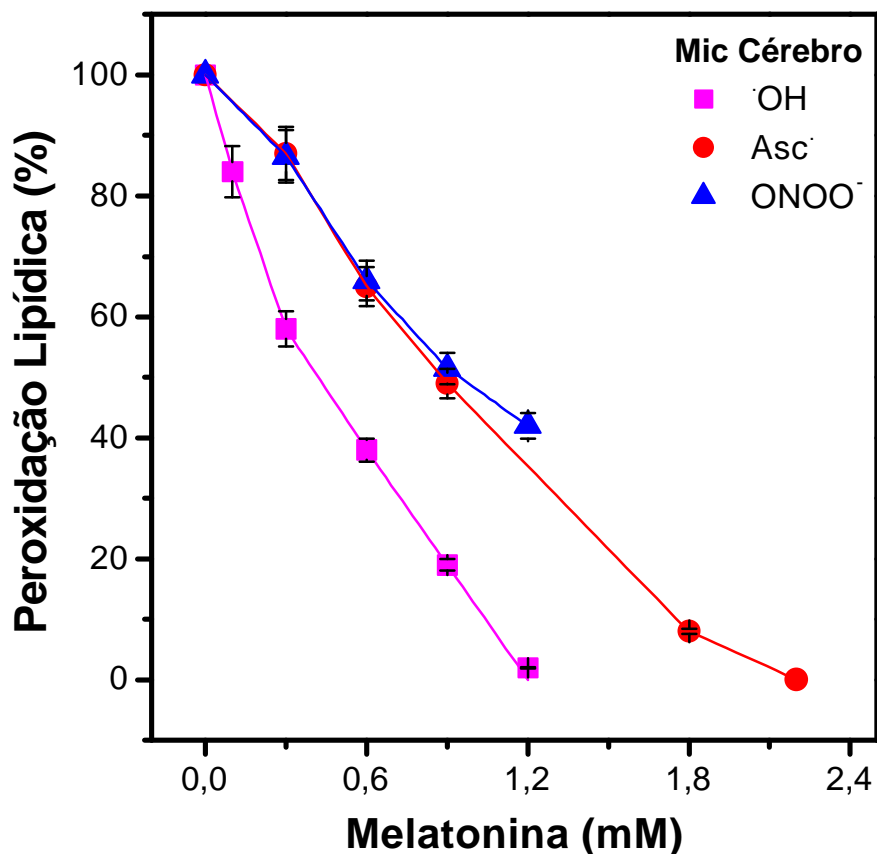


Figura 5. Efeito da melatonina em microssomas de cérebro de ratos sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito. Os radicais hidroxil e ascorbil foram gerados pelos sistemas $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2/$ ácido ascórbico e $\text{Fe}/$ ácido ascórbico respectivamente. O peroxinitrito foi ensaiado em uma concentração de 2,64 mM adicionado posteriormente. A concentração de microssoma de cérebro nos três casos foi mantida em 2,0 mg/mL analisados espectrofotometricamente a 535 nm pelo método de TBARS. Os resultados estão expressos pela média \pm SD ($n = 3$) quando comparado com o controle de 100% de peroxidação lipídica. () Radical Hidroxil; (●) Radical Ascórbil; (▲) Ânion Peroxinitrito.

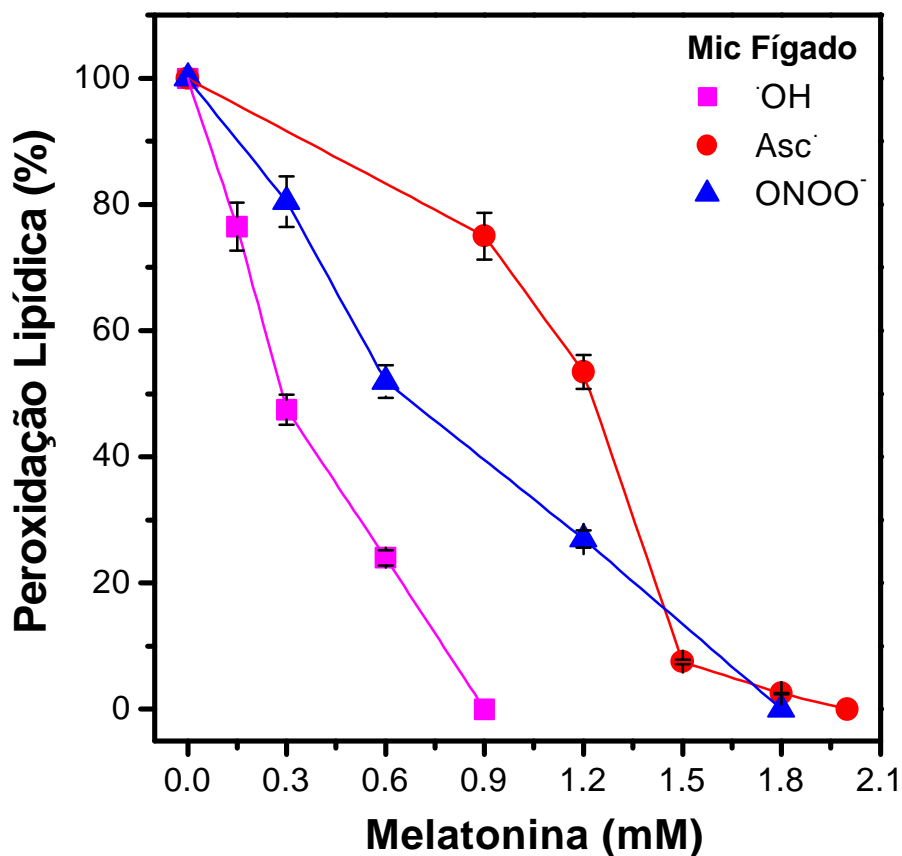


Figura 6. Efeito da melatonina em microsomas de fígado de ratos sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito. As concentrações de melatonina estão representadas no gráfico e a concentração de microsoma de cérebro nos três casos foi mantida em 2,0 mg/mL. Os radicais hidroxil e ascorbil foram gerados pelos sistemas Fe/H₂O₂/ ácido ascórbico e Fe/ ácido ascórbico respectivamente. O peroxinitrito foi adicionado posteriormente e todos experimentos analisados espectrofotometricamente a 535 nm pelo método de TBARS. Os resultados estão expressos pela média \pm SD (n = 3) quando comparado com o controle de 100% de peroxidação lipídica. () Radical Hidroxil; (●) Radical Ascorbil; (▲) Ânion Peroxinitrito.

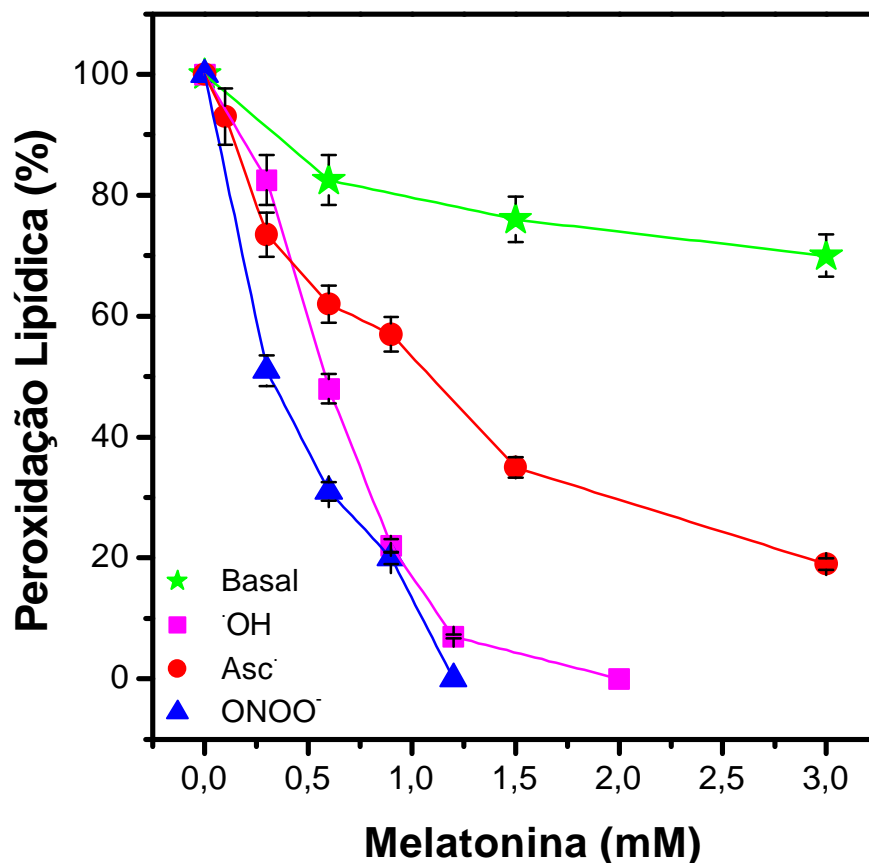


Figura 7. Efeito da melatonina em homogenato de cérebro de rato sobre a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil, e ânion peroxinitrito. Os radicais hidroxil e ascorbil foram gerados pelos sistemas Fe/H₂O₂/ ácido ascórbico e Fe/ ácido ascórbico respectivamente, e o peroxinitrito foi adicionado posteriormente após sua preparação. A concentração homogenato de cérebro foi mantida nos quatro casos em 2 mg/mL de proteína. No gráfico a peroxidação basal significa a oxidação do O₂. A peroxidação lipídica foi analisada em 535 nm pelo método de TBARS. Os resultados estão expressos pela média ± SD (n = 3) quando comparado com o controle de 100% de peroxidação lipídica.

A Figura 6 mostra o efeito protetor da melatonina contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito em microsomas de fígado de ratos. Observa-se que a peroxidação lipídica diminuiu significativamente nos três casos analisados à medida que aumentamos as concentrações de melatonina que variam na faixa de 0,15 mM-0,9 mM para hidroxil, 0,9 mM-2,0 mM para ascorbil e 0,3 mM-1,8 mM para peroxinitrito. Neste caso, a diferença de reatividade da melatonina contra as três espécies reativas são claramente diferentes, sendo mais reativa para o radical hidroxil, seguido do peroxinitrito e ascorbil respectivamente.

Como visto na Figura 7, a diminuição da peroxidação lipídica representada no gráfico, evidencia o efeito protetor da melatonina também em homogeneizado de cérebro. Os pontos representados em verde, indicam a oxidação basal ocorrida durante a realização do experimento, ou seja a oxidação dos lipídeos induzida somente pelo oxigênio molecular e não pelas espécies reativas testadas. O gráfico representado na Figura 7, indica que a peroxidação lipídica induzida pelas três espécies analisadas, diminuiu à medida que as concentrações de melatonina foram aumentadas, conforme as curvas dose-respostas obtidas. As concentrações de melatonina utilizadas nestes experimentos variaram na faixa de 0,3 mM-2,0 mM para hidroxil, 0,1 mM-3,0 mM para ascorbil e 0,3 mM-1,2 mM para peroxinitrito. Neste caso, a ação protetora da melatonina foi melhor contra o peroxinitrito e o hidroxil, sendo significativamente menor contra o radical ascorbil. Nesta mesma figura pode-se observar que a melatonina também é capaz de proteger as membranas contra oxidação causada pelo oxigênio molecular.

Na Tabela 6 estão resumidas todas as IC_{50} obtidas nas diferentes condições de peroxidação lipídica onde se pode avaliar claramente todos os resultados obtidos em conjunto. Foi utilizada para fazer estas comparações a análise de variância de duas vias, analisando as IC_{50} das membranas artificiais em comparação com as membranas naturais.

PARÂMETROS	HIDROXIL	ASCORBIL	PEROXINITRITO
Lipossoma de Asolecitina	0,53 ± 0,09mM	1,20 ± 0,03mM	0,77 ± 0,07mM
Lipossoma de Fosfatidilcolina	0,30 ± 0,05mM	0,28 ± 0,02mM	0,78 ± 0,08mM
Microssoma de Cérebro	0,43 ± 0,03mM	0,90 ± 0,03mM	0,93 ± 0,05mM
Microssoma de Fígado	0,30 ± 0,03mM	1,23 ± 0,13mM	0,65 ± 0,06mM
Homogenato de Cérebro	0,60 ± 0,10mM	1,09 ± 0,10mM	0,32 ± 0,10mM

Tabela 6. Tabela comparativa do efeito da melatonina em diferentes membranas lipídicas, para avaliação dos parâmetros de lipoperoxidação induzida por $\cdot\text{OH}$, $\text{Asc}\cdot$ e ONOO^- . Os resultados estão apresentados pela IC_{50} dos experimentos \pm desvio padrão (SD), apresentando como significativo $*P < 0,05$ (TWO-WAY)

As figuras 8, 9 e 10 mostram as comparações realizadas em membranas artificiais como lipossomas, compostos unicamente de lipídeos e membranas naturais que são compostas de lipídeos e proteínas contra a peroxidação lipídica causada pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito.

Vale salientar que as pequenas diferenças na composição lipídica de PC e de ASO já são suficientes para interferir na ação do antioxidante melatonina nas três espécies reativas testadas. Nestas membranas artificiais, o lipossoma de fosfatidilcolina foi melhor protegido pela melatonina contra o radical hidroxil conforme mostra a Figura 8A.

No caso das membranas naturais a diferença de reatividade fica destacada na ação da melatonina contra o ânion peroxinitrito conforme mostra a Figura 10B, sendo o homogeneizado de cérebro melhor protegido por este neurohormônio e também contra o radical hidroxil conforme mostra a Figura 8B, sendo o microssoma de fígado melhor protegido. Para todos os grupos testados, os resultados em relação aos dados de peroxidação lipídica foram analisados

separadamente para cada tipo de membrana (artificiais/naturais) comparando o efeito protetor da melatonina sobre cada espécies reativa testadas.

