

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICOS DA MELATONINA
EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO
ESTRIATAL COM 6-OHDA

LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR

**Fortaleza-CE
2002**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICOS DA MELATONINA
EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO
ESTRIATAL COM 6-OHDA

LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

Fortaleza-CE

2002

A23 e Aguiar, Lissiana Magna Vasconcelos

Efeitos comportamentais e neuroquímicos da melatonina em ratos submetidos à lesão estriatal com 6-OHDA / Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar – Fortaleza, 2002.

165f : il.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-graduação em Farmacologia

1. Neurofarmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3. Melatonina. 4. Antioxidante. 5. Monoaminas. I. - Título

CDD 615.78

Esta dissertação encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca da Faculdade de Medicina da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja de conformidade com as normas da ética científica.

Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Dissertação aprovada em 14 de junho de 2002

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
(Orientadora)

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

"...não desampares a sabedoria, e ela te guardará; ama-a, e ela te protegerá. O princípio da sabedoria é: adquiere a sabedoria; sim, com tudo o que possuis, adquiere o entendimento"

(Provérbios 4:6,7)

A Deus, a quem tudo devo.

A meus pais, Dugualberto e Perpétuo, meus irmãos Iluska e Sávio, meu noivo Thales e meus amigos, por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Glauce Socorro de Barros Viana**, minha orientadora, pelo saber, confiança e incentivo durante a execução deste trabalho.

À **Dra. Marta Maria de França Fonteles**, por ter me acolhido com tanto carinho como voluntária no Laboratório de Neurofarmacologia e me permitido ingressar na pesquisa, me orientando e me ajudando em todos os sentidos e pela amizade que surgiu do nosso trabalho.

Ao **Prof. Carlos Maurício de Castro Costa**, por ter aceito o convite para participar da banca examinadora.

À **Dra. Fca. Cléa Florenço de Sousa**, minha, digamos, co-orientadora que assim como a Dra Marta me acolheu com muito carinho e desde então mantemos uma relação de amizade (e trabalho) que já dura muitos anos.

À **Silvânia (Gatinha) e Danielle** pela contribuição inestimável, pela paciência quase sem fim e pela nossa amizade, da qual eu me orgulho muito, sem elas eu não sei o que teria sido de mim.

Aos meus amigos **Iri Sandro, Cícero, Rivelilson, Verinha, Patrícia, Emmanuelle**, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos bolsistas do laboratório, principalmente a **Fernanda, e ao Carlos Renato** pela amizade e ajuda em alguns experimentos.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial **Geanne, Augusta, Letícia, Kaline, Juvênia e Vilani** pelo apoio e cooperação e por terem escutado tantas vezes as minhas lamúrias.

Às secretárias **Sílvia, Áurea, Marta e Joana**, pela ajuda e amizade.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE ESQUEMAS	xv
ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Glândula Pineal e Melatonina	1
1.2- Síntese da Melatonina	7
1.3- Metabolização da Melatonina	13
1.4- Mecanismos de Ação da Melatonina	16
1.4.1- Receptores de membrana	16
1.4.2- Inibição da Calmodulina	21
1.4.3- Ligação à Receptores Nucleares	23
1.4.4- Ação Antioxidante	24
1.5- Efeitos da Melatonina	39
1.5.1- Regulação do Ritmo Circadiano	39
1.5.2- Sistema Endócrino	41
1.5.3- Sistema Imunológico	43
1.5.4- Sistema Nervoso	45
1.6- Melatonina e Doença de Parkinson	47
2- OBJETIVO GERAL	54
2.1- Objetivos Específicos	54
3- MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1- Animais	56
3.2- Preparo de Drogas	56

3.2.1- Melatonina	56
3.2.2- 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	56
3.2.3- Apomorfina	57
3.3- Tratamento dos Grupos Experimentais	57
- Protocolo 1	57
- Protocolo 2	58
- Protocolo 3	58
3.4- Material utilizado nos experimentos	59
3.5- Teste Comportamental	60
3.5.1- Teste Rotacional	60
3.6- Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA	61
3.7- Dissecção da área cerebral (corpo estriado)	61
3.8- Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos	62
- Receptores D ₁ - símile	62
- Receptores D ₂ - símile	63
- Método	63
- Procedimento experimental	64
- Soluções reagentes	65
3.9- Dosagem de proteína	66
3.9.1- Método	66
3.9.2- Soluções Reagentes	67
3.10- Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC	67
- Método	67
- Procedimento experimental	68
- Soluções reagentes	69
3.11- Dosagem de MDA	72
- Método	72
- Soluções reagentes	72
3.12- Análise Estatística	72
4- RESULTADOS	73
4.1- Estudos Comportamentais	73

4.2- Estudos Bioquímicos	79
4.2.1- Ensaio de <i>Binding</i>	79
4.2.2- Dosagem de monoaminas	81
4.2.3- Dosagem de MDA	93
5- DISCUSSÃO	96
5.1- Estudos Comportamentais	100
5.2- Estudos Bioquímicos	102
5.2.1- Ensaio de <i>Binding</i>	102
5.2.2- Dosagem de monoaminas	104
5.2.3- Dosagem de MDA	107
6- CONCLUSÕES	110
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1-	Localização da glândula pineal	01
Figura 2-	Concentrações plasmáticas de melatonina	04
Figura 3-	Níveis sanguíneos de melatonina durante o dia e a noite em humanos com três faixas de idade diferentes	06
Figura 4-	Circuito de ativação da produção de melatonina pela glândula pineal	08
Figura 5-	Síntese de melatonina	10
Figura 6-	Controle da expressão temporal da NAT	13
Figura 7-	Vias metabólicas para a melatonina	15
Figura 8-	Diagrama representativo de uma célula, mostrando os locais de produção dos radicais livres	26
Figura 9-	Diagrama representativo da respiração mitocondrial, mostrando as vias de produção de radicais livres derivados do oxigênio	27
Figura 10-	Diagrama representativo da ação inativadora de radicais livres da melatonina	31
Figura 11-	Estruturas químicas da melatonina e da N-acetilserotonina	32
Figura 12-	Diagrama representativo da ação da glutathione peroxidase	36
Figura 13-	Diagrama representativo do papel potencial dos radicais livres no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade	50
Figura 14-	Distribuição das vias dopaminérgicas no SNC	51

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 15-	Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de rato	62
Figura 16-	Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica	69
Figura 17-	Cromatograma das dosagens das monoaminas detectados eletroquimicamente usando HPLC	71

RESULTADOS

1- Estudos Comportamentais

Figura 1-	Efeito da melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal estriatal induzida pela 6-OHDA.	75
Figura 2-	Efeito da melatonina (5mg/kg, i.p. tratado 1h após a lesão com 6-OHDA e diariamente durante 14 dias) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal estriatal induzida pela 6-OHDA.	76
Figura 3-	Efeito da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, antes da injeção com 6-OHDA e 1h após a injeção de 6-OHDA mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA.	77
Figura 4-	Efeito da melatonina (5mg/kg, i.p.) e da NAS (5mg/kg, i.p.) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão	78

estriatal estriatal induzida pela 6-OHDA.

2- Estudos Bioquímicos

2.1- Dosagens de monoaminas

- Figura 5-** Efeito da melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). 87
- Figura 6-** Efeito da melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de 5HT e 5-HIAA em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). 88
- Figura 7-** Efeito da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). 89
- Figura 8-** Efeito da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de 5HT e 5-HIAA em corpo estriado de rato (lado ipsilateral/contralateral, %). 90
- Figura 9-** Efeito da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, antes da injeção com 6-OHDA e 1h após a injeção de 6-OHDA mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento) nos níveis de DA, DOPAC e HVA em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). 91
- Figura 10-** Efeito da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, antes da injeção com 6-OHDA e 1h após a injeção de 6-OHDA mais 7 dias, perfazendo 2

semanas de tratamento) nos níveis de 5HT e 5-HIAA em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %).

2.2- Dosagem de MDA

Figura 11- Efeito da melatonina (5mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) na peroxidação lipídica em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA. 94

LISTA DE TABELAS

RESULTADO

Ensaio de binding

Tabela 1-	Efeitos da melatonina e da N-acetilserotonina na densidade dos receptores dopaminérgicos em corpo estriado de ratos tratados com 6-OHDA.	80
------------------	--	----

Dosagens de monoaminas

Tabela 2-	Efeito da melatonina nos níveis de dopamina (DA), serotonina (5HT) e seus metabólitos (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos tratados com 6-OHDA.	86
------------------	---	----

Dosagem de MDA

Tabela 3-	Efeito da melatonina nos níveis estriatais de MDA em ratos lesionados com 6-OHDA.	95
------------------	---	----

LISTA DE QUADROS

INTRODUÇÃO

Quadro 1-	Características dos receptores de membrana da melatonina	20
------------------	--	----

LISTA DE ESQUEMAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Esquema 1 -	Esquema de tratamento da melatonina durante 7 dias após a lesão, conforme protocolo experimental-1	57
Esquema 2-	Esquema de tratamento da melatonina durante 14 dias consecutivos após a lesão, conforme protocolo experimental-2	58
Esquema 3-	Esquema de tratamento da melatonina durante 7 dias antes da lesão e depois por mais 7 dias consecutivos após a lesão, conforme protocolo experimental-3	59

ABREVIATURAS

ANOVA- Análise de variância

[³H]-SCH23390- [³H]R-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-penil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina

5-HIAA- ácido-5-hidroxiindolacético

5-HT- serotonina

6-OHDA- 6-hidroxidopamina

Bmax- densidade máxima de receptores

BSA- Albumina sérica bovina

CE- corpo estriado

C- contralateral

DA- dopamina

DOPAC- ácido diidroxifenilacético

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

EPM- Erro padrão da média

HVA-ácido homovanílico

HPLC- Cromatografia líquida de alta performance

HPLC-EC- Cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica

I- Ipsilateral

I.P.- Intraperitoneal

Kd- constante de dissociação

NAS- N-acetilserotonina

NAT- N-acetiltransferase

SCH23390: 7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-5-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3 benzazepine

SNC-sistema nervoso central

3H- Hidrogênio tritiado

RESUMO

Efeitos comportamentais e neuroquímicos da melatonina em ratos submetidos à lesão estriatal com 6-OHDA. LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR. Orientadora: Dra. Glauce Socorro B. Viana. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2002

Os efeitos da melatonina (Mel) *in vivo* foram estudados no sistema dopaminérgico nigroestriatal de ratos, utilizando um modelo experimental da doença de Parkinson que consiste na injeção intraestriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Ratos Wistar, machos (200-250g) foram submetidos a lesão unilateral com 6-OHDA, tratados com melatonina nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. 1 hora após a lesão e depois, diariamente durante 7 dias, quatro semanas após a lesão, foi realizado o teste rotacional e 24 horas depois os animais foram sacrificados, os seus cérebros dissecados e os estriados direito (ipsilateral – lado lesionado) e esquerdo (contralateral – lado não lesionado) utilizados para dosagens de monoaminas em HPLC e ensaios de *binding* dopaminérgico. Para as dosagens de malonildialdeído (MDA), os animais foram sacrificados no oitavo dia após a lesão. Os resultados demonstraram que a injeção intraestriatal de 6-OHDA diminuiu cerca de 77 à 85% os conteúdos das monoaminas e dos seus metabólitos no lado ipsilateral quando comparado com o lado contralateral nos controles. O tratamento com melatonina, nas doses estudadas, reverteu parcialmente as diminuições causadas pela lesão com 6-OHDA nos níveis destes neurotransmissores, e os conteúdos se aproximaram de 50% daqueles observados nos lados contralaterais dos controles ou dos grupos tratados com melatonina. A Mel foi mais eficiente na dose de 5 mg/kg, i.p., e os efeitos foram similares entre as doses mais baixas e as mais altas, característica de um tipo de resposta com a curva em forma de sino. O pré-tratamento e o tratamento crônico com melatonina na dose que obteve o melhor efeito também foram estudados, o tratamento crônico promoveu uma melhor recuperação dos níveis de monoaminas enquanto os efeitos do pré-tratamento foram similares aos do grupo Mel 5 mg/kg, durante 7 dias. O comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3 mg/kg) foi bloqueado em cerca de 60, 89, 78 e 47% nos grupos tratados com melatonina nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p., respectivamente. O tratamento crônico bloqueou o comportamento rotacional em cerca de 96% e o pré-tratamento 86%. A melatonina (5 mg/kg) produziu uma *upregulation* dos receptores D1 (B_{max} : $277,8 \pm 25,8$) associada com uma diminuição nos valores do K_d ($1,5 \pm 0,1$) quando comparado ao controle (B_{max} : $194,8 \pm 19,0$; K_d : $2,9 \pm 0,38$). Um efeito similar foi observado com o tratamento com NAS (B_{max} : $245,3 \pm 27,6$; K_d : $1,1 \pm 0,28$), precursor da melatonina. Foi verificado um aumento nos níveis de MDA, nos controles (127%), quando comparado com o grupo falso operado (104%), o tratamento com melatonina (106%) recuperou esses níveis à valores próximos do normal, sugerindo uma ação antioxidante da melatonina *in vivo*. Os resultados apresentados podem indicar uma ação neuroprotetora da melatonina e sugerem um possível papel no tratamento de doenças neurodegenerativas causadas pelo estresse oxidativo, como a doença de Parkinson.

ABSTRACT

Behavioral and neurochemical effects of melatonin in 6-OHDA-lesioned rats. LISSIANA MAGNA VASCONCELOS AGUIAR. Supervisor: Dr. Glauce Socorro B. Viana. Master's Dissertation. Course of Post-Graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2002

The present work studied the neuroprotective effects of melatonin *In vivo* on the nigrostriatal dopaminergic system in rats after a unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions in rat striatum. Results showed that the intrastriatal injection of 6-OHDA significantly decreases DA, DOPAC and HVA levels. Although there is also a decrease in 5-HT levels no changes were observed in 5-HIAA levels as compared to controls. On the other hand, melatonin (2, 5, 10 and 25 mg/kg, i.p., daily for 7 days) treatment starting 1 h after 6-OHDA lesions, partially reverses the decreases caused by 6-OHDA lesions on these neurotransmitter levels, and contents were brought to approximately 50% of that observed in the contralateral sides of controls or the melatonin treated group. Melatonin was more efficient at the doses of 5 and 10 mg/kg, i.p., and effects were similar between the lowest and highest doses characteristic of a bell-shaped type of response. Pretreatment and cronic treatment with melatonin at the 5mg/kg dose were also tested, cronic treatment promoted a recovery of monoamines levels more efficiently while the pretreatment effects were similar to the melatonin treatment at the dose of the 5mg/kg for 7 days. The apomorphine-induced rotational behavior (3 mg/kg, i.p.) was blocked by 60, 89, 78 and 47% after the doses of 2, 5, 10 and 25 mg/kg, i.p., respectively. Similarly, in this case the doses of 5 and 10 mg/kg were also more efficient. The cronic treatment blocked the rotational behavior by 86%. Melatonin (5mg/kg) produced an upregulation of D1 receptors associated with a decrease in Kd value. While no change was observed in maximum density of D2 receptors, the Kd value was also decreased, a similar effect was observed with its precursor N-acetylserotonin. Compared with sham-operated and expressed as a ratio relative to the contralateral side, there was an increase in the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA, 127%) on controls which was restored to normal levels on the melatonin treated group, suggesting the *in vivo* action of melatonin as an antioxidant. The present results may indicate a neuroprotective action of melatonin and suggest a possible role in the treatment of oxidative stress-induced neurodegenerative disease such as Parkinson's disease.

1- INTRODUÇÃO

1.1- GLÂNDULA PINEAL E MELATONINA

A melatonina, N-acetil-5-hidroxitriptamina, é um neurohormônio produzido principalmente pela glândula pineal. Há mais de três séculos (século XVII), o filósofo francês René Descartes descreveu a glândula pineal como “o centro da alma”. A anatomia já era conhecida desde essa época, uma glândula piriforme, que em humanos está localizada imediatamente acima e por trás da comissura posterior, ocupando uma posição central entre os dois hemisférios cerebrais (**Figura 1**).

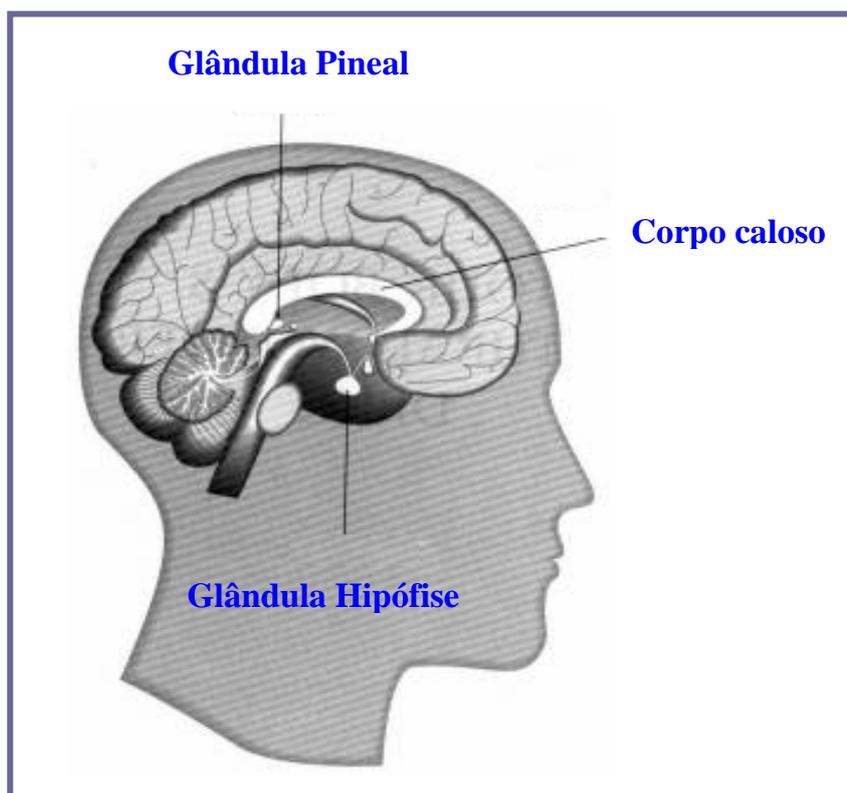


Figura 1: Localização da glândula pineal.

A glândula é inervada pelo sistema nervoso autônomo via *nervi conarii* que emerge do gânglio cervical superior e, por sua vez, recebe sinais da medula espinhal. Esta ligação é a continuidade de um circuito retino-hipotalâmico que se inicia na retina e faz com que os núcleos supraquiasmáticos recebam informações sobre a iluminação ambiental. Os mecanismos que medeiam a síntese de melatonina são regulados pela luz ambiental. O tecido altamente vascularizado da glândula pineal consiste em dois tipos de células: os pinealócitos e a neurógli. Em humanos, os pinealócitos predominam e produzem melatonina e alguns peptídios como a vasopressina (Markus e Lopes, 1998).

Os primeiros estudos em relação à glândula pineal e a melatonina datam de 1917, quando foi observado que a administração de extratos da pineal de bovinos em pele escura de sapo era capaz de provocar clareamento desta pele.

O primeiro sistema *in vitro* usado para os estudos dos efeitos dos compostos indólicos da glândula pineal foi o melanóforo de anfíbio, desenvolvido por Lerner e colaboradores em 1959, que finalmente levou ao isolamento e a caracterização da estrutura da melatonina.

O pigmento existente nos melanóforos de anfíbios é a melanina e a substância que clareava a pele de anfíbios passou então a ser chamada de melatonina, do grego: *melanos* (preto) e *tonos* (cor), constatada como sendo uma amina biogênica com estrutura similar à serotonina. A melatonina está diretamente envolvida na adaptação dos fotoreceptores da retina e dos melanóforos da pele às mudanças na intensidade da luz do ambiente; nos melanóforos, a melatonina induz a rápida agregação dos grânulos contendo melanina na zona perinuclear que resulta no clareamento da pele (Markus e Lopes, 1998).

As primeiras observações em relação as funções da melatonina incluem descobertas tais como: 1) a atividade fisiológica da pineal é influenciada pela luz

ambiental; 2) a glândula contém uma substância, a melatonina, que tem efeitos endócrinos; 3) a função do sistema reprodutor dos roedores está interligada a fisiologia da glândula pineal; 4) a inervação simpática é necessária para manter as suas atividades biossintéticas e endócrinas (Reiter, 1991).

Nos anos 60, foi demonstrado uma relação entre a variação temporal da melatonina e de suas funções fisiológicas, correlacionando o ciclo claro-escuro ambiental com a sua síntese, mostrando que a melatonina funciona como um transdutor fotobiológico, sendo capaz de traduzir biologicamente as variações dos fotoperíodos ambientais.

Sob condições naturais o ciclo ambiental claro-escuro e o oscilador endógeno (núcleo supraquiasmático no hipotálamo), agem em conjunto para produzir um ritmo de síntese diária da melatonina. Um mecanismo neural complexo está envolvido na síntese de melatonina, liberando informação relativa à iluminação ambiental à partir da retina para os pinealócitos via nervo óptico e núcleo supraquiasmático, passando pelas fibras pré-ganglionares da medula espinhal, gânglio cervical superior, nervos simpáticos pós-ganglionares chegando até a glândula pineal. Sob condições de escuro constante o ritmo da produção de melatonina persiste, gerado pela ativação constante do núcleo supraquiasmático. Por outro lado, a exposição à luz suprime rapidamente a síntese de melatonina (Zhdanova e Wurtman, 1997).

A melatonina é uma molécula primitiva, filogeneticamente encontrada em diversas espécies, como organismos unicelulares, plantas e animais vertebrados. Em todos os animais adultos, incluindo o homem, a concentração da melatonina está sempre alta no período escuro (noite), tanto na glândula pineal como na corrente sanguínea (**Figura 2**). Isto denota a maior atividade de síntese noturna da glândula pineal em todas as espécies, independente deles serem ativos durante o dia ou à noite. Uma vez produzida na glândula pineal, a melatonina é rapidamente liberada na corrente sanguínea, a partir da qual se difunde para

dentro de todas as células e outros fluídos corporais, os quais, assim como a própria pineal, exibem um ritmo circadiano de acordo com as concentrações de melatonina.

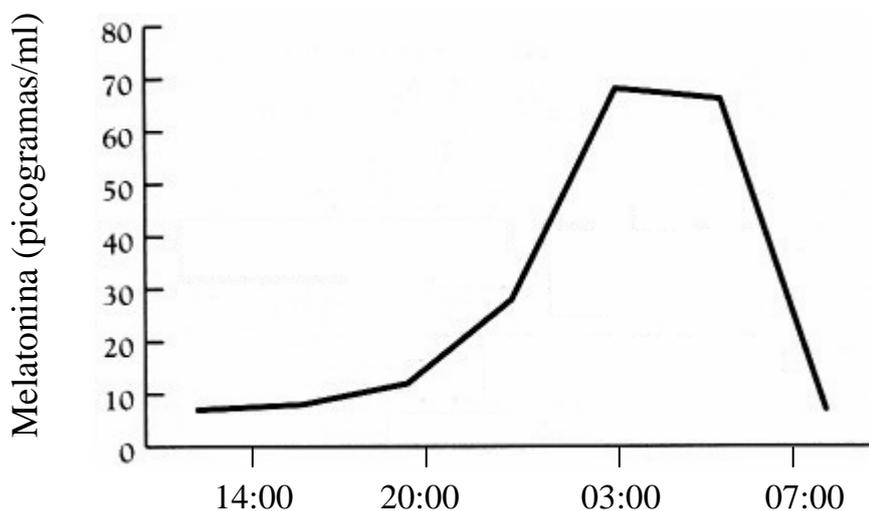


Figura 2: Concentrações plasmáticas da melatonina (pg/mL), mostrando o aumento da síntese noturna, com o pico plasmático se iniciando por volta das 20:00 horas, com um declínio ao amanhecer, onde a luz suprime a sua síntese (in Reiter et al., 1999a).

De início, a melatonina atraía atenção particularmente devido ao seu papel como mediador da informação fotoperiódica do “escuro”. Posteriormente foi verificado que a melatonina controla a organização rítmica circadiana com suas numerosas funções oscilatórias em nível das células, dos órgãos e do comportamento que determinam a ciclicidade anual, especialmente em relação a ritmicidade sazonal. Mais comumente, os efeitos da melatonina têm sido estudados com relação ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, incluindo os aspectos de inibição do pulso gerador do hormônio de liberação das gonadotropinas, puberdade, envelhecimento e várias patologias (Hardeland et al., 1993).

Assim, ao longo da vida adulta a amplitude dos picos de melatonina diminui, e em animais velhos o ritmo dia:noite da melatonina pode ser apenas detectável. Por exemplo, quando o ciclo da melatonina foi comparado em hamsters divididos em grupos de dois e dez meses de idade, a taxa noturna de melatonina na pineal foi apenas detectável nos animais velhos quando comparado com o ciclo visto naqueles com dois meses de idade. Essa redução ao longo dos anos também tem sido relatada em humanos (Reiter, 1995).

No homem, a produção de melatonina varia com a idade. Em crianças com menos de três meses a produção desse hormônio não pode ser detectada, sendo que o início da produção circadiana ocorre apenas após essa data, alcançando altos níveis plasmáticos noturnos entre um e três anos de idade. Durante toda a infância, os níveis noturnos caem progressivamente até 80% e somente após a adolescência os níveis de adulto são alcançados. Ao longo dos anos, durante a vida adulta, a quantidade noturna de melatonina vai diminuindo, e na velhice essa diminuição pode causar alterações fisiológicas, como por exemplo, distúrbios do sono. Em indivíduos a partir de oitenta anos os níveis sanguíneos de melatonina são muito mais baixos do que em indivíduos entre 20 a 30 anos. A diminuição da síntese de melatonina com a idade está também refletida na diminuição da excreção urinária do seu principal metabólito, a 6-hidroximelatonina (Sack et al., 1986) (**Figura 3**).