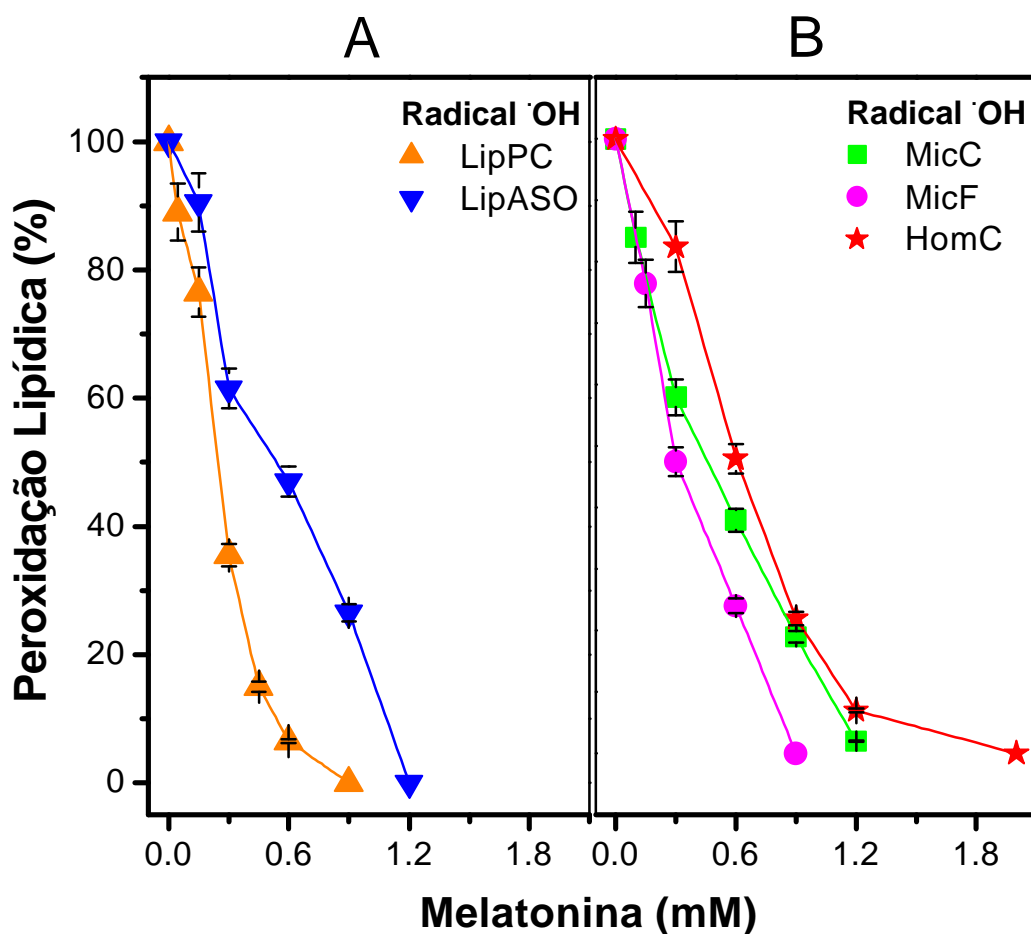


Figura 8. Comparação do efeito sequestrador da melatonina sobre a peroxidação lipídica induzida pelo radical hidroxil em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina, microsomas de cérebro e fígado de ratos, e homogenato de cérebro de ratos. O gráfico A representa as membranas artificiais em que se destaca a ação da melatonina sobre este radical em lipossoma de fosfatidilcolina. O gráfico B representa as membranas naturais em que a diferença de reatividade para este radical fica destacada microssoma de fígado. Os resultados estão expressos pela média \pm SD de triplicatas.

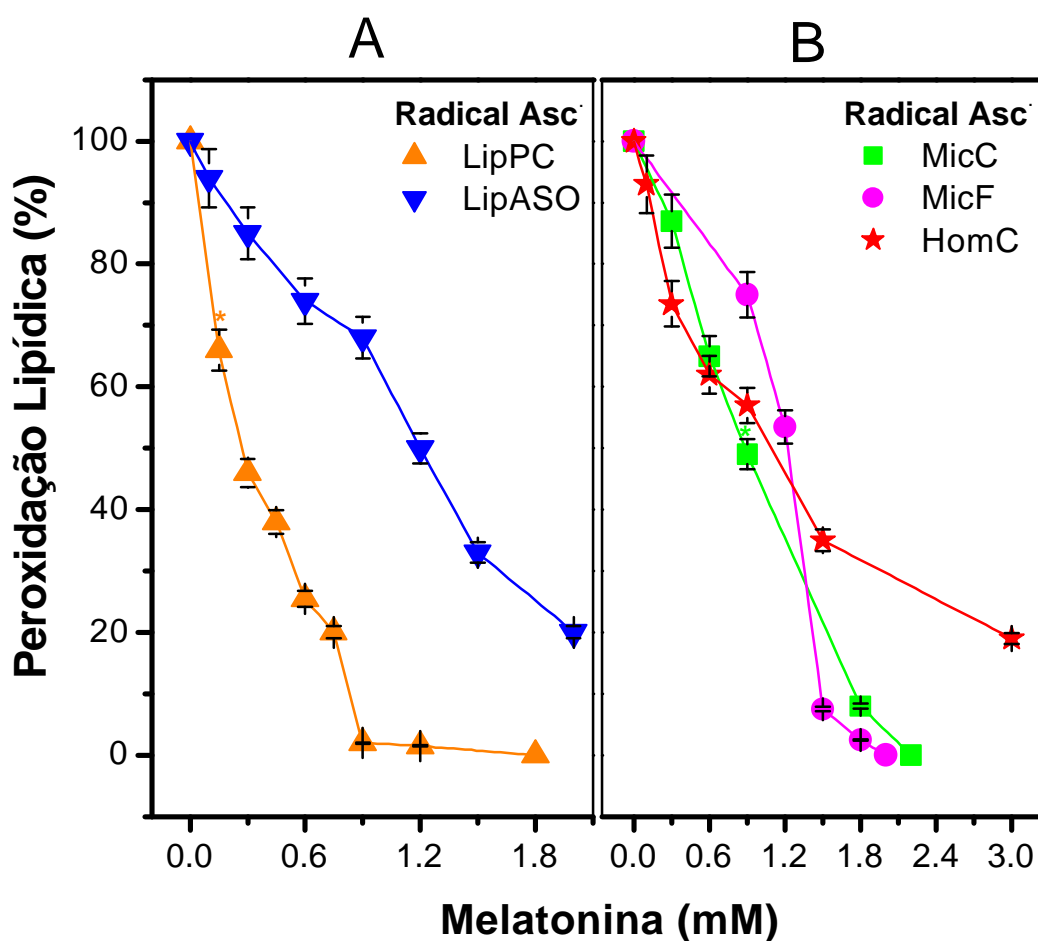


Figura 9. Comparação do efeito sequestrador da melatonina sobre a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina, microsomas de cérebro e fígado de ratos, e homogenato de cérebro de ratos. O gráfico A representa as duas membranas artificiais testadas, em que o lipossoma de fosfatidilcolina também se destaca sobre o radical ascorbil na ação da melatonina. O gráfico B representa as três membranas naturais testadas, em que ficam destacadas as reatividades na ação da melatonina contra este radical tanto para microsoma de fígado como para o de cérebro. Os resultados estão expressos pela média \pm SD de triplicatas.

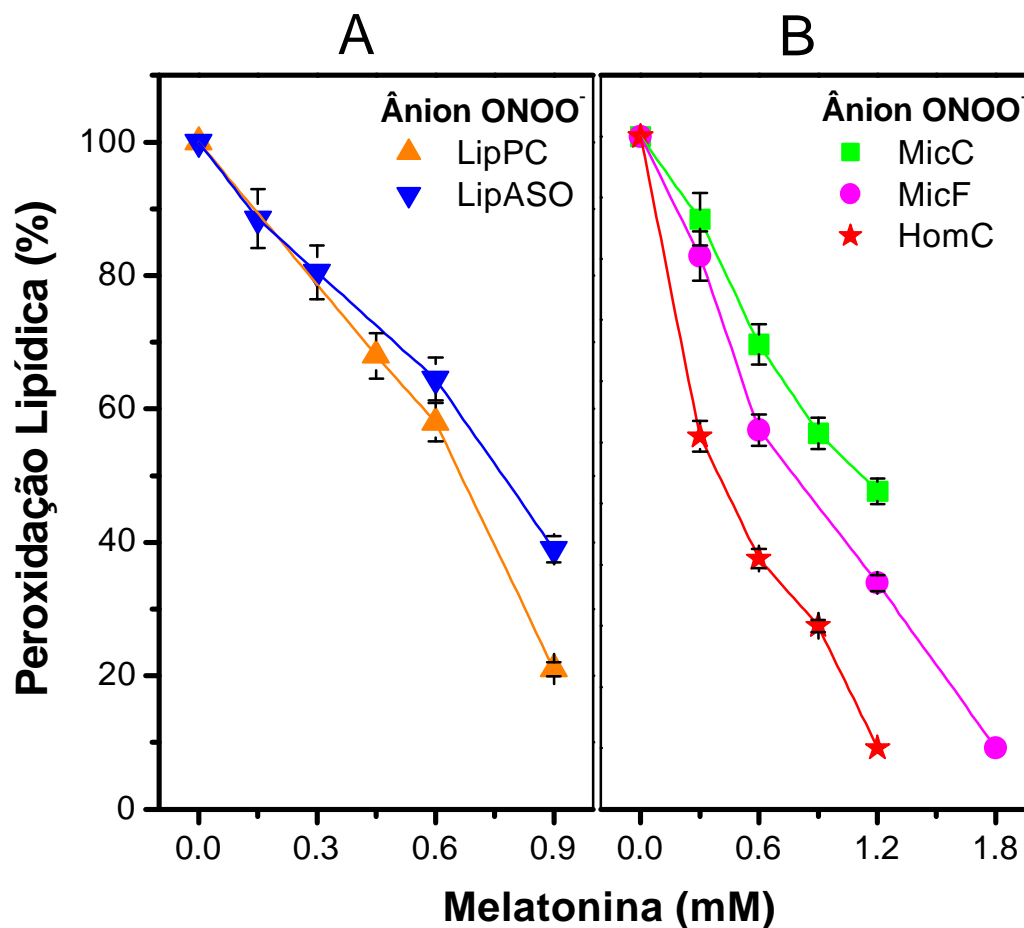


Figura 10. Comparação do efeito sequestrador da melatonina sobre a peroxidação lipídica induzida pelo ânion peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina, microsomas de cérebro e fígado de ratos, e homogenato de cérebro de ratos. O gráfico A representa o lipossoma de fosfatidilcolina e asolecitina contra o peroxinitrito, em que se nota uma pequena diferença entre a ação da melatonina nestas membranas. O gráfico B representa as membranas naturais em que a reatividade na ação da melatonina contra este radical se destaca para o homogenato de cérebro. Os resultados estão expressos pela média \pm SD de triplicatas.

5.2. Análise da Ação da Melatonina sobre Enzimas Pró-oxidantes

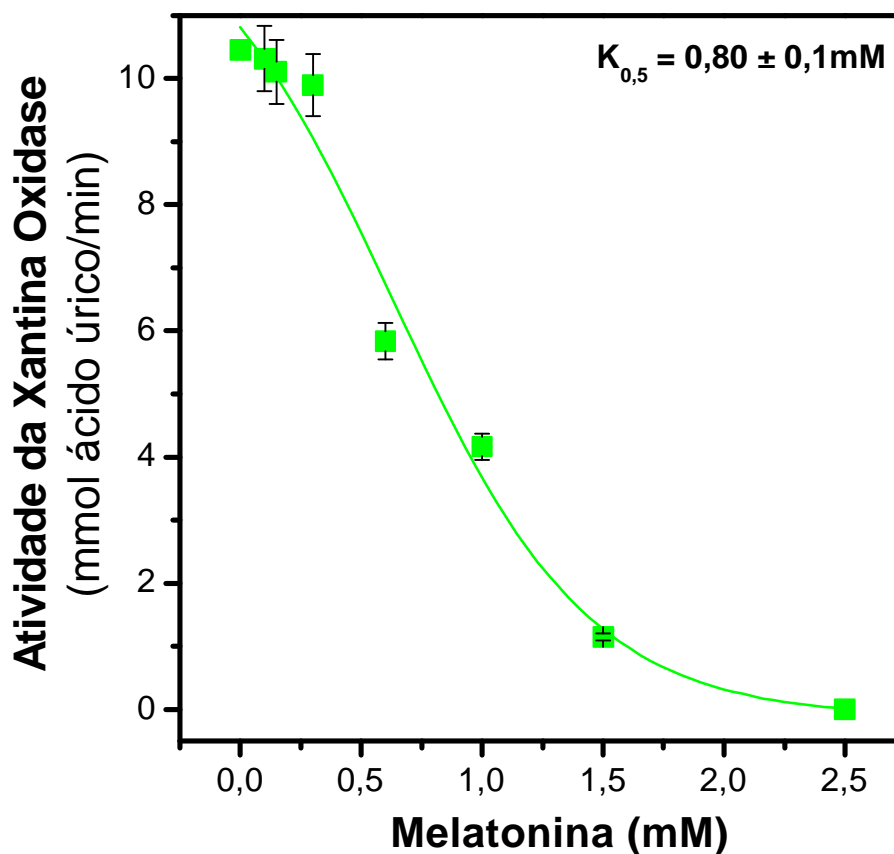


Figura 11. Efeito da melatonina na atividade da xantina oxidase (XO). A atividade da enzima XO foi medida pela detecção espectrofotométrica do ácido úrico a 295 nm, na ausência e na presença de melatonina nas concentrações indicadas na figura. A atividade foi calculada em mmol de ácido úrico /min. O resultado foi expresso pela média \pm SD (n = 4) quando comparado com o controle.