Esta redução dos níveis de melatonina parece ser uma consequência da diminuição do número de receptores β -adrenérgicos na membrana dos pinealócitos (Reiter, 1995) e possivelmente também pela destruição dos neurônios do núcleo supraquiasmático pelo glutamato, um neurotransmissor excitatório que transmite a informação sobre o fotoperíodo à partir da retina para os neurônios do núcleo supraquiasmático (Poeggeler et al., 1993).

A melatonina atua em diversos órgãos e sistemas e sua ação pode ser exercida através da sua interação com receptores de membrana ou diretamente no

meio intracelular. Os receptores de membrana já foram identificados e alguns subtipos clonados. Os locais de ação intracelulares, através de ligantes seletivos como a calmodulina ou como mediadores de reações químicas específicas, como a ação antioxidante, ainda estão sendo investigados.

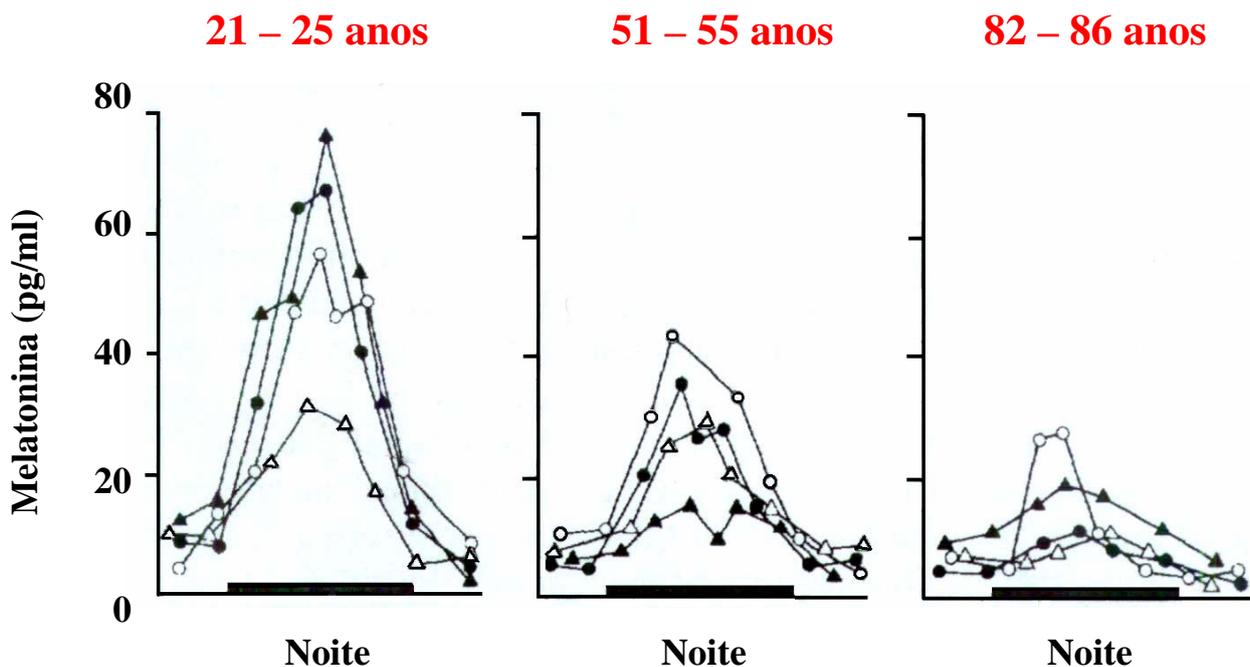


Figura 3: Níveis sanguíneos de melatonina durante o dia e a noite em humanos em três grupos com idades diferentes. Com o envelhecimento, a amplitude dos picos de melatonina e a sua duração no período da noite diminuem (Reiter, 1995).

O espectro de ação da melatonina parece exceder os fenômenos periódicos. Atualmente, a melatonina é conhecida como um rigoroso modulador biológico do humor, sono, fisiologia da retina, comportamento sexual, fisiologia reprodutiva-sazonal e comportamental, ritmo circadiano e função imunológica. Além disso, existem evidências experimentais que refletem a influência da melatonina no envelhecimento, em processos degenerativos relacionados com a idade e em algumas patologias (Beyer, et al., 1998). Essas funções parecem estar relacionadas com a ação antioxidante deste hormônio.

1.2- SÍNTESE DA MELATONINA:

As adaptações às mudanças ambientais são características essenciais da regulação fisiológica. O ritmo circadiano dia/noite é transformado em oscilações hormonais que controlam a fisiologia de todos os organismos vivos. Nos mamíferos, o hormônio melatonina é sintetizado em resposta a estímulos provenientes do relógio endógeno localizado no núcleo supraquiasmático hipotalâmico.

A melatonina é sintetizada principalmente na glândula pineal e na retina, embora tenham sido referidos outros locais, como as glândulas Harderian (glândulas tuboloalveolares situadas na cavidade orbital de muitos vertebrados), o trato gastrintestinal e outros órgãos. Os estudos da via de síntese, em diferentes espécies, tem se concentrado nestes dois tecidos. A melatonina sintetizada na retina exerce uma ação local, e os níveis plasmáticos da melatonina são uma consequência exclusivamente da produção e excreção noturna da melatonina pela glândula pineal.

A síntese da melatonina tanto na glândula pineal como na retina, é controlada pela luz. No caso de glândulas pineais de não mamíferos e em retinas a ação da luz é direta e as células que sintetizam a melatonina possuem propriedades fotorreceptoras.

Na pineal de mamíferos, a informação sobre a iluminação ambiental ocorre via um circuito neural que se inicia na retina. Através do trato retino-hipotalâmico a retina se comunica com os núcleos supraquiasmáticos que, por sua vez, conectam-se com a coluna intermediolateral da medula espinhal. A partir desta, a informação fotoperiódica chega à pineal via inervação simpática.

Assim, a pineal de mamíferos é controlada pelos núcleos supraquiasmáticos e estes tem sua atividade rítmica endógena ativada pela luz ambiental (**Figura 4**).

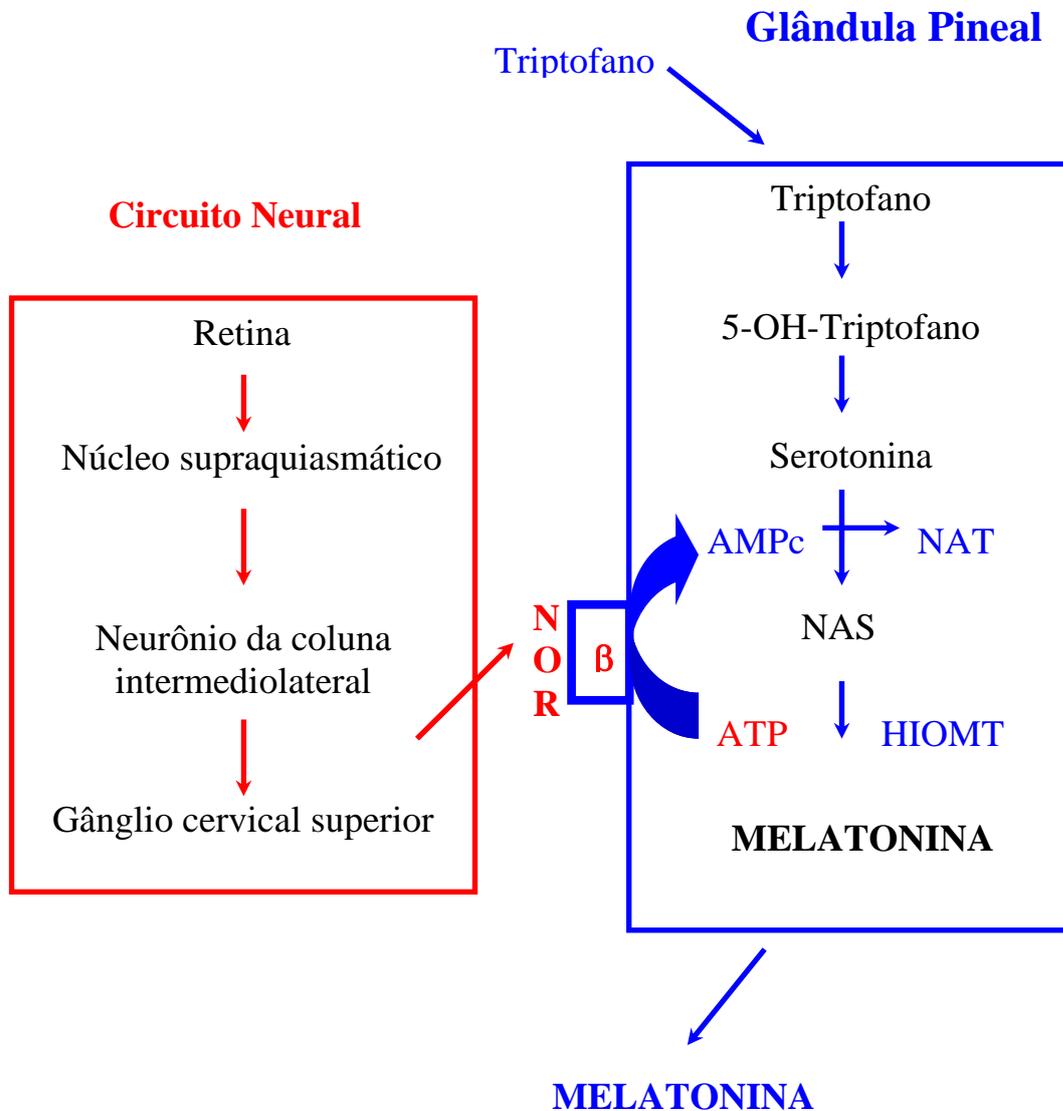


Figura 4: Circuito de ativação da produção de melatonina pela glândula pineal. Na ausência de luz o sinal vindo da retina chega ao Núcleo Supraquiasmático, que faz sinapse com um neurônio da coluna intermédio lateral. Este neurônio conecta-se ao gânglio cervical superior estimulando a liberação de noradrenalina (NOR). A noradrenalina liberada atua em receptores β , aumentando AMPc e estimulando a síntese de melatonina. NAS – N-acetilserotonina, NAT – N-acetiltransferase, HIOMT – hidroxí-indol-O-metiltransferase (Markus e Lopes, 1998).

As adaptações fisiológicas são mediadas por mudanças na expressão de genes (Krieger, 1979; Felig et al., 1987; Foulkes et al., 1997a), as propriedades dos fatores de transcrição e as vias de sinalização que os regulam, constituem a base para a tradução da informação temporal e a regulação do relógio endógeno.

A melatonina é um produto do metabolismo do triptofano pela glândula pineal. A enzima triptofano hidroxilase, cataliza a conversão do triptofano à 5-hidroxitriptofano, que por sua vez é oxidado pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase à serotonina, e esta finalmente é convertida à melatonina através de dois processos que envolvem a atividade de duas outras enzimas, a acetilação à N-acetilserotonina pela arilalquilamina N-acetiltransferase (NAT) e esta, O-metilada, resultando na melatonina pela ação da hidroxí-O-metiltransferase (HIOMT) (**Figura 5**).

A enzima NAT é a enzima limitante para a síntese da melatonina, apresentando um ritmo diário e atingindo concentrações 100 vezes superior na fase de escuro quando comparado com a fase de claro. O ritmo da HIOMT é menos evidente. Esta variação diária da enzima NAT faz com que a redução dos níveis de serotonina, na fase de claro, seja acompanhada pelo aumento nas concentrações de NAT e da melatonina.

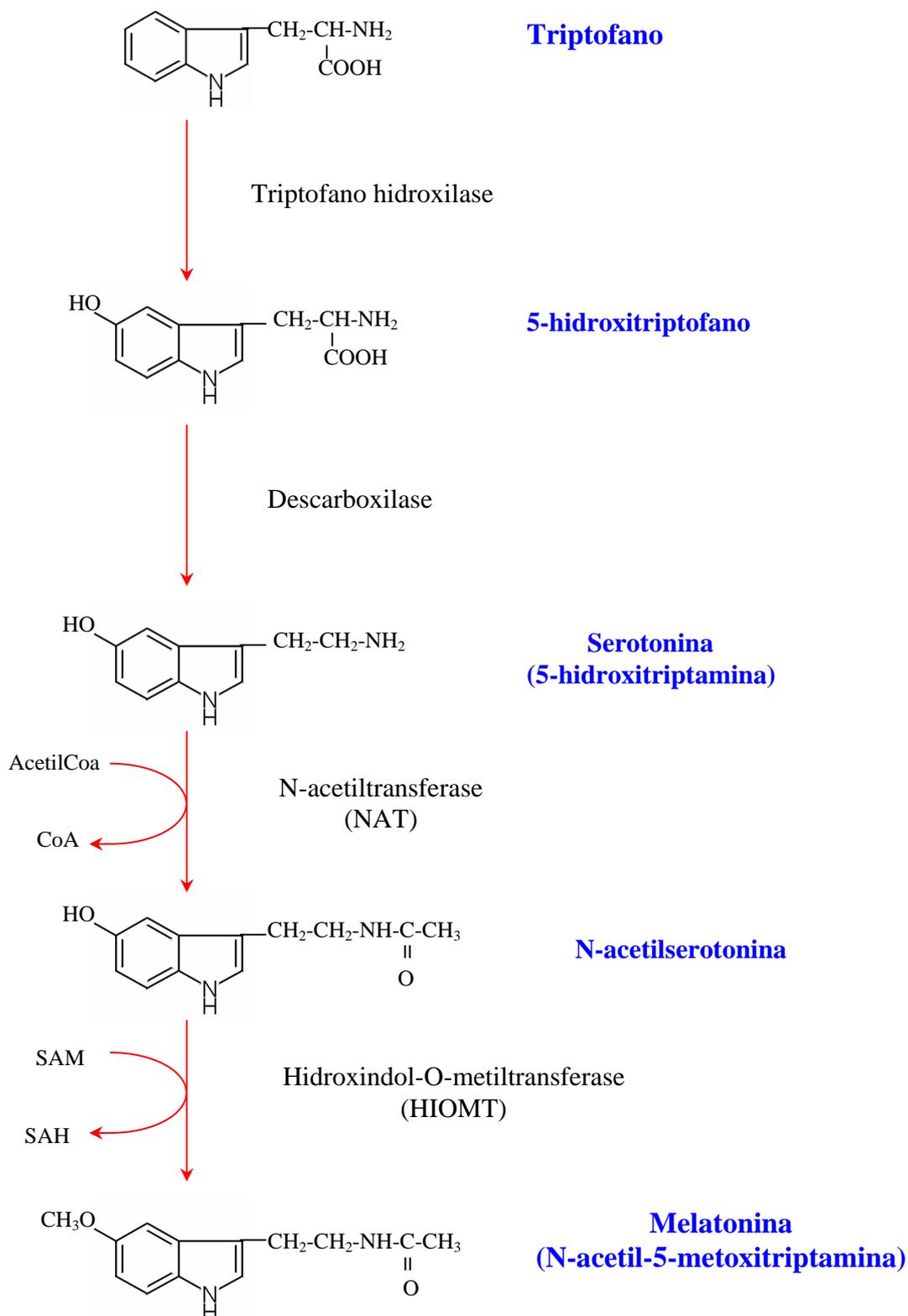


Figura 5: Síntese da melatonina na glândula pineal; SAM = S-adenosilmetionina, SAH = S-adenosil-homocisteína.

A presença da N-acetiltransferase e a síntese de melatonina derivam da ativação da inervação simpática da pineal nos mamíferos à noite. A ligação da noradrenalina aos β -adrenoreceptores estimula a atividade da adenilato ciclase, resultando no aumento do AMPc que, por sua vez, ativa a NAT (Foulkes et al., 1997b).

Os receptores α 1-adrenérgicos também participam da estimulação da NAT (Foulkes et al., 1997a). Aparentemente, isso ocorre pela ativação do ciclo dos fosfoinosítídeos e da proteína kinase C, os quais potenciam a produção do AMPc induzido pelos β -adrenoreceptores. Então, a noradrenalina sendo liberada na fase de escuro estimula adrenoreceptores α 1 e β 1 produzindo aumento de cálcio intracelular e AMPc, respectivamente. O aumento noturno dos níveis intracelulares de AMPc é a chave para uma *upregulation* da NAT e, conseqüentemente, aumento da síntese de melatonina (Takahashi, 1994).

Aumentos dos níveis intracelulares de AMPc levam a ativação de uma proteína kinase A (PKA) AMPc-dependente e do transporte de subunidades catalíticas para o núcleo (Krebs e Beavo, 1979). Os objetivos da fosforilação nuclear incluem um grupo de fatores de transcrição os quais modulam a expressão de genes responsivos ao AMPc (CREs). Esses fatores constituem uma família de moduladores que podem ser ativadores ou repressores, os quais se ligam como homo e heterodímeros aos elementos responsivos ao AMPc (CREs) (Foulkes e Sassone-Corsi, 1996).

Experimentos com pinealócitos de ratos demonstraram que a noradrenalina induz a fosforilação do CREB (elemento de ligação protéica responsivo ao AMPc, um fator de transcrição que modula a expressão de genes responsivos ao AMPc) e que a proteína quinase A (PKA) é a enzima responsável pela fosforilação do CREB (Zawilska e Nowark, 1999). A fosforilação do CREB, constitutivamente expresso, o converte em um poderoso ativador transcripcional. O CREB fosforilado (pCREB) se liga ao elemento CRE na região promotora do

gene da NAT, levando a uma forte ativação do processo de transcrição (Korf et al., 1996; Roseboom et al., 1996). Em adição a isso, pCREB também se liga ao elemento CRE na região promotora do gene modulador de CRE (CREM) (Foulkes et al., 1997a; Foulkes et al., 1997b). A ativação do gene CREM ativa um repressor de genes de expressão induzível (ICER) (Foulkes et al., 1996a; Foulkes et al., 1996b; Foulkes et al., 1997a; Foulkes et al., 1997b; Korf et al., 1996; Stehle et al., 1993). Este pequeno fator contém somente um domínio de ligação ao DNA e funciona como um repressor dominante da transcrição do DNA induzida pelo AMPc, funcionando portanto como repressor da síntese de NAT (**Figura 6**).

Assim como a N-acetiltransferase, o RNAm para o ICER possui uma ritimicidade diurna na glândula pineal de ratos (Foulkes et al., 1997a). O pico do RNAm para o ICER ocorre durante a segunda parte da noite, apenas precedendo o declínio da síntese de melatonina.

É interessante notar que este padrão é regulado durante o crescimento, sendo inexistente no nascimento e ocorrendo apenas entre a primeira e a segunda semana de vida (Stehle, 1995). Isto coincide com a maturação da inervação simpática que liga o núcleo supraquiasmático à pineal, bem como com o desenvolvimento da capacidade do AMPc de induzir a expressão gênica dentro da pineal e com o aparecimento da elevação da síntese da melatonina à noite. Juntas, essas observações sugerem que o ICER pode funcionar promovendo uma *downregulation* da produção de melatonina, através da inibição da transcrição da NAT no final da noite.

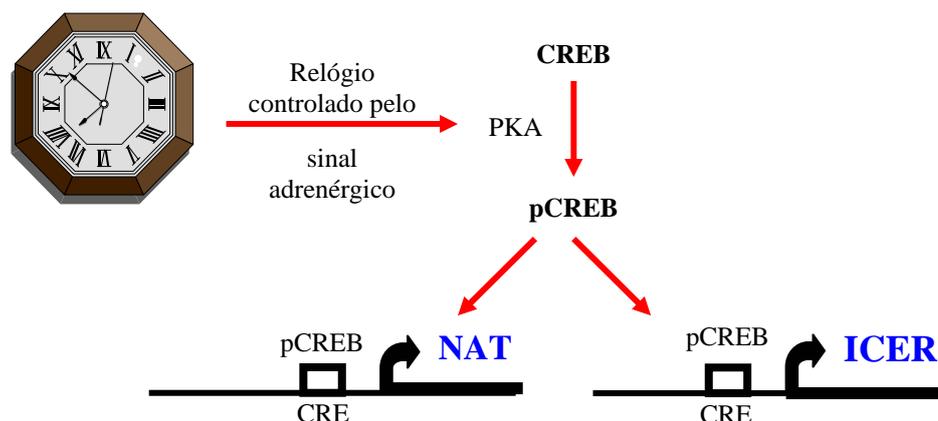


Figura 6: Controle da expressão temporal da NAT. À noite, o sinal adrenérgico ativa uma quinase dependente de AMPc (PKA) que fosforila o CREB. O pCREB ativa a transcrição de genes "noturnos" da pineal (Markus e Lopes, 1998).

1.3- METABOLIZAÇÃO DA MELATONINA

Uma vez sintetizada, na glândula pineal, a melatonina é rapidamente liberada no sistema vascular, atingindo outros fluidos corporais tais como saliva, líquidos cerebrospinal, seminal, amniótico, etc. A rápida difusão da melatonina está ligada à sua propriedade de ser uma molécula altamente lipofílica, passando através das membranas dos pinealócitos e das células endoteliais que recobrem os capilares. Após pinealectomia os níveis plasmáticos de melatonina não são detectáveis, mostrando que a produção pela pineal é responsável pela manutenção das concentrações plasmáticas da melatonina (Reiter, 1995).

As duas principais vias de metabolização da melatonina ocorrem no fígado e no cérebro, apenas 1% da melatonina é excretada inalterada na urina. A maior parte da melatonina é metabolizada no fígado, por hidroxilação, formando 6-hidroximelatonina; esta é então conjugada com sulfato ou glicuronato e excretada na urina, sendo mais comum a forma sulfatada. No cérebro pode ser

convertida a N-gama-acetil-N-2-formilmetoxiquinurenamina, que é então degradada à N-gama-acetil-5-metoxiquinurenamina. Outras vias menos importantes são a sua desmetilação, formando então a N-acetilserotonina, que é o próprio precursor da melatonina nas estruturas que possuem a enzima N-acetiltransferase, e a formação de 2-hidroximelatonina cíclica, ocorrendo em várias células (**Figura 7**).

O metabolismo resulta em uma rápida cinética de eliminação. Em humanos a eliminação ocorre em duas fases: a primeira com meia vida de 3 minutos e a segunda de 45 minutos. A ação fisiológica dos metabólitos da melatonina ainda não está determinada, mas, sabe-se que a N-acetilserotonina possui alta afinidade por um dos subtipos de receptores de membrana da melatonina (Markus e Lopes, 1998).

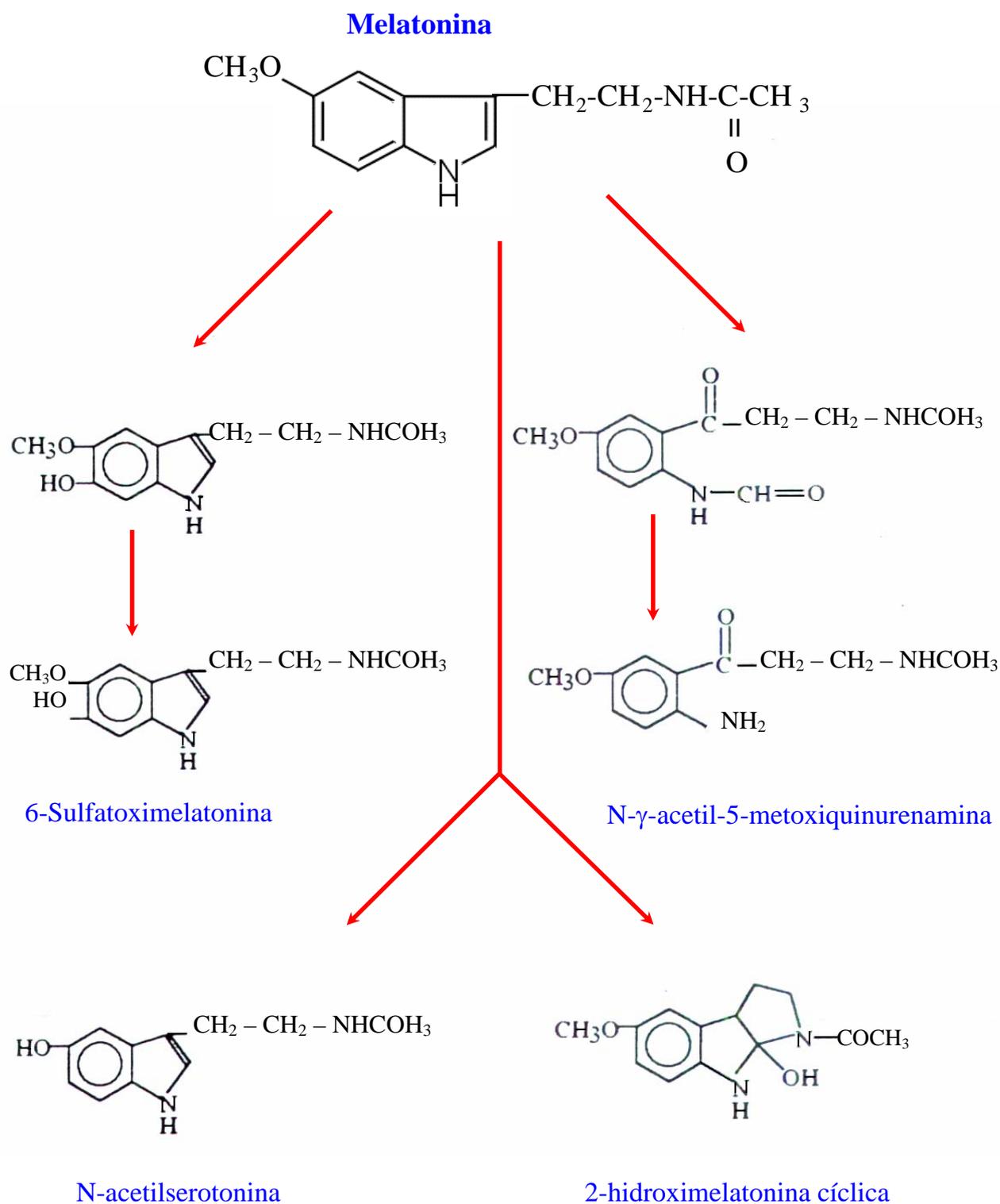


Figura 7: Vias metabólicas para a melatonina. As principais vias metabólicas da melatonina são: a hidroxilação na posição 6 que ocorre no fígado e a abertura do anel na posição 2 que ocorre no cérebro. Vias metabólicas menos importantes dão origem a N-acetilserotonina e a 2-hidroximelatonina cíclica.