Na Figura 11 está representada a inibição da atividade da xantina oxidase pela melatonina. A XO foi incubada durante 60 segundos na ausência e na presença de melatonina nas

concentrações 0,10; 0,15; 0,30; 0,60; 1,0; 1,5 e 2,5 mM e avaliada através do coeficiente de extinção molar do ácido úrico = $9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Verificou-se que 100% da atividade enzimática (controle) foi $10,5 \pm 0,9 \text{ mmol ácido úrico/min}$ e que 2,5mM de melatonina foi suficiente para inibir completamente sua ação. A concentração de melatonina necessária para inibir 50% da atividade da XO foi de $0,80 \pm 0,1\text{mM}$.

Na Figura 12 está mostrado o efeito da melatonina sobre a atividade da nNOS que foi determinada através da relação entre a inclinação da reta formada após 10 minutos de incubação e um fator de conversão previamente calculado. Para calcular o fator de conversão foram realizadas duas curvas com diferentes concentrações de mioglobina reduzida, sendo que em uma delas a mioglobina foi completamente oxidada pela ação do ferrocianeto de potássio. O fator de conversão foi obtido através da variação da densidade óptica entre a mioglobina reduzida e a oxidada representada em um gráfico em que o eixo Y corresponde à variação da densidade óptica e o eixo X corresponde à concentração de mioglobina reduzida. Neste gráfico foi calculada a inclinação da reta formada que corresponde ao fator de conversão em DO/nmol de mioglobina. Partindo do princípio que 1 mol de NO oxida 1 mol de mioglobina a atividade da nNOS foi calculada pela relação entre a inclinação obtida no ensaio e o fator de conversão através da seguinte fórmula: $\text{Atividade nNOS} = \text{inclinação ensaio (DO/min)} / \text{fator de conversão (DO/nmol mioglobina)}$, sendo expressa em $\text{pmol de NO min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$. A concentração de melatonina necessária para inibir 50% da atividade da nNOS foi de $2,0 \pm 0,1\text{mM}$, em que 100% de atividade enzimática foi de $33 \pm 5 \text{ pmol NO/min/mg de proteína}$.

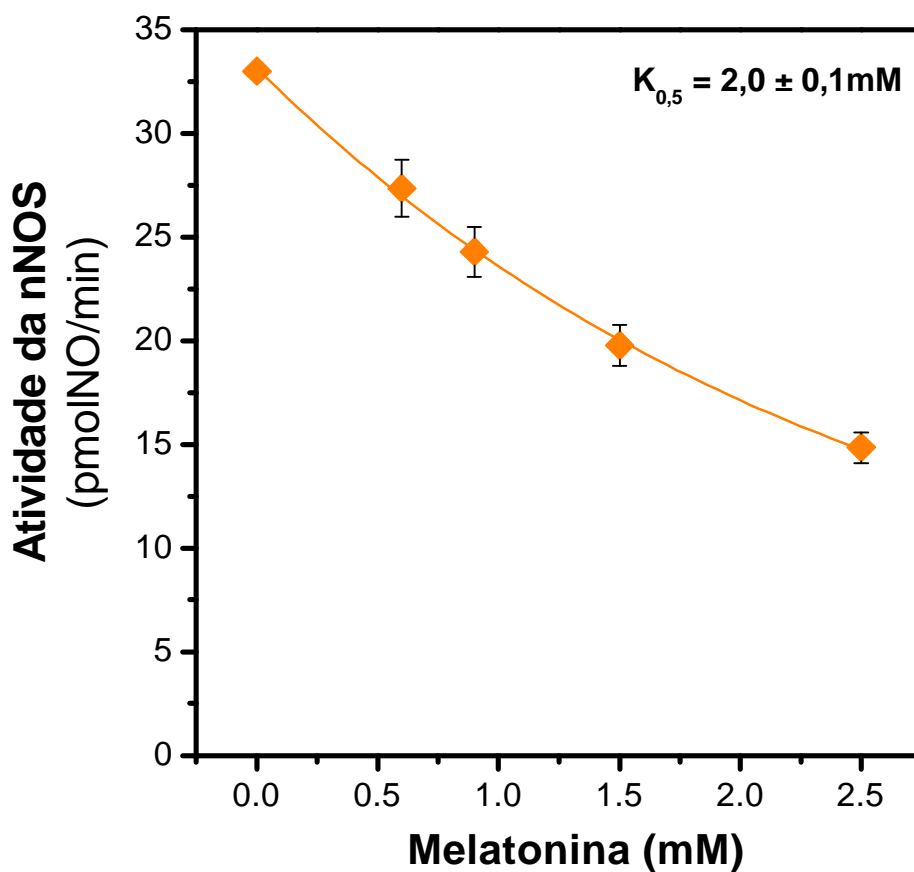


Figura 12. Efeito da melatonina na atividade da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) presente em homogenato de cerebelo de rato. A atividade enzimática da nNOS foi avaliada espectrofotometricamente, pelo monitoramento da oxidação da mioglobina a 405 nm. A reação foi iniciada pela adição de homogenato de cerebelo na ausência e na presença de melatonina, nas concentrações indicadas no gráfico. O resultado está expresso pela média \pm SD (n = 3) quando comparado com o controle.

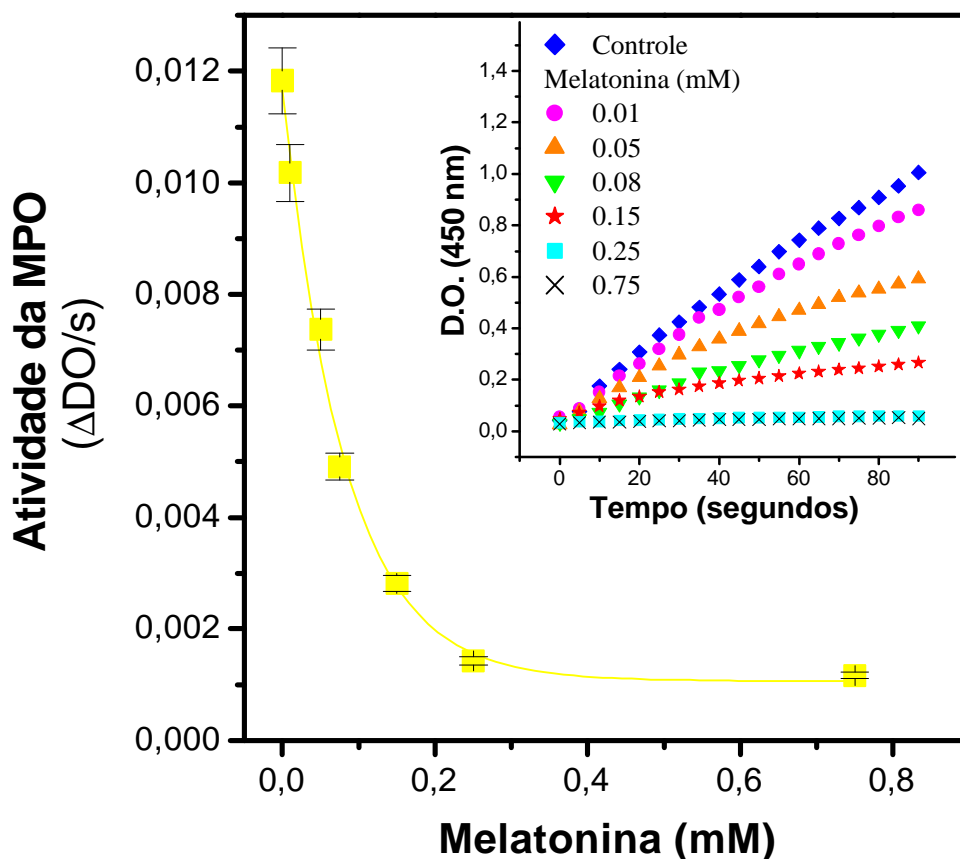


Figura 13. Efeito da melatonina na atividade da mieloperoxidase (MPO) presente em pulmão de rato. A atividade enzimática foi avaliada espectrofotometricamente a 450 nm através da formação do ácido hipocloroso a partir de H_2O_2 e o-dianisidina-HCl presente no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 5 μ L de homogenato de pulmão de rato na ausência e na presença de melatonina, nas concentrações indicadas na figura. O gráfico inserido representa a cinética da enzima MPO (90 segundos) e a sua inibição pela melatonina. O potencial inibitório da melatonina sobre a enzima MPO está representado diretamente no gráfico. O resultado está expresso pela média \pm SD (n = 4) quando comparado com o controle.

A Figura 13 ilustra a inibição da atividade da MPO pela melatonina, expressa em $\ddot{A}DO/s$. A inibição foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de melatonina. Nesta mesma figura, também podemos observar a cinética da inibição da enzima (gráfico inserido) avaliada em intervalos de 5 segundos, durante 90 segundos, que foi determinada pela inclinação da reta formada após leitura da densidade óptica a 450nm.

A concentração de melatonina necessária para inibir 50% da atividade da MPO foi de $0,063 \pm 0,003mM$, em que 100% de atividade enzimática foi $4,0 \pm 1,0 U/min/mg$ de proteína.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura demonstrando o potencial antioxidante da melatonina. Primeiramente, foi analisada a reatividade da melatonina com o radical livre DPPH• (1,1-difenil-2-picril hidrazil). Verificou-se que a absorção diminuiu conforme a concentração de melatonina foi aumentada, resultando na sua descoloração medida espectrofotometricamente a 517 nm. Apesar dessa molécula apresentar baixa reatividade com esse radical não alcançando 50% de inibição como mostrado na Figura 1, em nosso laboratório tem-se observado que extratos de plantas, particularmente de flavonóides apresentam alta reatividade com o DPPH•. Todavia, o resultado apresentou significância nas concentrações que variam de 2,0 mM à 8 mM, visto que a melatonina apresenta reatividade com outras espécies reativas como por exemplo o radical hidroxil e ânion peroxinitrito.

Neste trabalho, também foi analisada a ação seqüestradora da melatonina com o radical óxido nítrico (NO•) como mostrado na Figura 2. O radical NO• foi gerado quimicamente pelo nitroprussiato de sódio (NaNPS), doador de NO•, que serve para liberar a molécula que é quantificada indiretamente pela formação de íons nitrito. Foi evidenciado que a melatonina apresentou um fraco efeito com o radical NO•, tendo como resultado significativo somente na concentração de 3,5 mM. Embora, essa molécula tenha demonstrado pequena ação seqüestradora deste radical em nossos experimentos, é importante mencionar que um efeito de 20% de inibição pode ser importante em determinados momentos metabólicos como no caso da pré-eclâmpsia, hipóxia fetal e/ou isquemia de reperfusão, que o NO• funciona como vasodilatador (WAKATSUKI & OKATANI, 2000).

De acordo com Noda, Pozo, Reiter e colaboradores a melatonina seqüestra diretamente o radical NO^\bullet (POZO et al., 1997; NODA et al., 1999; REITER, 1998). Escames e colaboradores (1997) também afirmam que a melatonina é capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida pelo radical NO^\bullet em homogeneizado de cérebro de rato (ESCAMES et al., 1997).

O óxido nítrico é uma molécula mensageira que exerce uma variedade de funções nos mais diversos sistemas biológicos. Entre as funções postuladas ao óxido nítrico podem ser citadas: o controle do fluxo sanguíneo e da pressão arterial, através de sua ação vasodilatadora, a modulação da resposta inflamatória no sistema imunológico, e a neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (AOKI et al., 1995).

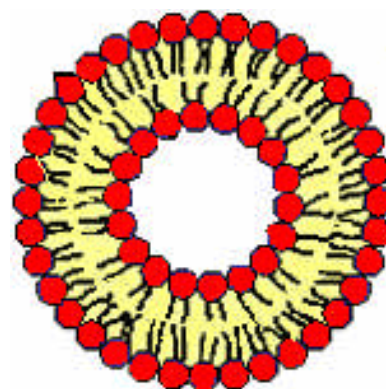
No cérebro, a liberação de NO^\bullet é ativada por um influxo de cálcio estimulando a enzima nNOS a partir da ligação do glutamato (aminoácido excitatório cerebral mais importante) com seus receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e não NMDA) e/ou receptores metabotrópicos. Alguns estudos sugerem que o NO^\bullet pode atuar como um mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando ao neurônio pré-sináptico, onde ativa a enzima guanilato ciclase. Esta enzima catalisa a reação de produção do GMPc (guanosina monofosfato cíclico) a qual vai desencadear o processo resultante na liberação do glutamato, reiniciando o ciclo. Este processo cíclico fortalece o contato sináptico contribuindo para o processo de aprendizado e formação de memória a longo prazo (LTP). A destruição neuronal em decorrência de um acidente vascular cerebral (AVC) ocorre devido a uma liberação excessiva de glutamato, que, através de sua ação sobre os receptores NMDA, proporciona a produção de grande quantidade de NO^\bullet , resultando na apoptose neuronal e geração de espécies reativas que causam um dano cerebral progressivo (KISS et al., 2000; CHANG et al., 2000). Portanto, a diminuição na síntese do NO^\bullet é um evento positivo quando o organismo está num estado de

estresse oxidativo em que a superprodução deste radical provoca a conseqüente produção de outros, principalmente do peroxinitrito. Sugere-se que a melatonina reduza, em modelos de inflamação, a formação dessas moléculas (CUZZOCREA & REITER, 2001-2002).