1.4- MECANISMOS DE AÇÃO DA MELATONINA

A melatonina é uma molécula com alto coeficiente de partição óleo-água, atuando tanto na membrana plasmática como no interior da célula. No entanto, mecanismos ou locais de ação intracelulares para a melatonina ainda não foram definidos. Os estudos mostram ação antioxidante e ação inibitória sobre a enzima calmodulina. Esses efeitos somente foram descritos utilizando doses de melatonina acima das concentrações atingidas no organismo. Por outro lado, a existência de receptores de membrana foi definida, sendo que alguns deles já foram clonados. Então, os mecanismos de ação da melatonina podem ser subdivididos em:

- 1- Mecanismo de ação extracelular: via receptores de membrana
- 2- Mecanismos de ação intracelulares, neste caso a melatonina poderá agir através de:

- Inibição da enzima cálcio-calmodulina;
- Receptores nucleares;
- Ação antioxidante - "scavenger" de radicais livres;

1.4.1- RECEPTORES DE MEMBRANA

Inicialmente, o ligante utilizado nos diversos trabalhos de pesquisa na área, para demonstrar a presença de receptores de membrana para a melatonina foi a [³H]melatonina quando, então, foram descobertas ligações específicas para este hormônio em tecido cerebral bovino (Cardinali et al., 1979) e periférico (Cohen et al., 1978). Contudo, esse ligante apresentava uma baixa especificidade, não permitindo uma correlação entre as suas ações fisiológicas e a interação molecular.

Apenas em 1984, com a síntese da 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina (Vakkuri e col., 1984), que é um ligante de alta especificidade, foram descobertos os sítios de ligação e a caracterização farmacológica dos receptores da melatonina em membranas das células de diferentes tecidos, neuronal e não-neuronal, como 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 gastro-intestinal, ducto deferente entre outros (Markus e Lopes, 1998).

Os receptores da melatonina na retina são responsáveis pela regulação da função visual, e os receptores do núcleo supraquiasmático do hipotálamo estão envolvidos com os efeitos da melatonina no ritmo circadiano. Receptores neuronais do núcleo paraventricular do tálamo parecem regular a função límbica. Receptores não-neuronais, como aqueles localizados na *pars tuberalis* parecem regular a função reprodutiva em espécies que procriam sazonalmente, e aqueles das artérias cerebral e caudal podem estar envolvidos com a regulação da função cardiovascular e da temperatura (Dubocovich, 1995).

Estudos de relação de potência entre ligantes indicam a existência de dois subtipos de receptores para a melatonina, classificados em ML₁ e ML₂ (Dubocovich, 1995). O primeiro receptor funcional da melatonina em tecido de mamífero foi encontrado na retina de coelho. Na retina, a melatonina inibe a liberação de dopamina cálcio-dependente, através da ativação de um receptor caracterizado farmacologicamente como sendo do subtipo ML₁. Os receptores do tipo ML₁, já clonados, possuem alta afinidade (10-300pM), e são encontrados na retina, núcleo supraquiasmático, artérias caudais, *pars tuberalis*, entre outros, apresentam a seguinte relação de potência entre ligantes capazes de competir com a 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina: 2-iodomelatonina ≥ melatonina > 6-hidroxi melatonina >> N-acetilserotonina >> serotonina > prazosin.

Os receptores do tipo ML₂ foram estudados a partir de cérebro de hamster

(Eison e Mullins, 1993) e foram caracterizados por Dubocovich et al. (1995) em cérebro de galinha, possuem baixa afinidade (nM) para melatonina e a relação de potência para diferentes ligantes (2-iodomelatonina > prazosin \geq N-acetilserotonina \geq 6-hidroxi melatonina \geq melatonina \gg serotonina) mostra que existe uma alta afinidade para N-acetilserotonina, sendo bloqueados por prazosin (antagonista noradrenérgico). Os ML₂ ainda não foram clonados, o que dificulta a sua localização. Estes receptores estão provavelmente acoplados à proteína Gi promovendo a inibição da adenililciclase, sendo seu evento final a diminuição dos níveis de AMPc.

Três subtipos de receptores do tipo ML₁ (Mel_{1a}, Mel_{1b} e Mel_{1c}) foram clonados (Reppert e col. 1996). O primeiro destes foi isolado a partir de melanóforos de *Xenopus laevis*, designados Mel_{1c}, logo depois, dois outros subtipos foram isolados, Mel_{1a} e Mel_{1b}, que foram encontrados em mamíferos.

Os receptores do subtipo Mel_{1a} estão presentes no núcleo supraquiasmático e na *pars tuberalis* podendo estar relacionados com reprodução e atividade circadiana da melatonina (Roca e col., 1996). Os receptores Mel_{1b} estão envolvidos no controle fotoperiódico de sensibilidade à luz na retina de mamíferos e aves. O subtipo Mel_{1c} foi descrito apenas em anfíbios e aves.

A técnica de expressão de clones usando RNAm de melanofóros de *Xenopus laevis*, levou ao isolamento de um cDNA que codifica o receptor da melatonina. Este cDNA codifica uma proteína de ligação com alta afinidade para a 2-[125I]-iodomelatonina, que possui 420 aminoácidos e contém 7 segmentos hidrofóbicos transmembrânicos. Também foram clonados receptores de melatonina de humanos e de carneiros. Os receptores de humanos são formados por 350 aminoácidos e os de carneiro por 366 aminoácidos e ambos possuem 60% de homologia com aqueles clonados a partir do *Xenopus laevis*. Estes receptores parecem ser membros de uma nova subfamília de receptores acoplados à proteína G que mostram uma baixa homologia com outros grupos de

receptores conhecidos.

Recentemente, a IUPHAR (União Internacional de Farmacologia, 1999) estabeleceu uma nova nomenclatura para estes receptores. O primeiro receptor clonado Mel_{1a} passa a ser chamado *mt1*, os receptores Mel_{1b} passam a *MT2* e os do subtipo ML_2 passam a ser denominados *MT3* (Alexander e Peters, 2001). Segundo as normas da IUPHAR receptores clonados, cuja função e localização biológica ainda não foram obtidas são escritos em letras minúsculas (*mt1*), receptores clonados e com função definida são escritos em letras maiúsculas (*MT2*) e receptores que tenham sido verificados por métodos funcionais, mas que não tenham sido clonados são escritos em letras maiúsculas, mas em itálico (*MT3*). Essa nova classificação foi feita apenas para receptores encontrados em mamíferos e portanto a nomenclatura não abrange o subtipo Mel_{1c} que só foi encontrado em anfíbios e aves (**Quadro 1**).

Estudos moleculares e farmacológicos atestam a presença de receptores da melatonina no sistema nervoso humano. Os receptores da melatonina foram localizados no núcleo supraquiasmático e no cerebelo, através da autoradiografia do receptor usando a 2- $[^{125}I]$ -iodomelatonina (Reppert et al., 1988; Weaver e Reppert, 1996; Dubocovich et al., 2000). Em membranas cerebelares de humanos *postmortem* sítios de ligação à 2- $[^{125}I]$ -iodomelatonina mostraram características farmacológicas similares aquelas do receptor *mt1* humano (Dubocovich et al., 1997; Beresford et al., 1998).

Quadro 1: Características dos receptores de membrana da melatonina

Nomenclatura	MT ₁	MT ₂	MT ₃
Outros nomes	MEL _{1A} , ML _{1A} , Mel _{1a}	MEL _{1B} , ML _{1B} , Mel _{1b}	ML ₂
Agonistas seletivos	—	IIK7	N-acetil-5HT 5MCA-NAT
Antagonistas seletivos	—	4-P-PDOT K185, DH97	prazosin
Acoplamento	G _{i/o}	G _{i/o}	—
Segundos mensageiros	↓ AMPc	↓ AMPc	↑ Ca ⁺⁺

Fonte: Trends in Pharmacological Sciences including toxicological sciences. Twelfth edition, compiled by S.P.H. Alexander, A. Mathie & J.A. Peters. 2001 - Nomenclature supplement.

Nomes químicos:

- **IIK7:** N-butanoyl-2-(2-methoxy-6H-isoindolo [2,1-a]indol-11yl)ethanamine
- **5MCA-NAT:** 5-methoxy-carbonylamino-N-acetyltryptamine,
- **4P-PDOT:** 4-phenyl-2-propionamidotetraline,
- **K185:** N-butanoyl-2-(5,6,7-trihydro-11-methoxybenzo[3,4]cyclohept [2,1-a]indol-13yl)ethanamine,
- **DH97:** 2-benzyl-N-pentanoyltryptamine.

Os RNAm para o mt1 e MT2 têm sido encontrados em tecidos humanos usando a transcriptase reversa em PCR (*polymerase chain reaction*). O RNAm para o mt1 foi localizado no núcleo supraquiasmático e na retina, e o MT2 na retina, no hipocampo e por todo o cérebro (Reppert et al., 1996; Weaver e Reppert, 1996; Dubocovich et al., 1998). Usando histoquímica com hibridização *in situ* o receptor mt1 foi localizado no núcleo supraquiasmático e na camada de células granulares de cérebros humanos *postmortem* (Dubocovich et al., 2000). Foi demonstrado a localização do RNAm para MT2 na glia cerebelar de humanos e nos astrócitos. Esses dados sugerem que ambos os subtipos de receptores da melatonina estão presentes no cérebro humano e na retina, os quais representam alvos terapêuticos para ações das drogas.

A ativação mediada pela melatonina do subtipo mt1 no núcleo supraquiasmático e/ou outras áreas do sistema límbico podem mediar efeitos

relacionados ao sono (Liu et al., 1997), enquanto a ativação do subtipo MT2 pode estar envolvido na regulação do ritmo circadiano (Dubocovich et al., 1998), isto sugere que agonistas e/ou antagonistas seletivos para receptores MT2 podem ser usados para tratar desordens envolvendo alterações no ritmo circadiano como observado na depressão (Dubocovich et al., 2000), na cegueira (Armstrong e Redman, 1993), ou quando há uma rápida mudança no ciclo claro/escuro como no “jet lag” (em viagens com mudança de fuso horário) e na mudança de turno de trabalho (Armstrong e Redman, 1993). Essas observações sugerem que o uso de antagonistas seletivos para receptores mt1 e MT2 pode elucidar o papel funcional da melatonina em mamíferos e pode iniciar o desenvolvimento de análogos seletivos para o tratamento da insônia e desordens do sono e do humor (Dubocovich et al., 2000).

AÇÕES INTRACELULARES DA MELATONINA

A melatonina é uma molécula lipossolúvel, com a capacidade de atravessar a membrana celular e agir no interior das células, em cada compartimento subcelular. No entanto, mecanismos ou locais de ação intracelulares para a melatonina ainda não foram bem definidos. Os estudos mostram a interação da melatonina com receptores nucleares, ação inibitória sobre a calmodulina e uma ação antioxidante. Essas ações intracelulares somente foram observadas utilizando doses farmacológicas de melatonina, ou seja, doses acima das concentrações atingidas no organismo.

1.4.2- INIBIÇÃO DA CALMODULINA

A melatonina pode se difundir rapidamente dentro das células ativando elementos intracelulares através da ligação à calmodulina citossólica, uma vez ligada, a melatonina pode influenciar na sinalização do cálcio através de interações com enzimas efetoras como a adenilil ciclase e as fosfodiesterases, bem como associações com a tubulina e os microtúbulos.

Estudos recentes (Wolfler et al., 1998) sugerem que o mecanismo de ação da melatonina pode ser através da modulação da calmodulina ativada pelo cálcio (CaM). A melatonina é capaz de se ligar a calmodulina com alta afinidade e promover uma ação antagonista dos efeitos desta última.