O modelo de membranas *in vitro* utilizado em nosso trabalho, permitiu avaliarmos as diferentes constituições lipídicas que podem responder diferentemente contra a ação de EROs e ERNs e em favor de um antioxidante. Neste sentido foi avaliado o potencial protetor da melatonina frente à peroxidação de várias preparações de membranas. Utilizaram-se membranas artificiais na forma de lipossomas (PC/ASO) e membranas naturais (MicC, MicF e HC). A peroxidação lipídica foi induzida pelos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito. Além de lipossomas, foram escolhidos o cérebro e o fígado de ratos para análise comparativa, por serem órgãos que sofrem estresse oxidativo com freqüência uma vez que são ricos em ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Atualmente, modelos de lipossomas e microsomas são geralmente aceitos para estudar o efeito dos radicais livres sobre as membranas, principalmente quando são formadas por uma bicamada lipídica estruturalmente similar à matriz lipídica das células (CASTELLI et al., 1997).

Esquema 11. Esquema representativo da bicamada lipídica (CASTELLI et al., 1997).



A composição lipídica e o estado físico das membranas são muito importantes, pois estão relacionadas com a conformação e atividades de enzimas e receptores que podem estar ligados as sinalizações celulares (YIN et al., 1998). Os lipídeos que fazem parte das membranas biológicas também podem ser modificados quimicamente pelas EROs e ERNs, alterando a permeabilidade da membrana ao cálcio (Ca^{2+}), danificando proteínas com conseqüente ativação de fosfodiesterases e eventual ruptura da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; REITER, 1998).

A atividade antioxidante da melatonina como seqüestradora de hidroxil, ascorbil e peroxinitrito em LipPC e em LipASO, foi evidenciada na Figura 3 e na Figura 4, respectivamente. A maior capacidade de proteção da melatonina nessas membranas artificiais foi contra a ação do radical hidroxil que é extremamente deletério para as células, podendo reagir facilmente com vários alvos e causar dano no DNA e em proteínas, como também peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em membranas naturais (MicC/MicF), da mesma maneira que em lipossomas (PC/ASO) foi observado o efeito protetor da melatonina também contra o radical hidroxil, como mostrado nas Figuras 5 e 6. A melatonina apresentou uma drástica diminuição da peroxidação lipídica com três espécies reativas testadas. Todavia, é importante ressaltar que a melatonina foi um excelente protetor diminuindo a oxidação causada pelas três espécies reativas testadas em diferentes membranas lipídicas, embora com diferentes potenciais.

Foi possível observar na Figura 7, que a melatonina promove a regeneração da lipoperoxidação basal em homogeneizado de cérebro (HC) de rato, provavelmente causada pelo oxigênio molecular durante a realização do experimento. Pode-se evidenciar também na Figura 7 que a melatonina protegeu o HC, diminuindo a oxidação induzida pelos três oxidantes testados. Neste tipo de membrana natural a melatonina apresentou maior capacidade de proteção contra a

ação do peroxinitrito e menor contra o radical hidroxil e ascorbil, diferenciando-se das outras membranas testadas.

Esses resultados confirmaram que a melatonina teve um efeito protetor contra a ação de EROs e ERNs nos três diferentes tipos de preparação das membranas lipídicas: nos lipossomas, em que os fosfolipídeos usados foram 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (componente majoritário do cérebro) e asolecitina de soja (fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina); nos microsomas (cérebro e fígado), em que o elemento majoritário é a membrana do retículo endoplasmático; e finalmente no homogenato de cérebro, em que as membranas apresentam, embora baixas, algumas defesas antioxidantes endógenas naturais.

Tendo em vista, que o sistema nervoso central é relativamente pobre em proteção e altamente susceptível aos constantes ataques por EROs e ERNs, pela sua grande necessidade de obter oxigênio e pela grande quantidade de ferro, ácido ascórbico e lipídios facilmente oxidáveis, a melatonina tem se mostrado fortemente eficaz no combate ao efeito deletério dessas espécies reativas (REITER, 1998).

Nos gráficos comparativos apresentados nas Figuras 8, 9 e 10, utilizamos várias membranas para compararmos o efeito individualmente com cada espécie reativa testada, em que demonstramos claramente as IC_{50} s na Tabela 6, salientando que a melatonina protegeu eficazmente os diferentes tipos de constituições lipídicas. Estas evidências acumuladas, nas quais a melatonina atuaria como antioxidante seqüestrando hidroxil, ascorbil e peroxinitrito, conduziu o presente estudo do seu envolvimento na proteção de membranas com diferentes constituições lipídicas. De fato, neste trabalho foi possível observar que a preparação de membranas artificiais é um ótimo modelo para testar a peroxidação lipídica contra diversas espécies reativas, facilitando com isso a diminuição na utilização das membranas naturais, visto o seu similar efeito com a melatonina.

Nas membranas naturais destacou-se a diferença de reatividade na ação da melatonina contra o ânion peroxinitrito conforme mostra a Figura 10B, sendo o homogeneizado de cérebro melhor protegido por este neurohormônio e no microsoma de fígado sendo o melhor protegido pela melatonina contra o radical hidroxil conforme mostrou a Figura 8B. De fato, a melatonina preveniu com potenciais diferentes a lipoperoxidação, na seguinte ordem de eficiência: LipPC < MicF < MicC < LipASO < HC para hidroxil, LipPC < MicC < HC < LipASO < MicF para ascorbil e HC < MicF < LipASO < LipPC < MicC para peroxinitrito.

Devido ao importante papel antioxidante da melatonina mostrado na literatura, estudamos também o envolvimento da melatonina sobre enzimas pró-oxidantes como xantina oxidase (XO), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e mieloperoxidase (MPO), a fim de verificar as inibições de suas atividades.

A maior função da xantina oxidase é catalisar a oxidação da hipoxantina e xantina para ácido úrico, em consequência é produzido também o radical ânion superóxido (SIMIC & JOVANOVIC, 1989). O ácido úrico é encontrado no organismo como urato e embora apresente propriedades antioxidantes tem baixa solubilidade em água cristalizando-se facilmente. Esta cristalização provoca inflamação nas articulações, o que acontece em doenças reumáticas como gota (SIMIC & JOVANOVIC, 1989).

Em nossos experimentos a atividade da xantina oxidase foi avaliada pela oxidação da xantina em superóxido e ácido úrico, como foi mostrado na Figura 11. A melatonina inibiu a enzima xantina oxidase (XO) com baixa afinidade, uma vez que o $K_{0,5}$ foi de $0,80 \pm 0,1\text{mM}$. Todavia, não podemos descartar a possibilidade da melatonina seqüestrar o superóxido por outro mecanismo, uma vez que foi capaz de inibir a xantina oxidase consequentemente pode corroborar com a diminuição da superprodução desse radical (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988; VIVOT et

al., 2001). Segundo Albarrán a melatonina também pode potencializar a dismutação do superóxido ativando a enzima superóxido dismutase (SOD) (ALBARRÁN et al., 2001).

Existem diversas isoformas da NOS, que são classificadas em dois grupos. As óxido nítrico sintases constitutivas (cNOS), sintetizadas pelas células endoteliais (eNOS) e neuronais (nNOS). Estas enzimas são dependentes do complexo cálcio-calmodulina, e produzem NO• em pequenas quantidades, para funções delicadas como a regulação da pressão arterial e neurotransmissão, respectivamente. E a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sintetizada por células como os macrófagos ativados, por exemplo, na resposta a estímulos externos, produzindo NO• em quantidades relativamente maiores para funções como a defesa celular (WINK et al., 1998; AOKI et al., 1995).

A nNOS ou cnNOS, é expressa principalmente no sistema nervoso central e periférico, e também em outros tecidos, tais como, músculo esquelético, mácula densa e placenta (KISS et al., 2000; CHANG et al., 2000). A eNOS ou ceNOS é encontrada principalmente nas células endoteliais vasculares e é ativada por estímulos hormonais ou físicos. O NO• produzido por esta isoforma provoca o relaxamento da musculatura dos vasos sanguíneos e inibe a adesão e agregação plaquetária (AOKI et al., 1995). A iNOS é induzida por condições inflamatórias, principalmente devido à presença de endotoxinas e citocinas (AOKI et al., 1995).

A melatonina é capaz de reduzir a síntese da iNOS, produzida após a migração e ativação dos neutrófilos em diferentes modelos experimentais (CUZZOCREA & REITER, 2001) e também regular a atividade da NOS, unindo-se a calmodulina impedindo que o complexo cálcio-calmodulina ative a enzima nNOS, potencializando a produção de AMPc e conseqüentemente causando vasodilatação.

De acordo com essas observações, a melatonina exerce uma dupla proteção contra as ações deletérias do NO[•], uma vez que ela inibe a atividade da enzima NOS e seqüestra peroxinitrito (CUZZOCREA & REITER, 2001; BLANCHARD et al., 2000). Entretanto, a melatonina também pode reduzir a expressão de NADPH-d / NOS neuronal em gânglio nodoso (CHANG et al., 2002) e inibir a atividade da NOS em várias estruturas cerebrais (BETTAHI et al., 1996-1998; POZO et al., 1997).

Nossos resultados corroboram com dados da literatura, mostrando o efeito da melatonina em homogeneizado de cerebelo de rato sobre a atividade da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na Figura 12. Neste tipo de membrana natural foi possível observar a inibição da atividade da cnNOS pela melatonina quando comparado com o controle 100%, sendo o $K_{0,5} = 2,0 \pm 0,1$ mM.

A ação antioxidante da melatonina também foi analisada pela sua ação inibindo a mieloperoxidase que tem um papel central na infecção e inflamação, e está presente na ativação de neutrófilos. A mieloperoxidase tem sido implicada em numerosas doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide, síndrome de sofrimento respiratório de adultos, esclerose múltipla, fibrose cística, dano de pulmão neonatal, dentre outras (KETTLE & WINTERBOURN, 2001). O processo inflamatório inicia-se com alterações na microcirculação que resultam em edema decorrente de vasodilatação arteriolar, aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos. Após a migração dos neutrófilos, estes passam a produzir as enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase induzível (COX₂), que são muito importantes na resposta inflamatória. A melatonina é capaz de reduzir a síntese dessas enzimas e de seus produtos em diferentes modelos experimentais (CUZZOCREA & REITER, 2001-2002).

Na Figura 13 foi mostrada a cinética de reação da mieloperoxidase, à medida que a concentração de melatonina foi aumentada ocorreu uma significativa inibição dessa enzima. O resultado foi representado pelo $K_{0,5} = 0,063 \pm 0,003\text{mM}$, em que 100% de atividade enzimática foi $4,0 \pm 1,0 \text{ U/min/mg}$ de proteína.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente principalmente nos grânulos azurofílicos em neutrófilos ativados (PMNs) e em menor quantidade nos lisossomas de monócitos em humanos. A atividade fisiológica predominante desta enzima é catalizar a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Cl^- em ácido hipocloroso (HOCl), o HOCl é 50 vezes mais potente para matar o microorganismo invasor que o H_2O_2 . Outra função importante dessa enzima inclui a produção de radical tirosil, com a geração da peróxido tirosina, mediante a adesão de células mielóides via $\beta 2$ -integrinas e oxidação de lipoproteínas do soro. Acredita-se também que a MPO possa estar envolvida no mecanismo de resposta inflamatória. (KETTLE & WINTERBOURN, 2001; MARQUEZ & DUNFORD, 1996).

Estudos promissores demonstram que a baixa produção de melatonina poderia induzir um estado de imunodepressão e estar associado à causa de inúmeras doenças (REITER, 1998). Pois, uma pessoa sob estresse produz normalmente mais adrenalina e cortisol. Para cada molécula de adrenalina formada, quatro moléculas de radicais livres são produzidas aumentando a probabilidade de lesão celular (peroxidação lipídica). Além disso, a melatonina teria o papel de reduzir o acúmulo de radicais livres nos tecidos, combater doenças neurodegenerativas, prevenir o envelhecimento celular e conseqüentemente algum tipo de câncer (principalmente o câncer de mama), diminuir alterações fotoperiódicas, ajustar o relógio biológico, combater insônia e tratar algumas imunodeficiências adquiridas, inclusive a AIDS (CUZZOCREA & REITER, 2001, JIMENEZ et al., 2001).

A maioria dos antioxidantes não atravessam a barreira hemato-encefálica e não conseguem impedir a destruição dos neurônios pelos oxidantes (REITER, 1998).

Esse neurohormônio apresenta muito baixa toxicidade e é bem tolerado pelo organismo de mamíferos (REITER et al.,2000b-2001b), pois raramente ocorrem efeitos adversos (leve sonolência, vertigens, náuseas, fadiga, hipotermia e cefaléia) quando administrado como fármaco.

A proposta de sua utilização clínica está relacionada no controle das afecções ligadas ao ritmo circadiano e ações protetoras ligadas ao efeito antioxidante (NOWAK & ZAWILSKA, 1998).

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostrados neste trabalho confirmam e corroboram com os dados descritos na literatura que a melatonina protege as diferentes constituições lipídicas contra a ação deletéria dos radicais hidroxil e ascorbil e ânion peroxinitrito. As propriedades antioxidantes da melatonina também foram confirmadas pela inibição das enzimas pró-oxidantes óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), xantina oxidase (XO) e mieloperoxidase (MPO). No caso das duas últimas enzimas esta é a primeira demonstração direta dessa inibição.

Essa combinação de ações confere a esse neurohormônio um excelente efeito como protetor celular contra o excesso de EROs e ERNs, normalmente associado a patologias relacionadas com o envelhecimento. É importante ressaltar que, devido sua lipofilicidade, a melatonina pode atuar em receptores de membrana e processos bioquímicos intracelulares, modulando respostas inflamatórias e diminuindo a peroxidação lipídica. Além disso, consta na literatura que a administração de melatonina como vitamina ajuda regular a sua dessincronia ou secreção inadequada.

Além da corrente sanguínea, a melatonina pode ser encontrada na bile, no trato gastrointestinal e no líquido cérebro espinhal do terceiro ventrículo em concentrações fisiológicas maiores que na circulação, tornando-se efetiva contra o estresse oxidativo tanto em concentrações fisiológicas como farmacológicas. Nossos resultados sugerem que a melatonina possa representar um avanço terapêutico para vários sintomas clínicos prolongando a qualidade de vida, podendo também ser utilizada em casos extremos de estresse oxidativo como em órgãos para transplantes e câncer.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOKI, E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signaling molecule. **Acta Histochemica and Cytochemica**, v.28, n.2, p.97-106, 1995.
2. ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; MACÍAS, M.; CRESPO, E.; ARAUZO, M.; LEÓN, J.; MARTÍN, M.; ESCAMES, G.; VIVES, F.; CABO, J.R.; SOLER, Y.J. Potenciales efectos de la melatonina en el envejecimiento. **Moreno Mercer**, 1996.
3. ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; MATÍN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; LEÓN, J.; KHALDY, H.; REITER, R.J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of Pineal Research**, v.30, p.65-74, 2001.
4. ALBARRÁN, M.T.; LÓPEZ-BURILLO, S.; PABLOS, M.I.; REITER, R.J.; AGAPITO, M.T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. **Journal of Pineal Research**, v.30, p.227-233, 2001.
5. ANTUNES, F.; ROSS, L.; BARCLAY, C.; INGOLD, K.U.; KING, M.; NORRIS, J.Q.; SCAIANO, J.C.; XI, F. On the antioxidant activity of melatonin. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.117-128, 1999.
6. ARENDT, J.; MIDDLETON, B.; STONE, B. Complex effects of melatonin: evidence for photoperiodic responses in humans? **Sleep**, v.22, p.625-635, 1999.
7. ARGYRIOU, A.; PRAST, H.; PHILIPPU, A. Melatonin facilitates short-term memory. **European Journal of Pharmacology**, v.349, p.159-162, 1998.
8. BAYDAS, G.; GURSU, M.F.; YILMAZ, S.; CANPOLAT, S.; YASAR, A.; CIKIM, G.; CANATAN, H. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. **Neuroscience Letters**, v.323, p.195-198, 2002.
9. BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Science**, v.87, p.1620-1624, 1990.
10. BETTAHI, I.; POZO, D.; OSUNA, C.; REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; GUERRERO, J.M. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. **Journal Pineal Research**, v.20, p.205-210, 1996.
11. BETTAHI, I.; GUERRERO, J.M.; REITER, R.J.; OSUNA, C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of

- prostaglandin E₂ and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. **Journal of Pineal Research**, v.25, p.34-40, 1998.
12. BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.105, p.295-305, 1984.
 13. BLANCHARD, B.; POMPOM, D.; DUCROCQ, C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. **Journal of Pineal Research**, v.29, p.184-192, 2000.
 14. BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-10, 1978.
 15. BURKHARDT, S.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; HARDELAND, R.; CABRERA, J.; KARBOWNIK, M. DNA oxidative damage by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.33, p.775-783, 2001.
 16. CABRERA, J.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; QI, W.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; GARCIA, J.J.; KIM, S.J.; EL-SOKKARY, G. Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. **Neuropharmacology**, v.39, p.507-514, 2000.
 17. CAMMER, W. Oligodendrocyte killing by quinolinic acid in vitro. **Brain Research**, v.896, p.157-160, 2001.
 18. CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.37, p.135-41, 1997.
 19. CHANG, H.M.; LING, E.A.; LUE, J.H.; WEN, C.Y.; SHIEH, J.Y. Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. **Brain Research**, v.873, p.243-251, 2002.
 20. COSTA, E.J.X.; LOPEZ, R.H.; LAMY-FREUND, M.T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.19, p.123-126, 1995.
 21. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. **FEBS Letters**, v.350, p.195-198, 1994.
 22. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P.; ALVES, E.W.; FERREIRA, A.T.; SCOFANO, H.M. Phosphatase activity of H⁺-ATPase from chloroplasts. **Biochemistry Biophys. Acta**, v. 1320, p.58-641, 1997.

23. CUZZOCREA, S. & REITER, R.J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, v.426, p.1-10, 2001.
24. CUZZOCREA, S. & REITER, R.J. Pharmacological action of melatonin in acute and chronic inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v.2, p.153-165, 2002.
25. EL-SOKKARY, G.H.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; QI, W.; KIM, S.J. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice. **Neuroscience Letters**, v.54, p.382-389, 1998.
26. ESCAMES, G.; GUERRERO, J.M.; REITER, R.J.; GARCIA, J.J.; MUNOZ-HOYOS, O.C.S. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. **Neuroscience Letters**, v.230, p.147-150, 1997.
27. FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. Characterization of P2Y(1)-like receptor in cultured rat pineal glands. **European Journal of Pharmacology**, v.415, p.151-156, 2001.
28. GARCIA, J.J.; REITER, R.J.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J.R.; ORTIZ, G.G.; TAN, D.X.; BALLARIN, E.M.; CASTROVIEJO, D.A. N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation. **European Journal of Pharmacology**, p. 600034-XXX, 2001.
29. GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMANN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v.4490, p.56-8, 1981.
30. GREEN, L.C.; WAGNER, D.A. GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, p.131-8, 1982.
31. GROSS, S.S. Microtiter plate assay for determining kinetics of nitric oxide synthesis. **Methods in Enzymology**, v.268, p.159-168, 1996.
32. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, M.C. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**. v.128, p. 347-352, 1981.
33. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**. v.165, n.1, p. 215-219, 1987.
34. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. **Oxford: Oxford University Press**, 1999.
35. HSU, C.H.; CHI, B.C.; CASIDA, J.E. Melatonin reduces phosphine-induced lipid and DNA oxidation in vitro and in vivo in rat brain. **Journal of Pineal Research**, v.32, p.53-58, 2002.

36. JIMENEZ JL, NICOLAS JG, ALVAREZ S, FRESNO M, AND FERNANDEZ MAM. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. **Journal Virology**, v.75, p.4655-4663, 2001.
37. JONES, D.P. Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic injury. **Ann. Rev. Physiol.**, v.48, p.33-50, 1986.
38. KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.40, p.10204-12, 2001.
39. KEHRER, J.P. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v.1, n.23, p.21-48, 1993.
40. KILIC, E.; HERMANN, D.M.; ISENMANN, S. et al. Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. **Journal Pineal Research**, v.32, p.106-111, 2002.
41. KISS, J.P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. **Brain Research Bulletin.**, v.52, n.6, p.459-66, 2000.
42. KNOWLES, R.G.; MERRET, M.; SALTER, M.; MONCADA, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. **Biochemical Journal**, v.270, p.833-6, 1990.
43. KOOP, C.; VOGEL, E.; RETTORI, M.C.; DELAGRANGE, P.; MISLIN, R. Anxiolytic-like properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of MT₁ and/or MT₂ receptors in the regulation of emotional responsiveness. **Neuropharmacology**, v.39, p.1865-1871, 2000.
44. KU, D.D. Nitric oxide and nitric oxide donor induced relaxation. **Methods in Enzymology**, v.269, p.107-19, 1996.
45. LAPIN, I.; MIRZAEV, S.M.; RYZOV, I.V.; OXENKRUG, G.F. Anticonvulsant activity of melatonin agonist seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA and pentylenetetrazole in mice. **Journal of Pineal Research**, v.24, p.215-218, 1998.
46. LERNER, A.B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T.H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. **J. Am. Chem. Soc.**, v.80, p.2587, 1958.
47. LERNER, A.B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T.H.; MORI, W. Structure of melatonin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.81, p.6084-6085, 1959.
48. LEWY A.J., BAUER V.K., HASLER B.P., KENDALL A.R., PIRES M.L.N., SACK R.L. Capturing the circadian rhythms of free-running blind people with 0.5mg melatonin. **Brain Research.**, v.918, p.96-100, 2001.

49. LIEBMANN, P.M.; WÖEFLER, A.; FELSNER, P.; HOFER, D.; SCHAUENSTEIN, K. Melatonin and the immune system. **Int Arch Allergy Immunol**, 1997.
50. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-75, 1951.
51. MAESTRONI, G.J. The immunotherapeutic potential of melatonin. **Expert Opinion Investig. Drugs**, v.10, p.467-476, 2001.
52. MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.30434-30440, 1996.
53. MARSHALL, K.A.; REITER, R.J.; POEGGELER, B.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in-vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, p.307-315, 1996.
54. MEKI, M.A.A.R. & HUSSEIN, A.A.A. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v.130, p.305-313, 2001.
55. MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological Reviews**. v.49, n.2, p.137-42, 1997.
56. NODA, Y.; MORI, A.; LIBURDY, R.; HIGGS, E.A. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **Journal Pineal Research**, v.27, p.159-163, 1999.
57. NOWAK, J.Z. & ZAWILSKA, J.B. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. **Pharmacology World Science**, v.20, p.18-27, 1998.
58. OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n.2, p.351-8; 1979.
59. OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; WATANABE, K.; TANIGUCHI, K.; FUKAYA, T. Weak vasoconstrictor activity of melatonin in human umbilical artery: relation to nitric oxide-scavenging action. **European Journal Pharmacology**, v.417, p.125-129, 2001.
60. OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; REITER, R.J.; MIYAHARA, Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. **Neurobiology of Aging**, v.23, p.639-644, 2002.
61. PACCHIEROTTI, C.; IAPICHINO, S.; BOSSINI, L.; PIERACCINI, F.; CASTROGIOVANNI, P. Melatonin in Psychiatric Disorders, a review on the melatonin involvement in psychiatry. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.22, p.18-32, 2001.

62. PAPPOLLA, M.A.; SOS, M.; OMAR, R.A.; BICK, R.J.; HICKSON-BICK, D.L.; REITER, R.J.; EFTHIMIOPOULOS, S.; ROBAKIS, N.K. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. **Neuroscience Letters**, v.17, p.1683-1690, 1997.
63. PAPPOLLA, M.A.; POEGGELER, B.; REITER, R.J. La hipótesis oxidativa en la enfermedad de Alzheimer. Papel de la melatonina como antioxidante y como agente antibeta amiloide. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, v.8, p.8-19, 2001.
64. PARLAKPINAR, H.; SAHNA, E.; OZER, M.K. et al. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced renal injury. **Journal Pineal Research**, v.33, p.161-166, 2002.
65. PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; RECCHIONI, R.; MARCHISELLI, F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Science**, v.55, p.271-276, 1994.
66. PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; MARCHISELLI, F.; DECHIONI, R. Melatonin in a efficient antioxidant. **Arch Gerontology Geriatrics**, v.20, p.159-165, 1995.
67. POZO, D.; REITER, R.J.; CALVO, J.R.; GUERRERO, J.M. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. **Life Science**, v.55, p.455-460, 1994.
68. POZO, D.; REITER, R.J.; CALVO, J.R.; GUERRERO, J.M. Inhibition of cerebellar nitric synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. **Journal Cell. Biochem.**, v.65, p.430-442, 1997.
69. RADI, R. Kinetic analysis of reactivity of peroxyxynitrite with biomolecules. **Methods in Enzymology.**, v.269, p.354-66, 1996.
70. RAO TS, YU SS, DJURIC SW, ISAKSON PC. Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluluatoin of inhibitors of 5-lipooxygenase and antagonists of leukotriene B₄ receptor. **J. Lipid Mediators Cell Signalling**, v.10, p.213-28, 1994.
71. ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v.5, p.837-41, 1988.
72. REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v.12, p.151-180, 1991.
73. REITER, R.J.; TAN D.X.; PEGGELER, B.; MENENDEZ-PELAZ, A.; CHEN, L.D.; SAARELA, S. Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. **Ann N Y Acad. Science**, v.719, p.1-12, 1994.
74. REITER R.J. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. **Exp. Gerontl.**, v.30, p.199-212, 1995.

75. REITER R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, v.56, p.359-384, 1998.
76. REITER, R.J.; TAN, D.X.; CABRERA, J.; D'ARPA, D. Melatonin tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.467, p.379-387, 1999.
77. REITER, R.J.; TAN, D.X.; OUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal Biomed Science**, v.7, p.444-458, 2000a.
78. REITER, R.J.; TAN, D.X.; QI, W.; MANCHESTER, L.C.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J.R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. **Biological Signals and Receptors**, v.9, p.160-171, 2000b.
79. REITER, R.J.; TAN, D.X.; KARBOWNIK, M. Cholelithiasis, oxidative stress and melatonin. **Journal Pineal Research**, v.30, p.127-128, 2001a.
80. REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; TAN, D.X.; BURKHARDT, S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Ann N Y Acad. Science**, v.939, p.200-215, 2001b.
81. REITER, R.J.; TAN, D.X.; BURKHARDT, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, p.1007-1019, 2002.
82. REITER, R.J. & TAN, D.X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. **Cardiovascular Research**, v.58, p.10-19, 2003a.
83. REITER, R.J. & TAN, D.X. What constitutes a physiological concentration of melatonin. **Journal Pineal Research**, v.34, p.79-80, 2003b.
84. REPERT, S.M.; WEAVER, D.R. & GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacology Science**, v.17, p. 100-102, 1996.
85. ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v.5, p.837-841, 1988.
86. RODRÍGUES, A.B.; NOGALES, G.; ORTEGA, E.; BARRIGA, C. Melatonin controls superoxide anion level: modulation of superoxide dismutase activity in ring dove heterophils. **Journal Pineal Research**, v.24, p.9-14, 1998.
87. SANZ, M.J.; FERRANDIZ, M.L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M.C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. **Xenobiotica**, v.24, v.7, p.589-99, 1994.

88. SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO with $O_2^{\bullet-}$: implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Free Radical Res. Commun.**, v.10, p.221-226, 1990.
89. SCHENKMAN, J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods in Enzymology**, v.52, p.83-9, 1978.
90. SENER, G.; SERIRLI, A.O.; ALTUNBAS, H.Z.; ERSOY, Y.; PASKALOGLU, K.; ARBAK, S.; AYNUGLU-DULGER, G. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal Pineal Research**, v.32, n.4, p.231-236, 2002.
91. SHEN, Y.X.; XU, S.Y.; WEI, W.; SUN, X.X.; LIU, L.H.; YANG, J.; DONG, C. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. **Journal Pineal Research**, v.32, p.173-178, 2002a.
92. SHEN, Y.X.; XU, S.Y.; WEI, W.; SUN, X.X.; LIU, L.H.; YANG, J.; DONG, C. The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. **Journal Pineal Research**, v.32, p.85-89, 2002b.
93. SHIDA, C.S.; CASTRUCCI, A.M.L.; LAMY-FREUND, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. **Journal of Pineal Research**, v.16, p.198-201, 1994.
94. SIMIC, M.G. & JOVANOVIC, S.V.; TO, C.H. Anti-oxidation mechanisms of uric acid. **Journal Am. Chem. Soc.**, v.111, p.5778-5781, 1989.
95. SIU, A.W.; REITER, R.J.; TO, C.H. Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. **Journal Pineal Research**, v.27, p.122-128, 1999.
96. SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal Biochemistry**, v.215, p.213-219, 1993.
97. SLOTTEN, H.A.; PITROSKY, B.; PEVET, P. Entrainment of rat circadian rhythms by melatonin does not depend on the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei. **Brain Research**, v.876, p.10-16, 2000.
98. SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. J. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of a thermophilic bacterium. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v.81, p.519-28, 1977.
99. TAN, D.X.; CHEN, L.D.; PÖEGGELER, B.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology Journal**, v.1, p.57-60, 1993.
100. TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; PLUMMER, B.F.; HAEDIES, L.J.; WEINTRAUB, S.T.; VIJAYALAXMI, S.A.M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxy-melatonin: A biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. **Biochemistry Biophys. Res. Commun.**, v.253, p.614-620, 1998.

101. TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J. et al. High physiological levels of melatonin in bile of mammals. **Life Science**, v.65, p.2523-2529, 1999.
102. TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; QI, W.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J.R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. **Biol. Signals Recept.**, v.9, p.137-159, 2000.
103. TAN, D.X.; REITER, R.J.; MANCHESTER, L.C.; YAN, M.T.; EL-SAWI, M.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; KOHEN, R.; ALLEGRA, M.; HARDELAND, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Medicinal Chemistry**, v.2, p.181-197, 2002.
104. TAN, D.X.; REITER, R.J.; MANCHESTER, L.C.; HARDELAND, R.; LOPEZ-BURILLO, S.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; REITER, R.J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **Journal Pineal Research**, v.34, p.75-78, 2003.
105. THOMAS, C.E. & KAKYANARAMAN, B. Oxygen Radicals and the Disease Process. **Edited by Craig E. Thomas and Balaraman Kakyaraman**; USA; 1997.
106. TIAN, Y.M.; LI P, P.; JIANG, X.F.; ZHANG, G.Y.; DAÍ, Y.R. Rejuvenation of degenerative thymus by oral melatonin administration and the antagonistic action of melatonin against hydroxyl radical-induced apoptosis of cultured thymocytes in mice. **Journal Pineal Research**, v.31, p.214-221, 2001.
107. TRICOIRE, H.; LOCATELLI, A.; CHEMINEAU, P. et al. Melatonin enters cerebrospinal fluid through the pineal recess. **Endocrinology**, v.143, p.184-190, 2002.
108. VIVOT, E.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, M.C.; CRUANES, M.J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G.S.; MARTINEZ, E.; DI-SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal Ethnopharmacology**, v.76, p.65-71, 2001.
109. WAKATSUKI, A. & OKATANI, Y. Melatonin protects against the free radical-induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. **Journal Pineal Research**, v.28, p.172-178, 2000.
110. WINK, D.A. & MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v.25, p.434-456, 1998.
111. WEBB, S.M. & PUIG-DOMINGO, M. Role of melatonin in health and disease. **Clinical Endocrinology (Oxf.)**, v.42, p.221-234, 1995.

112. WÖLFLER, A.; CALUBA, H.C.; ABUJA, P.M.; DOHR, G.; SCHAVENSTEIN, K.; LIEBMANN, P.M. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. **Febs Letters**, v.502, p.127-131, 2001.
113. YAMAMOTO, H.A. & MOHANAN, P.V. Melatonin attenuates brain mitochondria DNA damage induced by potassium cyanide in vivo and in vitro. **Toxicology**, v.179, p.29-36, 2002.
114. YIN, J.J.; SMITH, M.J.; EPPLEY, R.M.; PAGE, S.W.; SPHON, J.A. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. **Biochim.Biophys.Acta**, v.1371, p.134-142, 1998.
115. YU, C.X.; ZHU, C.B.; XU, S.F.; CAO, X.D.; WU, G.C. Selective MT2 melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. **Neuroscience Letters**, v.282, p.161-164, 2000.

ANEXO



Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxy nitrite

Abstract: We have investigated the action of melatonin against lipid peroxidation in membranes including brain homogenates (BH), brain and liver microsomes (MIC), and phosphatidylcholine (PC) liposomes, as well as its effect on the activity of pro-oxidant enzymes such as constitutive neuronal nitric oxide synthase (cnNOS), xanthine oxidase (XO) and myeloperoxidase (MPO). The liposomes were reconstituted by a dialysis method, lipid peroxidation was monitored using the thiobarbituric reactive substances (TBARS) method and enzyme activities were measured spectrophotometrically. The ascorbyl and hydroxyl free radicals were generated by the reaction of ascorbic acid + FeSO₄ and H₂O₂ + FeCl₂, respectively, and peroxy nitrite using a mixture of NaNO₂ in an alkaline medium. Melatonin protected against lipid peroxidation induced by distinct reactive oxygen species (ROS) in all membranes tested although with different potency, in the following order BH < MIC < PC. The K_{0.5} for enzyme inhibition by melatonin was determined for nNOS (2.0 ± 0.1 mM), for XO (0.8 ± 0.1 mM) and for MPO (0.063 ± 0.003 mM), the latter one with high affinity. Melatonin showed a weak effect as a nitrogen monoxide (NO) scavenger in the presence of sodium nitroprusside (NO donor) and low reactivity with 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH). These results demonstrate the antioxidant action of melatonin, principally that related to the activity of pro-oxidant enzymes such as XO and MPO.

**Adriana Teixeira,
Marcos P. Morfim, Clarissa A. S.
de Cordova, Carla C. T. Charão,
Vânia R. de Lima and
Tânia B. Creczynski-Pasa**

Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Catarina, Florianópolis,
Brazil

Key words: lipid peroxidation, liposomes,
melatonin, myeloperoxidase, NO synthase,
xanthine oxidase

Address reprint requests to Tânia Beatriz
Creczynski Pasa, Departamento de Ciências
Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Universitário – Trindade, C.P. 476,
CEP 88040-900 Florianópolis, Brazil.
E-mail: taniac@hu.ufsc.br

Received May 21, 2003;
accepted July 2, 2003.

Introduction

Reactive oxygen and nitrogen species are produced in physiological conditions as a result of the normal metabolism of living organisms. However, when an imbalance in homeostasis is caused by various pathologies, the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) may increase greatly, thereby jeopardizing the affected organism. The pathologies related to oxidative stress extend from those that affect the central nervous system, such as Alzheimer's and other degenerative diseases, through to ischemia-reperfusion injury, inflammation, circulatory and other disorders of the cardiovascular system, to effects on the gastrointestinal and immune systems.

Melatonin, a pineal secretory product, whose physiological role has been thoroughly reviewed [1], is considered a potent antioxidant against stress induced by many oxidant generating systems [2, 3]. Melatonin stimulates the physiological enzymatic antioxidant defenses [4, 5], acts as a free radical scavenger and as a metal ion inactivator [6], preserves mitochondrial function and has low toxicity [7]. Indeed, melatonin protects against oxidative stress observed in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, damage induced by amyloid beta-peptide

[8–10] and MPTP-induced Parkinson's disease [11]. Melatonin also reduces loss of memory and brain damage induced by treatment with D-galactose [12], protects against the damage caused by oxidative stress induced by kainic acid or quinolinic acid in rat brain [13, 14] and limits dopamine auto-oxidation [15]. The same protection was observed in other diseases including diabetes induced by streptozotocin (diabetes model) and cholelithiasis [16]. Furthermore, melatonin protects biomolecules such as DNA from the oxidant ion induced by phosphine [17], lowers hydroxyl radical-induced apoptosis of cultured thymocytes in mice [18] and protects against oxidative hemolysis of red blood cells [19]. In addition, melatonin protects against paraquat-induced damage [20], reduces the levels of malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns [21] among many others actions (for reviews see [7, 22]). Besides melatonin has been considered as a hormone, some researchers are also taken into account its antioxidant properties and classifying the molecule as an antioxidant vitamin, as it has non-receptor mediated antioxidant activity, is synthesized by the organism and is obtained from diet, similarly to vitamin D₃ [23].

Nitric oxide (NO) is a free radical gaseous molecule that is a mediator of vital physiologic functions. However, when

the production of NO by the nitric oxide synthases (NOS) is exacerbated by an oxidative stress or by a pathological condition, its production must be controlled. The reaction of nitrogen monoxide and superoxide anion generates peroxynitrite (ONOO⁻). The overproduction of ONOO⁻ contributes to a very important feature of tissue damaging mechanisms during pathological processes, in addition to decreasing the availability of NO produced in physiological conditions. Since ONOO⁻ is a highly reactive molecule, it reacts with cellular components such as membrane lipids and proteins, thereby disturbing their function and, consequently, cellular homeostasis [24–26]. The literature shows that melatonin possesses potent antioxidant potential, also against RNS. In this context melatonin inhibits nitric oxide synthase activity [27] and decreases NO-induced lipid peroxidation in brain homogenates (BH) [28]. Melatonin also possesses, although weak vasoconstrictor activity [29], perhaps by acting as a nitrogen monoxide scavenger, and decreases NO-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates [30]. However paradoxically, it was shown that melatonin protects against the free radical-induced impairment of nitrogen monoxide production in the human umbilical artery, probably by its ability to scavenge hydroxyl radicals [31]. In addition, melatonin attenuates neuronal NADPH-d/nitric oxide synthase expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury [32].

Myeloperoxidase (MPO) plays a central role in infection and inflammation, where its role is to convert hydrogen peroxide and chloride to hypochlorous acid (HOCl). Although HOCl has an important role in killing microorganisms it has high reactivity and the ability to damage biomolecules by oxidation, both directly and by decomposing them to form chlorine gas (Cl₂) [33].

In this study we investigated the *in vitro* antioxidant potential of melatonin on lipid peroxidation induced by the ascorbyl and hydroxyl radicals and by peroxynitrite in different models of biological membranes including BH, microsomes (MIC) and phosphatidylcholine (PC) liposomes. We report also the reactivity of melatonin with 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), an inhibitory effect on xanthine oxidase (XO), constitutive brain nitric oxide synthase (cnNOS) and MPO activities, and a weak effect as a nitrogen monoxide scavenger.

Materials and methods

Drugs

Melatonin, PC, tricine, succinic acid, myoglobin and thiobarbituric acid were purchased from Sigma Chemical Company® (St Louis, MO, USA). The other reagents were purchased from Merck® AG (Darmstadt, Germany). Melatonin, freshly prepared, was dissolved in a minimum volume of absolute ethanol and diluted in water depending on the assay.

Animals

Wistar male albino rats (160–190 g) were used. They were maintained in the animal facility of the Universidade

Federal de Santa Catarina and housed in an air-conditioned room (approximately 24°C) with controlled lighting (lights on from 07:00 to 19:00 hr). All the animals were maintained with pelleted food (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brazil) and tap water available *ad libitum*. Fasted animals were deprived of food for at least 16 hr but allowed free access to water. All the animals were maintained in accordance with ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation.

DPPH reactivity

The radical DPPH is considered a stable radical and its maximal absorption occurs at 517 nm. It is used as a tool to study the free radical scavenging action of molecules, an approach that is independent of metal or enzymatic activity. The assay is based on the incubation of all reagents for 1 hr at 37°C in an ethanolic solution of 200 μM DPPH and the optical density is measured afterwards at 517 nm. The percentage inhibition in the sample was calculated based on a control with 100% DPPH in the absence of the molecule being tested [34].