Experimentos *in vitro* revelaram que a melatonina é capaz de inibir várias enzimas cálcio-calmodulina ($\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$) dependentes (Benitez-King et al., 1991; Benitez-King et al., 1996; Pozo et al., 1994; Pozo et al., 1997) apenas na presença do cálcio e da calmodulina (CaM), e tem sido relatada a capacidade da melatonina de se ligar com alta afinidade à calmodulina ativada pelo cálcio (Benitez-King et al., 1993).

A ligação da melatonina promove uma alteração na conformação da calmodulina (Benitez-King et al., 1991), que é responsável pelos efeitos antagonistas da melatonina, ocorre em concentrações nanomolares (Huerto-Delgadillo et al., 1994) e foi relatada como sendo cerca de 100 vezes mais potente do que o antagonista farmacológico da calmodulina, a Trifluoperazina. Benitez-King et al., 1993 relataram uma influência da melatonina na estrutura do citoesqueleto similar as drogas antagonistas da calmodulina em rim de cães e em células da linhagem neuroblastoma murina. Baseados na co-localização da calmodulina e da melatonina, como mostrado através da coloração de imunofluorescência, foi observado que a melatonina altera a organização do citoesqueleto celular, antagonizando os efeitos da calmodulina nestas linhagens de células (Benitez-King e Antón-Tay, 1993).

Foi demonstrado (Benitez-King et al., 1996) que em concentrações fisiológicas a melatonina liga-se a calmodulina impedindo a formação dos complexos peptídeo ativador de mitose (MAP)-calmodulina e tubulina-calmodulina, resultando em um aumento da rede de microtúbulos. Em células N1E-115, que são uma linhagem estabelecida de células neuronais, foi demonstrado que o rearranjo dos microtúbulos induzidos pela melatonina leva à

formação de neuritos. A melatonina não atua sobre todas as isoformas de calmodulina, conferindo um certo grau de especificidade a este mecanismo de ação.

A ligação da melatonina à calmodulina pode levar a inibição de uma série de processos. A calmodulina ativa cinco tipos diferentes de proteínas quinases, que modulam funções celulares importantes através da fosforilação protéica, dentre essas quinases, a quinase II - Ca²⁺/calmodulina-dependente, é a enzima mais abundante no sistema nervoso, no cérebro a quinase pode fosforilar um grande número de substratos envolvidos na síntese de neurotransmissores, na liberação, no transporte axonal e na mobilização do receptor. Benitez-King et al., 1996, verificaram que *in vitro* a melatonina inibe a atividade da quinase II-calmodulina-dependente e a sua fosforilação, sugerindo que a melatonina pode agir no tecido neural modulando a fosforilação de proteínas dependentes de calmodulina.

1.4.3- LIGAÇÃO À RECEPTORES NUCLEARES

Estudos mostraram que a melatonina pode interagir com uma família de receptores órfãos nucleares conhecidos como receptores retinóides-Z (RZR/ROR α e β) (Beyer et al., 1998). Estes receptores pertencem a uma subfamília que compõem a superfamília dos receptores nucleares que são os alvos dos hormônios esteroidais (estrógenos, andrógenos, glicocorticóides e mineralocorticóides) da vitamina D3, do hormônio triiodotironina e dos retinóides (Carlberg e Wiesberg, 1995).

Embora os ligantes e a função fisiológica dos receptores nucleares órfãos sejam ainda desconhecidos, a expressão destes no cérebro sugere papéis funcionais diferentes para cada um deles no sistema nervoso. Os receptores RZR β são conhecidos como sendo a isoforma específica para o cérebro e são expressos em grande quantidade no sistema circadiano como a retina, a glândula

pineal e o núcleo supraquiasmático hipotalâmico. A expressão deste receptor na pineal apresenta um ritmo regido pelo fotoperíodo e dependente da estimulação de adrenoreceptores com produção de AMPc (Baler et al., 1996).

A ativação de receptores nucleares leva ao controle de expressão gênica, portanto, a melatonina, que age como um ligante natural para os receptores órfãos retinóides deve ter um papel regulador da síntese protéica.

1.4.4- AÇÃO ANTIOXIDANTE

Estudos recentes mostraram que a melatonina pode agir como um "sequestrador" de radicais livres e um antioxidante. Embora níveis farmacológicos (muito mais altos do que aqueles normalmente presentes endogenamente) de melatonina apresentem uma atividade protetora substancial contra o dano molecular causado pelos radicais livres, este papel como antioxidante fisiológico ainda está sob ativa investigação (Reiter, 1998).

Os radicais livres tem sido implicados na toxicidade de muitos agentes químicos, como o safrole, o paration, entre outros; na patogênese de muitas doenças inflamatórias, nas doenças de Parkinson, de Alzheimer, na fibrose pulmonar idiopática, nefrose autoimune, na catarata, esclerose múltipla, porfiria, aterosclerose, câncer, e também em uma grande variedade de doenças degenerativas relacionadas com a idade, e com o envelhecimento (Kehrer, 1993; Reiter et al., 1999b).

Por causa da diminuição na produção da melatonina em idosos, este hormônio tem sido sugerido como um dos sinalizadores do processo de envelhecimento. A capacidade da melatonina de agir como um "sequestrador" de espécies ativas do oxigênio abre uma importante perspectiva para a sua aplicação como um agente terapêutico em processos patológicos que envolvem geração de radicais livres (Reiter, 1998).

Radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Em geral, são instáveis e têm vida muito curta devido à natureza livre de seus elétrons que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (Halliwell, 1994). Essas moléculas causam danos teciduais por interagirem com carboidratos, DNA, lipídios e proteínas (**Figura 8**).

Além dos radicais livres, existem também as chamadas "espécies reativas do oxigênio" que são agentes potencialmente patogênicos derivados do metabolismo do oxigênio (O_2): radicais livres e moléculas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e outras, que embora tenham grupos funcionais contendo oxigênio quimicamente reativo, não possuem elétrons desemparelhados e portanto, não são radicais (Ferreira e Matsubara, 1997) (**Figura 9**).

Os seres humanos estão constantemente expostos a radicais livres e espécies reativas do oxigênio geradas por radiações ionizantes, agentes tóxicos, poluentes ambientais, etc. Porém, as células também são capazes de produzir espécies reativas do oxigênio, tais como: o peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido, hidroxila e óxido nítrico.

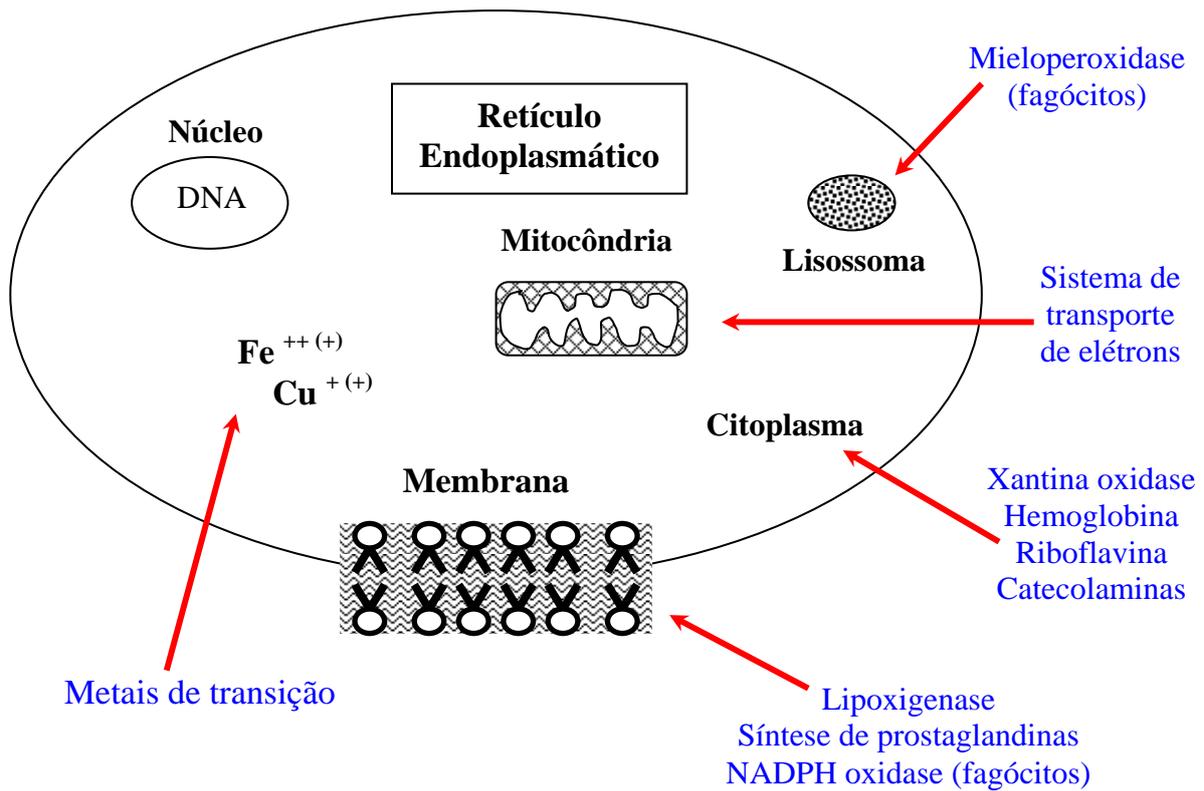


Figura 8: Diagrama representativo de uma célula, mostrando os locais de produção dos radicais livres. Os radicais livres são produzidos por uma grande variedade de processos que muitas vezes envolvem enzimas de ligação à membrana e enzimas solúveis. Todas as células aeróbicas produzem pelo menos alguns radicais livres (Reiter, 1998).

Visto que participam de reações essenciais ao organismo as espécies reativas do oxigênio são constantemente formadas e podem ser prejudiciais, quando sua produção foge do controle exercido pelos antioxidantes de defesa endógenos, como as enzimas superóxido dismutase, as catalases e a glutathione peroxidase e outros antioxidantes como a albumina (Halliwell e Gutteridge, 1990), a vitamina E (Muller e Gross-Sampson, 1990).

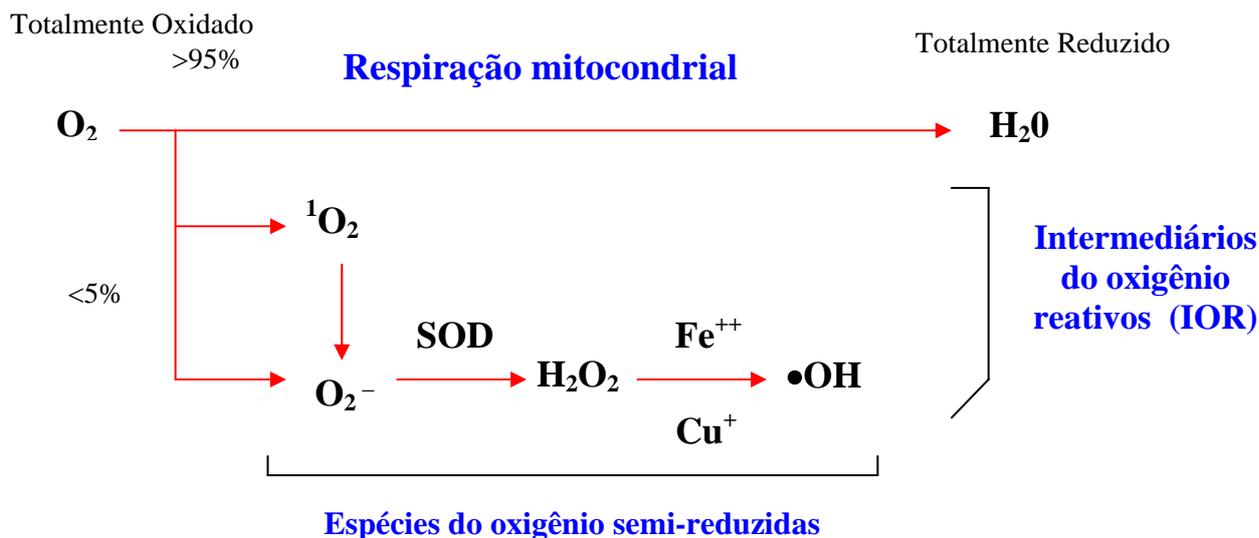


Figura 9: O metabolismo do oxigênio (O_2) em animais aeróbicos resulta na geração de uma variedade de espécies do oxigênio semi-reduzidas, que são denominadas de espécies reativas do oxigênio e algumas delas são radicais livres. O 1O_2 é uma forma ativada do oxigênio O_2 que pode causar danos às moléculas, enquanto o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil ($\bullet OH$) possuem um elétron não pareado e são verdadeiros radicais livres; destes, o radical peróxil é o mais lesivo. As SOD são uma família de enzimas conhecidas como superóxidos dismutases; H_2O_2 peróxido de hidrogênio (Reiter, 1998).