Brain homogenates

Rats were killed by ether inhalation and their brains removed. The brains were then homogenized in a proportion of 1:5 (w/v) in a cold buffer containing 20 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.1% Triton X-100. The sample was then centrifuged and an aliquot of the supernatant was incubated for 20 min at 37°C in a buffer containing 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 plus the lipid peroxidation inducers.

Brain MIC preparation

Microsomes were obtained by differential centrifugation with calcium aggregation, according to Schenkman [35]. The fractions obtained were immediately placed in a freezer at -70°C for the later determination of antioxidant activity. The protein concentration was determined according to Lowry et al. [36].

Liposomes preparation

Bilayer liposomes were prepared by cholates dialysis as described previously [37]. Briefly, the method consists of the solubilization of the phospholipids (PC) at 50 mg/mL in a buffer containing 10 mM tricine, 20 g/L sodium cholates, 10 g/L deoxycholate at pH 8.0 followed by a dialysis procedure at 30°C for 5 hr.

Lipid peroxidation induced by ascorbyl radical (iron-ascorbate)

Lipid peroxidation was induced by the addition of 25 μM FeSO₄ and 500 μM ascorbate in a reaction medium containing 2 mg microsomal protein/mL or BH or liposomes (lipids at 12.5 mg/mL), and 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4. The samples were incubated for 30 min at 37°C and the extent of lipid peroxidation was determined by the

thiobarbituric acid method [38]. The amount of thiobarbituric reactive species (TBARS) was calculated using an extinction coefficient of 1.56×10^5 /M/cm.

Lipid peroxidation induced by hydroxyl radical

This method was adapted from Gutteridge and Halliwell [39]. Hydroxyl radical in this experiment was produced from different variations of the Fenton reaction that generates the hydroxyl radical from the reaction of hydrogen peroxide and FeCl_3 + ascorbate. Lipid peroxidation was induced by the addition of $25 \mu\text{M}$ FeCl_3 and $100 \mu\text{M}$ ascorbate in a reaction medium containing MIC (protein 1 mg/mL) or liposomes (lipids at 12.5 mg/mL) and 10 mM KH_2PO_4 , pH 7.4. The lipid peroxidation was determined by the TBARS method as described above.

Lipid peroxidation induced by peroxyntirite

Peroxyntirite was produced by the reaction between H_2O_2 and NaNO_2 in an alkaline medium [40]. Lipid peroxidation was induced by the addition of 2.64 mM ONOO^- and the assay was then carried out as described for the hydroxyl radical.

Assay for nitric oxide synthase activity

The NOS activity was determined by the method based on myoglobin oxidation by NO produced in the reaction medium. The myoglobin oxidation was monitored spectrophotometrically at 405 nm . The NOS activity was calculated using the slope of the curve after 10 min of reaction. The reaction medium contained 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.2, 1.2 mM MgCl_2 , 0.25 mM CaCl_2 , $20 \mu\text{M}$ L-arginine, 60 mM L-valine, 1.2 mM L-citrulline, 1 mM DTT, $4 \mu\text{M}$ FAD, $5 \mu\text{M}$ FMN, $10 \mu\text{M}$ TBH₄, $120 \mu\text{M}$ NADPH and 0.1 nmol myoglobin. A control assay was carried out in the presence of 1 mM EGTA to characterize the calcium independent NOS activity. A calibration curve of myoglobin oxidation was obtained where the protein was totally oxidized by potassium ferrocyanide [41].

Assay for nitric oxide

Nitric oxide was released by the incubation of 40 mM sodium nitroprusside in a medium containing 20 mM NaH_2PO_4 , pH 7.2 at room temperature, in the presence or absence of melatonin at different concentrations. NO was measured indirectly through nitrite formation. Nitrite was monitored spectrophotometrically at 540 nm by the Griess reagent (N-1-naphthyl-ethylenediamine, 0.1% w/v and sulfanilamide, 1% w/v in H_3PO_4 5% v/v) [42]. The results were obtained using a standard curve for NaNO_2 .

Assay for XO activity

Xanthine oxidase activity was evaluated spectrophotometrically at 295 nm , through the formation of uric acid derived from xanthine. The reactions were carried out at 25°C , for 10 min, in a medium containing $100 \mu\text{M}$ xanthine, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.8 and 0.04 U/mL XO [43].

Assay for MPO activity

Lungs of rats were homogenized in an ice-cold 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4, containing 0.5% cetyl trimethylammonium bromide as previously described [44] and freeze-thawed three times. The samples were centrifuged at $12,000 \text{ g}$ at 4°C for 20 min. The supernatant was assayed in a reaction medium containing 50 mM phosphate buffer, pH 6.0 at 25°C , o-dianisidine-2HCl (0.167 mg/mL) and H_2O_2 (0.005%). The enzyme activity was determined by the slope of the absorption curve set at 450 nm . A standard curve of MPO activity was obtained previously with a commercial enzyme batch (Sigma).

Results and discussion

The antioxidant potential of melatonin was first analyzed by observing the reactivity with DPPH, a violet-colored stable radical that absorbs strongly at 517 nm . As the electron becomes paired off in the presence of a free radical scavenger, the absorption decreases and the resulting decoloration is stoichiometrically related to the number of electrons captured. Melatonin showed low reactivity with this radical. At a concentration of 5.5 mM the compound decreases DPPH absorption by only 40% (results not shown). This assay has been proposed in the literature as a first screen for the antioxidant potential of new molecules. In our laboratory we have observed that some molecules do not show reactivity with DPPH while at the same time they are very potent hydroxyl radical scavengers and have great potential against lipid peroxidation. In fact, melatonin prevented lipid peroxidation, although with different potencies, in all lipid membranes examined in this work. Fig. 1 shows the inhibition of lipid peroxidation induced by the ascorbyl radical in BH. In this figure it is also possible to observe that melatonin promotes recovery from the basal lipid oxidation, which is probably caused by molecular oxygen during experimental handling. This observation might explain the results obtained with lipid peroxidation assays where the protection by melatonin decreased TBARS to values under the control.

Figure 2 shows the results of lipid peroxidation induced by the ascorbyl and hydroxyl radicals in brain MIC and PC liposomes. The IC_{50} s for hydroxyl radical were $0.43 \pm 0.03 \text{ mM}$, and $0.30 \pm 0.02 \text{ mM}$, respectively, while those for the ascorbyl radical were $1.10 \pm 0.03 \text{ mM}$ and $0.40 \pm 0.02 \text{ mM}$, respectively. All the IC_{50} s related to lipid peroxidation are summarized in Table 1, including the results with brain homogenate and results using peroxyntirite as the lipoperoxidation inducer. It is interesting to note that melatonin protected against the action of ROS and RNS on three kinds of lipid membrane preparation: brain homogenates, natural membranes with endogenous antioxidant defenses, MIC, in which the major element is endoplasmic reticulum membrane containing phosphatidylcholine (PC), cholesterol, sphingomyelin (SM), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI), and PC liposomes in which the phospholipid used was 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a major structural phospholipid in brain, besides other highly polyunsaturated

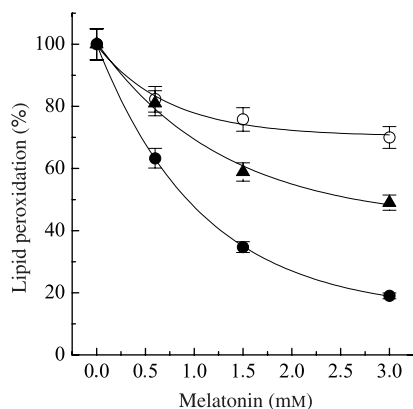


Fig. 1. Effect of melatonin on lipid peroxidation induced by ascorbyl radical in brain homogenates. Ascorbyl was generated by the reaction of FeSO_4 + ascorbate and lipid peroxidation was measured by the TBARS method. Basal oxidation indicates the amount of oxidation not induced by the radical, in vitro. (○) Basal oxidation; (△) Ascorbyl; (●) Ascorbyl – basal oxidation. The results are represented by the mean \pm S.E.M., $n = 3$.

fatty-acid side-chains being important targets of oxidative stress.

The major function of XO is to catalyze the oxidation of hypoxanthine and xanthine to uric acid. As a consequence it produces also the superoxide anion radical. Inhibitors of this enzyme activity are seen as antioxidants because they prevent the production of very deleterious molecules. Uric acid is found in the organism as urate and, although it has antioxidant properties [45], its low solubility in water leads to its crystallization out of solution provoking joint inflammation and the painful characteristics of gout. Although melatonin was not able to scavenge directly superoxide radical (O_2^-) (data not shown) it was able to decrease the radical formation through the inhibition of XO activity. However, this reduction occurred with low affinity as the $K_{0.5}$ obtained was 0.8 ± 0.1 mM (Fig. 3). Inhibition of XO activity added to a peroxynitrite scavenger action [46] furnishes molecules such as melatonin with the potential to be very well adapted also in the pathogenesis of ischemic injury and atherosclerosis, which is characterized by an over-

Table 1. Effect of melatonin against lipid peroxidation in different lipid bilayers, induced by ascorbyl and hydroxyl radicals and by peroxynitrite

Membrane	IC ₅₀ (mM)		
	Ascorbyl	Hydroxyl	Peroxyntirite
Brain homogenate	0.27 ± 0.03	0.6 ± 0.05	0.9 ± 0.10
Brain microsomes	1.1 ± 0.10	0.43 ± 0.05	0.25 ± 0.04
Phosphatidylcholine liposomes	0.4 ± 0.06	0.3 ± 0.04	0.8 ± 0.09

The lipid peroxidation was evaluated by levels of TBARS, as described in Material and methods. The assays were performed in triplicate and the results are represented by the media \pm S.E.M., $n = 3$.

production of the superoxide anion; indeed, in atherosclerosis it has been confirmed that peroxynitrite is also present.

Although melatonin showed a weak direct reaction with nitrogen monoxide (results not shown) in a medium where sodium nitroprusside, an NO donor, releases the molecule in a certain period of time, as described in Material and methods, the pineal hormone indole inhibited cnNOS, although with a low affinity of $K_{0.5} = 2.0 \pm 0.1$ mM (Fig. 4). This result is in accordance with that obtained by Pozo et al. [27], and partially with Noda et al. [47] as they argue that melatonin is an NO scavenger. The decrease in NO synthesis is a positive event when the organism is in an oxidative stress state because an overproduction of this radical provokes the production of peroxynitrite. According to Escames et al. [28] melatonin was able to prevent lipid peroxidation induced by NO. Taken together, these observations, suggest that melatonin exerts a double protection against the deleterious actions of NO as it inhibits NOS activity and scavenges peroxynitrite.

Myeloperoxidase is an enzyme present in activated neutrophils and plays a central role in infection and inflammation. The physiological action of this enzyme is to convert hydrogen peroxide and chloride to HOCl, although it is also able to degrade hydrogen peroxide to oxygen and water [33], about 5% of the hydrogen peroxide

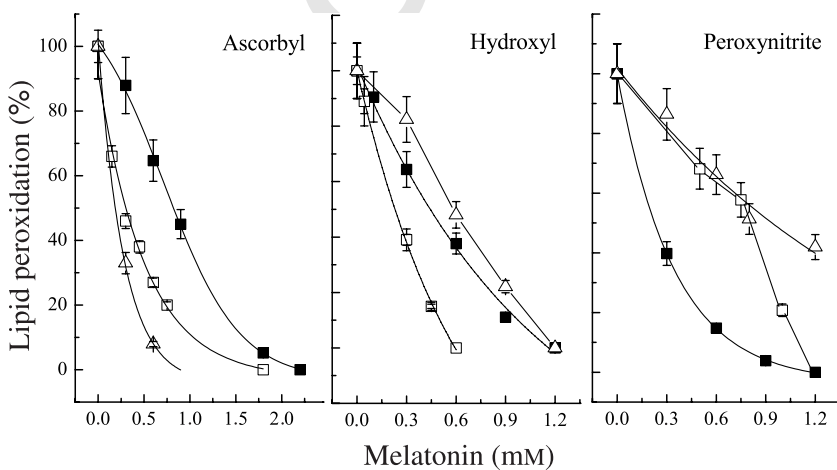


Fig. 2. Comparison of the effect of melatonin on lipid peroxidation induced by ascorbyl, hydroxyl radicals and peroxynitrite in brain homogenate, brain microsomes and in PC liposomes. Ascorbyl was generated by the reaction of FeSO_4 + ascorbate ($500 \mu\text{M}$); hydroxyl by FeCl_3 + ascorbate ($100 \mu\text{M}$) + H_2O_2 ; peroxynitrite was previously synthesized and used at 2.7 mM , the lipid peroxidation was measured by the TBARS method. (□) Brain microsomes; (△) PC liposomes; (●) Brain homogenate. The results are represented by the mean \pm S.E.M., $n = 3$.

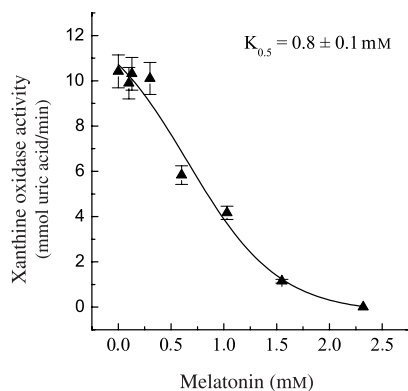


Fig. 3. Inhibition of xanthine oxidase activity by melatonin. The enzyme activity was measured by the spectrophotometric detection of uric acid at 295 nm, 100% of enzyme activity was 10.5 ± 0.9 mmol uric acid/min. The results are represented by the mean \pm S.E.M., $n = 4$.