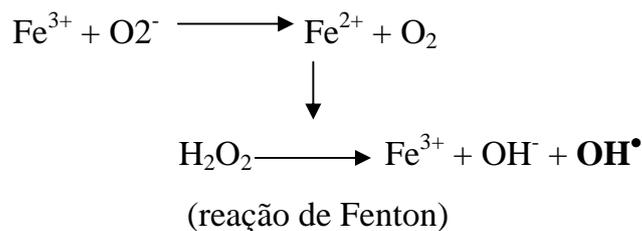
Alguns dos mais destrutivos radicais livres gerados no organismo deriva do oxigênio (O_2). Então, a molécula mais importante para a manutenção da vida pode também provocar danos celulares, podendo levar a destruição de órgãos e do próprio organismo. O acúmulo dos danos ao longo da vida causado por moléculas vitais em órgãos está relacionado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (Reiter, 1998).

O dano causado pelos radicais livres e espécies reativas do oxigênio pode ser chamado de estresse oxidativo. Clinicamente, o estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionado com muitas desordens fisiopatológicas como a hipóxia, a inflamação e a isquemia tecidual e de reperfusão. Outras teorias afirmam que o estresse oxidativo pode estar relacionado com disfunção neurológica associada com doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer e outras (Beyer et al., 1998).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1986). Muitas moléculas biológicas como por exemplo a hemoglobina (Misra e Fridovich, 1972a), mioglobina (Gotoh e Shikama, 1976), catecolaminas (Misra e Fridovich, 1972b) e alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (Turrens et al., 1985) e microsômicos (Jakoby e Ziegler, 1990) reagem com o O_2 convertendo-o em $O_2^{\cdot-}$. Adicionalmente, fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram o $O_2^{\cdot-}$ em grande quantidade, com a finalidade de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Esse mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (Halliwell et al., 1988).

O radical hidroxila (OH^{\cdot}) é a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos; age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de causar alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou a mutação do DNA, inibir diversas proteínas (constituintes das membranas celulares e enzimas) através da oxidação dos seus grupamentos sulfidril (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas (Halliwell e Gutteridge, 1986).

O radical hidroxila é gerado nos sistemas biológicos principalmente por radiações ionizantes e através da reação que envolve um metal de transição, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio. Devido ao alto teor de água das células, sua exposição às radiações ionizantes (raios X e gama), pode resultar na formação do radical hidroxila, através do processo de radiólise da água (Halliwell, 1994). Os íons metálicos (de ferro ou cobre) possuem a habilidade de mover elétrons, o que constitui a base para a iniciação e propagação de muitas das reações de radicais livres mais nocivas. Assim, o OH^{\cdot} é formado pela interação entre um íon metálico (Fe^{3+}), o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , de acordo com a seguinte equação:



O H_2O_2 não é especialmente tóxico, a menos que esteja em altas concentrações nas células, outra característica dessa molécula é que ela possui a capacidade de se difundir rapidamente através das membranas celulares podendo então se distribuir por sítios distantes dos quais ela foi gerada. Além disso na presença de metais de transição, mais comumente o Fe^{2+} , mas também o Cu^{1+} , o H_2O_2 é reduzido à radical hidroxil (OH^\bullet) via reações de Haber-Weiss ou Fenton (Reiter, 1998).

Essa via de produção do OH^\bullet tem sido bastante estudada, embora o seu papel patológico não esteja bem definido, a existência de proteínas de transporte para o ferro e o cobre, utilizadas pelas células para minimizar a presença de íons metálicos livres indicam que tais reações podem ser prejudiciais para os sistemas biológicos (Liochev e Fridovich, 1994).

O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (Eiserich et al., 1998a), embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, em excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o O_2^- podem interagir, resultando em um produto muito tóxico, o peroxinitrito (ONOO^-):



O ONOO^- é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, danificando-as. Além disso,

seus prováveis produtos de decomposição, $\text{OH}\bullet$, dióxido de nitrogênio e outros, possuem semelhante potencial deletério, conseqüentemente, a toxicidade do NO pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o O_2^- . O aumento da produção de ONOO^- tem sido associado a diversos processos patológicos (Demiryurek et al., 1998; Eiserich et al., 1998).

A melatonina pode agir como um doador de elétrons para moléculas deficientes de elétrons, como conseqüência, ela é capaz de detoxificar diretamente radicais altamente reativos (Reiter 1998). A melatonina possui um anel indol aromático rico em elétrons, desse modo reduz e repara radicais eletrofílicos (**Figura 10**). Quando a melatonina é oxidada por um radical livre, forma um radical catiônico indolil com um nitrogênio central. Este radical indolil parece reagir oxidando fracamente o radical ânion superóxido para formar um produto estável e não tóxico, o 5-metoxi-N-acetil-N-formil-cinurenamina. Neste processo, a melatonina consome uma molécula de O_2 e é irreversivelmente oxidada através da clivagem não-enzimática do anel pirrol. Então, a melatonina não parece ser um agente redutor que pode ser reciclado, e portanto, não é como muitos outros compostos redutores.

A melatonina é capaz de inativar o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), este parece ser o mais reativo e tóxico de todos os radicais livres gerados. O produto dessa interação, o radical catiônico indolil, funciona como seqüestrador do O_2^- , que embora não seja muito tóxico, pode rapidamente ser degradado em $\bullet\text{OH}$. Adicionalmente, o O_2^- pode reagir com o óxido nítrico para formar o ânion peroxinitrito (ONOO^-), um produto não-radical com considerável toxicidade. Recentemente, foi demonstrado que o ONOO^- também pode ser inativado pela melatonina (Gilad et al., 1997).

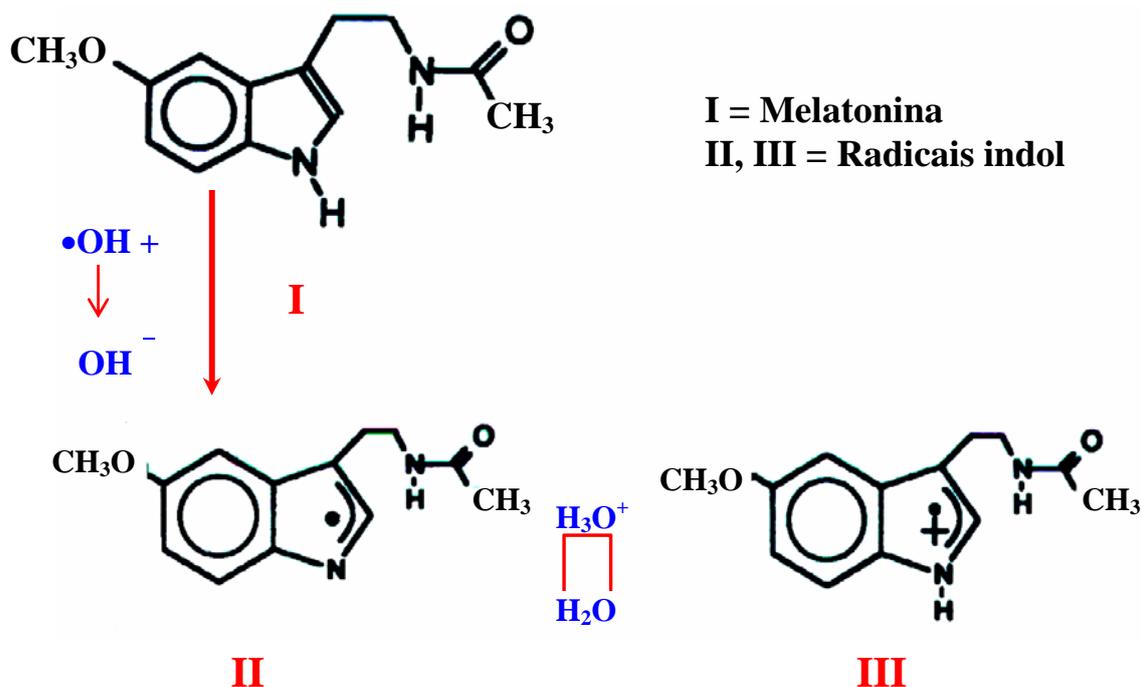


Figura 10: Existem evidências de que a Melatonina (I) pode detoxificar radicais altamente tóxicos através da doação de elétrons, com isso ela se torna um radical indol catiônico, o qual pode existir em mais de uma forma (II e III) (Reiter, 1998).

A eficácia da melatonina como um sequestrador de radicais livres depende do grupo acetil na cadeia lateral e do grupo metoxi na posição 5 do núcleo indol, desde a demonstração da atividade antioxidante da melatonina por Tan et al., (1993), muitos estudos têm verificado que outros produtos da glândula pineal também podem apresentar efeitos antioxidantes (Poeggeler et al., 1996; Pless et al., 1999; Qi et al., 2000). Indolaminas estruturalmente similares também possuem atividade inativadora de $\bullet\text{OH}$, de acordo com Chan e Tang (1996), a N-acetilserotonina (NAS) e a 5-metoxitriptamina exibem alguma inibição da peroxidação lipídica.

A N-acetilserotonina (NAS) é uma indolamina precursora da melatonina no metabolismo do triptofano na glândula pineal, como descrito anteriormente; quimicamente, a NAS difere da melatonina na substituição do grupo hidroxil pelo grupo metoxi na posição 5 do anel indol (**Figura 11**). A diferença dos

efeitos antioxidantes da melatonina e de outras indolaminas pode depender unicamente das estruturas químicas dessas moléculas. Antioxidantes que possuem um grupamento hidroxil reativo na posição 5 do anel indol podem funcionar como doadores de hidrogênio, reduzindo os radicais livres e conseqüentemente diminuindo a peroxidação lipídica in vitro (Barsacchi et al, 1998; Karbownik et al, 2001a).

A NAS possui características semelhantes à melatonina; ambas têm capacidade de atravessar compartimentos celulares, possuem ritmos de diários de controle da sua síntese pela luz, com o pico de produção ocorrendo à noite, (esses ritmos são uma conseqüência do aumento da atividade da serotonina N-acetiltransferase à noite (Pang et al., 1984; Ho et al., 1985; Namboodiri et al., 1985; Míguez et al., 1996; Viswanathan et al., 1998), assim como ocorre com a melatonina, o conteúdo pineal da NAS declina com a idade (Pang et al., 1984; Míguez et al., 1998) e ambas possuem efeitos protetores contra danos induzidos por toxinas em vários órgãos (Bachurin et al., 1999; Lopez-González et al., 2000; Ohta et al., 2000; Montilla et al., 2000; Martín et al., 2000; Calvo et al., 2001).

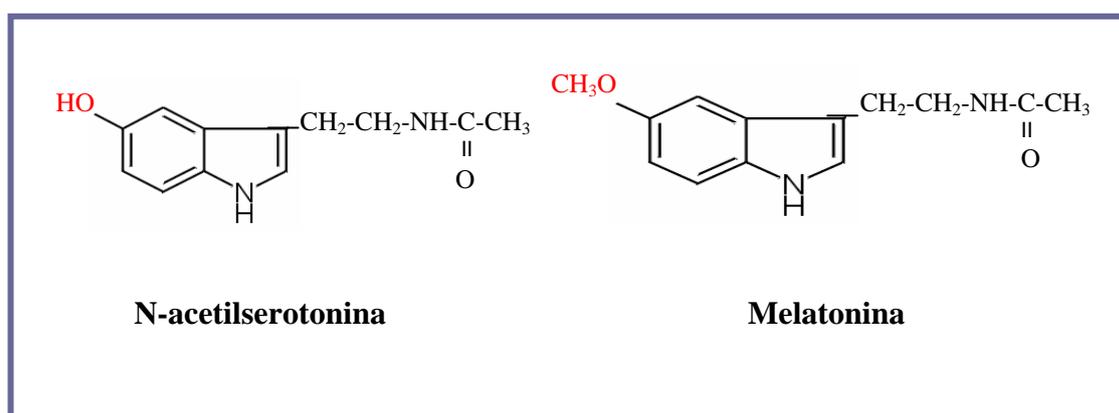


Figura 11: A N-acetilserotonina é uma indolamina precursora da melatonina, sua estrutura química difere da estrutura química da melatonina pela substituição do grupo hidroxil pelo grupo metoxi na posição 5 do anel indol (Garcia et al., 2001).

Estudos recentes indicam que a habilidade antioxidante da melatonina é inferior quando comparada à NAS (Bachurin et al., 1999), e em alguns modelos a NAS exibiu uma forte ação antioxidante, enquanto a melatonina exibiu um efeito próoxidante. De um modo geral, os estudos em relação à especificidade da melatonina comparado com outros indoles, como seqüestrador de radicais livres, estão incompletos.

Um dos processos oxidativos mais amplamente estudados é aquele onde ocorre a quebra dos lipídios das membranas celulares e a formação do radical peroxil (LOO^\bullet). Este processo chamado de peroxidação lipídica é extremamente complexo e lesivo, porque uma vez iniciado, ele pode ser propagado, já que o radical peroxil formado pode reiniciar o processo, que pode ocorrer indefinidamente.

A peroxidação lipídica é usualmente definida como a quebra oxidativa dos lipídios e geralmente se refere a oxidação de ácidos graxos. Como foi descrito anteriormente, a melatonina pode seqüestrar muitas espécies reativas do oxigênio, por exemplo o O_2^- , ONOO^- e o $^\bullet\text{OH}$, que são capazes de desencadear a peroxidação lipídica (Reiter, 1998).