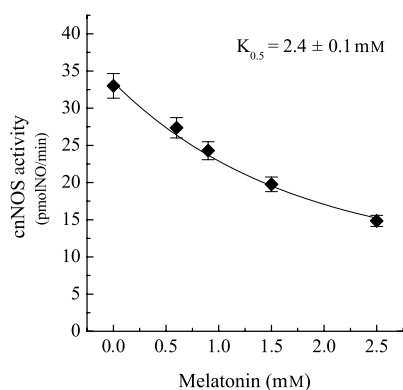


Fig. 4. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by melatonin. The enzyme activity was measured by the spectrophotometric detection of myoglobin oxidation at 405 nm, 100% of enzyme activity was 25 ± 5 pmol NO/min/mg protein. The results are represented by the mean \pm S.E.M., $n = 3$.

consumed by the enzyme is used to produce tyrosyl radicals [48, 49]. Melatonin inhibited the enzyme activity strongly, as can be seen in Fig. 5, which shows the kinetics of enzyme inhibition, while the inset of Fig. 5 shows the results re-plotted to obtain the $K_{0.5}$ which was 0.063 mM. Although this enzyme can be considered as antioxidant because it dismutates ROS as mentioned above, it is also a pro-oxidant enzyme because of the production of HOCl acid. Inhibition of this enzyme in a stress oxidative condition has beneficial effects.

Based on the results shown in this work and the data described in the literature we conclude that melatonin has many antioxidant properties; it protects against lipid peroxidation induced in distinct lipid bilayers by different reactive species, acts as a ROS and RNS scavenger, and stimulates a number of endogenous anti-oxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), and catalase (CAT) [6, 50]. Melatonin also inhibits the pro-oxidant enzymes nitric oxide synthase, cyclooxygenase and lipooxygenase [27, 51]. In this work we also observed that

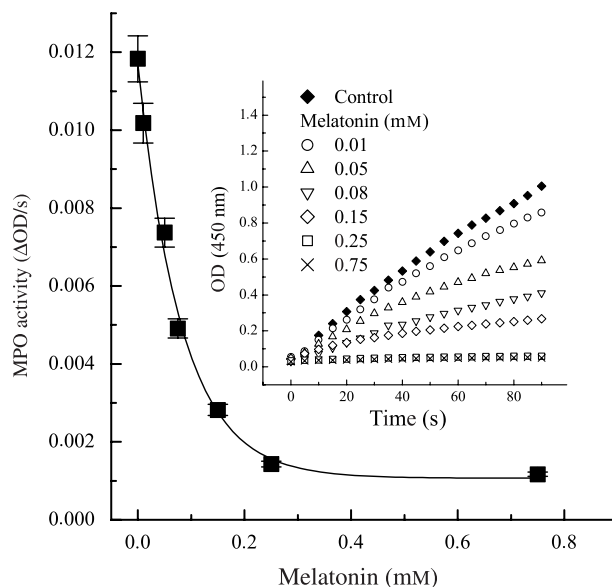


Fig. 5. Inhibition of myeloperoxidase activity by melatonin. The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 450 nm, in the presence of H_2O_2 and o-dianisidine-HCl, 100% of enzyme activity was 4.0 ± 1.0 U/min/mg protein. The results are represented by the mean \pm S.E.M., $n = 4$.

melatonin inhibits the neuronal nitric oxide synthase activity, besides XO and MPO activities. In the case of the last two enzymes this is the first demonstration of their direct inhibition.

It is known that the physiological concentration of melatonin is dependent on which body compartment is being considered. Some authors assume that melatonin physiological concentrations are those determined in the blood plasma (picomolar and low nanomolar range). However it has been observed that in bile and in the cerebrospinal fluid of the third ventricle melatonin concentrations are orders of magnitude higher than in the blood ([52] and references therein). It is also known that melatonin is effective against oxidative stress at physiological and pharmacological concentrations [53, 54]. Despite this discussion, in this work the majority of antioxidant indexes for melatonin obtained was at millimolar range and we suggest that this pineal product could be co-administered with the traditional treatments in several pathologies, including AIDS where the oxidative stress induced by nitric oxide and apoptosis were found to be strongly associated [55], or in procedures strongly linked to oxidative stress such as organ reperfusion in the case of transplantation.

Acknowledgments

This work was supported by a grant and fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico), and a grant from FUNCITEC (Fundação de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina). Adriana Teixeira is a master's degree student in neuroscience. The authors also would like to thank Gareth P. Cuttle for assistance with the English correction of the manuscript.

References

1. REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151–180.
2. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; **56**:359–384.
3. REITER RJ, TAN DX, BURKHARDT S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Aging Develop* 2002; **123**:1007–1019.
4. ALBARRÁN MT, LÓPEZ-BURILLO S, PABLOS MI et al. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *J Pineal Res* 2001; **30**:227–233.
5. OKATANI Y, WAKATSUKI A, SHINOHARA K et al. Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J Pineal Res* 2001; **30**:199–205.
6. ANTUNES F, ROSS L, BARCLAY C et al. On the antioxidant activity of melatonin. *Free Radic Biol Med* 1999; **26**:117–128.
7. REITER RJ, TAN DX, QI W et al. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Sig Recept* 2000; **9**:160–171.
8. PAPPOLLA MA, SOS M, OMAR RA et al. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 1997; **17**:1683–1690.
9. PAPPOLLA MA, POEGGELER B, REITER RJ. La hipótesis oxidativa en la enfermedad de Alzheimer. Papel de la melatonina como antioxidante y como agente antibeta amiloide. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 2001; **8**:8–19.
10. SHEN YX, XU SY, WEI W et al. Melatonin blocks rat hippocampal neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide 25–35. *J Pineal Res* 2002; **32**:163–167.
11. ACUÑA-CASTROVIEJO D, COTO-MONTES A, MONTI Mg et al. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 1997; **60**:PL23–PL29.
12. SHEN YX, XU SY, WEI W et al. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J Pineal Res* 2002; **32**:173–178.
13. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxy-melatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**:614–620.
14. CABRERA J, REITER RJ, TAN DX et al. Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. *Neuropharmacology* 2000; **39**:507–514.
15. KHALDY H, ESCAMES G, LEÓN J et al. Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation *in vitro*. *J Pineal Res* 2000; **29**:100–107.
16. REITER RJ, TAN DX, KARBOWNIK M. Cholelithiasis, oxidative stress and melatonin. *J Pineal Res* 2001; **30**:127–128.
17. HSU CH, CHI BC, CASIDA JE. Melatonin reduces phosphine-induced lipid and DNA oxidation in vitro and in vivo in rat brain. *J Pineal Res* 2002; **32**:53–58.
18. TIAN YM, LI PP, JIANG XF et al. Rejuvenation of degenerative thymus by oral melatonin administration and the antagonistic action of melatonin against hydroxyl radical-induced apoptosis of cultured thymocytes in mice. *J Pineal Res* 2001; **31**:214–221.
19. TESORIERE L, D'ARPA D, CONTI S et al. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolyses: new insights into the radical-scavenging activity. *J Pineal Res* 1999; **27**:95–105.
20. MELCHIORRI D, ORTIZ GG, REITER RJ et al. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. *Toxicol Lett* 1998; **95**: 103–108.
21. FULIA F, GITTO E, CUZZOCREA S et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res* 2001; **31**:343–349.
22. ACUÑA-CASTROVIEJO D, MATÍN M, MACÍAS M et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; **30**:65–74.
23. TAN DX, MANCHESTER LC, HARDELAND R et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autacoid, a paracoid and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 2003; **34**:75–78.
24. KEHRER JP. Free radicals as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; **23**:21–48.
25. WINK DA, MITCHELL JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**:434–456.
26. RADI R, PELUFFO G, ALVAREZ MN et al. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**:463–488.
27. POZO D, REITER RJ, CALVO JR et al. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997; **65**:430–442.
28. ESCAMES G, GUERRERO JM, REITER RJ et al. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett* 1997; **230**:147–150.
29. OKATANI Y, WAKATSUKI A, WATANABE K et al. Weak vasoconstrictor activity of melatonin in human umbilical artery: relation to nitric oxide-scavenging action. *Eur J Pharmacol* 2001; **417**:125–129.
30. SIU AW, REITER RJ, TO CH. Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res* 1999; **27**:122–128.
31. WAKATSUKI A, OKATANI Y. Melatonin protects against the free radical-induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. *J Pineal Res* 2000; **28**:172–178.
32. CHANG HM, LING EA, LUE JH et al. Melatonin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. *Brain Res* 2002; **873**:243–251.
33. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*, 3 edn. Oxford University Press, Oxford, 2000.
34. VIVOT E, MUNOZ JD, CRUANES MC et al. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. *J Ethnopharmacol* 2001; **76**:65–71.
35. SCHENKMAN JB, CINT DL. Preparation of microsomes with calcium. *Meth Enzymol* 1978; **52**:83–89.
36. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265–275.
37. CRECZYNSKI-PASA TB, GRÄBER P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. *FEBS Lett* 1994; **350**:195–198.
38. BIRD RP, DRAPER AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Meth Enzymol* 1984; **90**:105–110.
39. GUTTERIDGE JMC, HALLIWELL B. The deoxyribose assay: an assay for “free” hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. *Biochem J* 1988; **253**:931–933.

40. KOPENOL WH, KISSNER R, BECKMAN JS. Synthesis of peroxynitrite: to go with the flow or solid grounds? *Meth Enzymol* 1996; **269**:296–302.
41. GROSS SS. Microtiter plate assay for determining kinetics of nitric oxide synthesis. *Meth Enzymol* 1996; **268**:159–168.
42. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; **126**:131–138.
43. ROBAK J, GRYGLEWSKI RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide radical. *Biochem Pharmacol* 1988; **5**:837–841.
44. RAO TS, YU SS, DJURIC SW et al. Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluation of inhibitors of 5-lipoxygenase and antagonists of leukotriene B₄ receptor. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1994; **10**:213–228.
45. SIMIC MG, JOVANOVIC SV. Anti-oxidation mechanisms of uric acid. *J Am Chem Soc* 1989; **111**:5778–5781.
46. BLANCHARD B, POMPON D, DUCROCQ C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 2000; **29**:184–192.
47. NODA Y, MORI A, LIBURDY R et al. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *J Pineal Res* 1999; **39**:101–193.
48. KETTLE AJ, WINTERBOURN CC. A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. *Biochemistry* 2001; **40**:10,204–10,212.
49. MARQUEZ LA, DUNFORD HB. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. *J Biol Chem* 1996; **270**:30,434–30,440.
50. ANTOLIN I, RODRIGUEZ C, SAINZ RM et al. Melatonin prevents cell damage effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; **10**:882–890.
51. REITER RJ, ACUÑA-CASTROVIEJO D, TAN DX et al. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2001; **939**:200–215.
52. REITER RJ, TAN DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* 2003; **34**:79–80.
53. KILIC E, HERMANN DM, ISENMANN S et al. Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res* 2002; **32**:106–111.
54. PARLAKPINAR H, SAHNA E, OZER MK et al. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced renal injury. *J Pineal Res* 2002; **33**:161–166.
55. JIMENEZ JL, NICOLAS JG, ALVAREZ S et al. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes by nitric oxide. *J Virol* 2001; **75**:4655–4663.

Author Query Form

Journal: JPI

Article: 085

Dear Author,

During the copy-editing of your paper, the following queries arose. Please respond to these by marking up your proofs with the necessary changes/additions. Please write your answers on the query sheet if there is insufficient space on the page proofs. Please write clearly and follow the conventions shown on the attached corrections sheet. If returning the proof by fax do not write too close to the paper's edge. Please remember that illegible mark-ups may delay publication.

Many thanks for your assistance.

Query reference	Query	Remarks
1	Au: Please define: MPTP.	
2	Au: Please define: DTT, FAD, FMN and TBH.	
3	Au: Please define: EGTA.	
4	Au: Is the deletion of 'MA' in this reference ok?	
5	Au: Please provide appropriate symbols in place of '?'	

MARKED PROOF

Please correct and return this set

Please use the proof correction marks shown below for all alterations and corrections. If you wish to return your proof by fax you should ensure that all amendments are written clearly in dark ink and are made well within the page margins.

<i>Instruction to printer</i>	<i>Textual mark</i>	<i>Marginal mark</i>
Leave unchanged	... under matter to remain	Stet
Insert in text the matter indicated in the margin	⤴	New matter followed by ⤴
Delete	⤵ through matter to be deleted	⤵
Delete and close up	⤵ through matter to be deleted	⤵
Substitute character or substitute part of one or more word(s)	/ through letter or ⤵ through word	New letter or new word
Change to italics	— under matter to be changed	ƒ
Change to capitals	≡ under matter to be changed	≡
Change to small capitals	≡ under matter to be changed	≡
Change to bold type	⌚ under matter to be changed	⌚
Change to bold italic	⌚ under matter to be changed	⌚
Change to lower case	Encircle matter to be changed	⊖
Change italic to upright type	(As above)	⌘
Insert 'superior' character	/ through character or ⤴ where required	⤴ under character e.g. 3
Insert 'inferior' character	(As above)	⤵ over character e.g. ½
Insert full stop	(As above)	⦿
Insert comma	(As above)	,
Insert single quotation marks	(As above)	⤴ and/or ⤵
Insert double quotation marks	(As above)	⤴ and/or ⤵
Insert hyphen	(As above)	Ⓜ
Start new paragraph	⤴	⤴
No new paragraph	⤵	⤵
Transpose	⤴	⤴
Close up	linking ⦿ letters	⦿
Insert space between letters	⤴ between letters affected	#
Insert space between words	⤴ between words affected	#
Reduce space between letters	⤴ between letters affected	⤴
Reduce space between words	⤴ between words affected	⤴