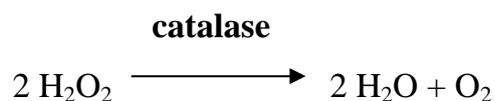
A habilidade da melatonina de detoxificar o LOO^\bullet foi proposta primeiramente por Pieri et al (1994 e 1995). Em seu estudo *in vitro*, a melatonina foi mais eficiente do que a vitamina E, que é amplamente aceita como sendo um agente altamente eficiente na detoxificação do LOO^\bullet . A eficácia da melatonina como um potente inativador do LOO^\bullet tem sido questionada Marshall et al., 1996 mostraram que a atividade da melatonina não é comparável à vitamina E sob condições *in vitro*, embora Scaiano, 1995, tenha mostrado uma atividade próxima à vitamina E. Muitos estudos mostraram que a melatonina é um antioxidante lipídico efetivo, tanto em experimentos *in vitro* (Melchiorri et al., 1995; Severynek et al., 1995) como *in vivo* (Melchiorri et al., 1994; Severynek et al., 1995).

A peroxidação lipídica é um processo no qual o LOO^\bullet está envolvido, assim, a melatonina parece agir como inibidor via alguns mecanismos que nem sempre envolvem a inativação direta do LOO^\bullet . Alguns destes processos podem envolver a capacidade da melatonina de estabilizar membranas celulares (Garcia et al., 1997), uma ação que permite às membranas registrem ao dano oxidativo e às células regularem melhor o seu meio interno.

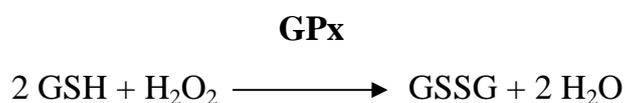
Existem sistemas de defesa endógenos que incluem enzimas e outros antioxidantes que inativam os radicais livres e as espécies reativas do oxigênio (ERO) que são produzidos no organismo. A superóxido dismutase (SOD), enzima presente na mitocôndria e citosol, converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1992):



A catalase, enzima encontrada nos perissomos na maioria dos tecidos, remove o peróxido de hidrogênio catalizando a sua redução em água e oxigênio molecular (Scott et al., 1991):



A glutathiona peroxidase (GPx) é a principal enzima responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio gerado pela SOD no citosol e mitocôndria, ela promove a redução do H_2O_2 , às custas da glutathiona reduzida (GSH), para formar a glutathiona oxidada (GSSG) e água (Gaté et al., 1999):



Outras maneiras pelas quais a melatonina reduz o dano por radicais livres é via alteração da atividade de enzimas que agem direta ou indiretamente reduzindo a geração de radicais livres ou removendo-os do compartimento intracelular. Em níveis fisiológicos e farmacológicos, a melatonina estimula a atividade da mais importante enzima antioxidante, a glutathione peroxidase (GPx) (Pablos et al., 1995; Barlow-Walden et al., 1995; Reiter, 1998), que reduz níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outros hidroperóxidos quando eles são usados como substratos na oxidação do glutathione. Através da estimulação da GPx, a melatonina remove um importante intermediário oxigênio reativo que pode se degradar em $\bullet OH$ altamente tóxico, assim, a eficácia da GPx como uma enzima antioxidante está relacionada com a sua ação indireta de reduzir a produção do $\bullet OH$.

A melatonina também age restaurando o glutathione oxidado de volta à sua forma reduzida através da estimulação da atividade da glutathione reductase (GRd) (**Figura 12**), e da produção do NADPH, um cofator necessário para GRd; a melatonina estimula a síntese do NADPH por estimular a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

Finalmente, a melatonina aumenta os níveis do RNA mensageiro para algumas superóxido dismutases, membros de uma família de enzimas que são importantes na remoção do O_2^- das células convertendo-o em H_2O_2 (**Figura 9**).

Além de estimular as enzimas antioxidantes mencionadas, a melatonina também inibe pelo menos uma enzima potencialmente prooxidativa, a óxido nítrico sintetase (NOS) (Pozo et al., 1994; Bettahi et al., 1996). No cérebro e no hipotálamo, níveis fisiológicos de melatonina foram encontrados com baixa atividade da NOS e portanto, baixa a produção de óxido nítrico. Como já foi mencionado, as espécies de radicais livres podem interagir com o O_2^- para formar o $ONOO^-$ uma espécie não-radical que se degrada no $\bullet OH$. Assim, através

da inibição da NOS, a melatonina reduz efetivamente a geração de radicais que causam danos às moléculas intracelulares.

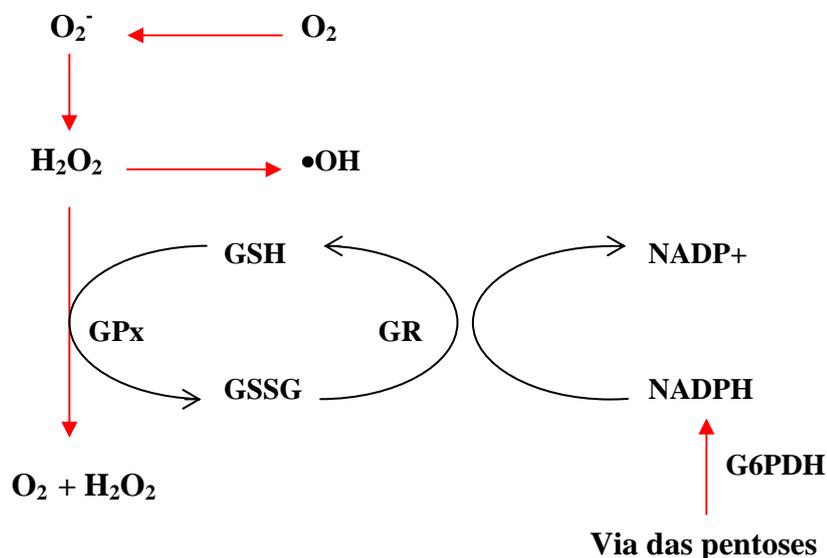


Figura 12: A Glutaciona peroxidase (GPx) remove espécies reativas do oxigênio quando este metaboliza o glutation (GSH) à sua forma oxidada (GSSG). A Glutaciona redutase (GR) reduz o GSSG a GSH, este processo necessita de um co-fator o NADPH. A melatonina estimula a atividade da GPx, GR e da G6PDH contribuindo para o seu efeito como antioxidante (Reiter, 1998).

A habilidade da melatonina em inibir os danos macromoleculares mediados pelos radicais livres tem sido amplamente demonstrada (Reiter et al., 1997; Reiter, 1995; Hardeland et al., 1995). A importância disto é que a melatonina manifesta esta ação em todos os compartimentos subcelulares, sugerindo que a melatonina pode ter igual acesso a cada um deles, certamente por causa da sua lipossolubilidade (Costa et al., 1995) já bem documentada, embora evidências recentes indiquem que ela também é um pouco hidrofílica (Shida et al., 1994). Essas descobertas são consistentes com observações que mostram que quando perifericamente administrada a melatonina tem fácil acesso às células e parece estar especialmente concentrada no núcleo (Menendez-Pelaez et al., 1933). Por causa da sua ampla distribuição nos compartimentos celulares, da sua

capacidade de cruzar facilmente as barreiras morfofisiológicas, como a barreira hematoencefálica, a melatonina possui uma grande importância como antioxidante.

As evidências sobre as altas concentrações intracelulares da melatonina são consistentes com a sua capacidade de proteger o DNA do dano oxidativo. Muitos agentes carcinogênicos causam dano oxidativo ao DNA porque geram radicais livres tóxicos. Tan et al., 1993 foram os primeiros a testarem a melatonina em um modelo com o carcinógeno safrol. Eles observaram que a melatonina reduziu significativamente o dano ao DNA hepático. Da mesma forma, o dano ao DNA neural, resultante da administração do agente excitotóxico cainato, foi também reduzido na presença da melatonina injetada exogenamente (Uz et al., 1996; Manev et al., 1996). O ácido caínico, assim como o safrol, causam dano celular via geração de radicais livres. Nesses estudos, a melatonina também preveniu a apoptose, reduziu a morte neuronal e modificou as características epiléticas associadas ao ácido caínico.

A radiação ionizante é um conhecido agente carcinogênico porque causa cisão homolítica das moléculas, formando radicais livres. Vijayalaxmi et al., 1995, usando uma variedade de procedimentos citogenéticos, verificaram que o alto nível de destruição cromossomal visto em linfócitos humanos expostos a radiação γ , foi reduzido, de maneira dose-dependente, com o aumento das doses de melatonina adicionada a cultura, além disso, a melatonina se mostrou mais eficaz nesse modelo quando comparada com dimetilsulfóxido, um conhecido agente radioprotetor.

O efeito protetor da melatonina contra danos no cromossomo também foi observado em linfócitos de sangue humano de pacientes que haviam ingerido 300 mg de melatonina (Vijayalaxmi et al., 1996). Este efeito só ocorre se a melatonina for administrada antes da exposição.

Foi demonstrado que a melatonina é capaz de inativar radicais que desencadeiam a peroxidação lipídica (Reiter, 1996 e Reiter et al., 1997) e pode também detoxificar o LOO^\bullet que propaga o processo (Scianno, 1995; Pieri et al., 1995; Pierrefiche et al., 1995). Estudos têm mostrado que a melatonina pode agir como antídoto para a peroxidação lipídica mesmo quando utilizados vários tipos de agentes diferentes para induzir ao dano por radicais livres, tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo* (Reiter, 1997; Pieri et al., 1995; Reiter et al., 1995).

O paraquat é um herbicida altamente tóxico utilizado experimentalmente para investigar o processo de peroxidação lipídica no pulmão. Melchiorri et al., 1994 administraram paraquat em ratos, sozinho ou em associação com a melatonina para testar se a mesma poderia neutralizar o dano aos lipídios de membrana causado pelo herbicida. Nesse modelo a melatonina provou ser altamente efetiva, diminuindo os níveis dos produtos da peroxidação lipídica (malonilaldeído (MDA) + 4-hidroxiálquil (4-HDA) a níveis próximos dos controles.

Em um grande número de experimentos, foi observado que a melatonina é capaz de inibir o dano oxidativo causado por agentes altamente tóxicos. Em animais tratados com lipopolissacarídeo bacteriano (Sewerynek et al., 1995), tetracloreto de carbono (Daniels et al., 1995), cianeto de potássio (Yamamoto e Tang, 1996), cainato (Melchiorri et al., 1995), reagentes de Fenton ($\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) (Barlow-walden et al., 1995) e L-cisteína (Yamamoto e Tang, 1996), a melatonina apresentou eficácia na redução do dano oxidativo às membranas lipídicas. Além disso, os danos causados pela isquemia de reperfusão (Sewerynek et al., 1996), ingestão de álcool (Melchiorri et al., 1997), exercício excessivo (Hara et al., 1996), proteína β -amilóide (Pappolla et al., 1997), 6-OHDA (6-hidroxiopamina), MPTP (1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino) (Acuna-castroviejo et al., 1997; Reiter, 1998) também são neutralizados pela melatonina.

Embora os mecanismos de destruição destes agentes tóxicos e os processos pelos quais eles ocorrem sejam bastante complexos, um denominador comum entre eles é que todos levam a um aumento na produção dos radicais livres e, considerando a eficácia da melatonina na proteção dos tecidos contra processos oxidativos, parece que o indol age por mais de um mecanismo, não apenas como sequestrador de radicais livres, para proteger os lipídios das lesões.

1.5- EFEITOS DA MELATONINA

A melatonina é considerada um transdutor neuroendócrino da informação fotoperiódica ambiental, dessa forma, ela tem como ação principal temporizar ou sincronizar diferentes funções do organismo, apresentando uma ação moduladora interferindo no sistema endócrino, nervoso e imunológico.

1.5.1- REGULAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO

Os ritmos circadianos são provavelmente a adaptação mais comum dos organismos vivos. Esses ritmos são observados das bactérias aos seres humanos. Nos mamíferos, o ritmo circadiano afeta uma série de funções comportamentais e fisiológicas como variações no desempenho psicomotor e na percepção sensorial, secreção de hormônios e regulação da temperatura corporal.

O ritmo circadiano está normalmente relacionado com o ciclo solar claro-escuro, e é determinado geneticamente, como adaptações geradas endogenamente, portanto mesmo na ausência do ciclo o ritmo persiste.

A geração do ritmo circadiano é uma função regulatória do sistema nervoso, mediada por um sistema circadiano composto por uma série de estruturas neurais específicas que estabelecem a organização temporal dos processos fisiológicos e comportamentais dentro de padrões precisos.

O sistema circadiano é composto basicamente por três componentes: (1) fotoreceptores da retina que funcionam como transdutores da informação fótica (trato retino-hipotalâmico); (2) marcapassos que geram o sinal circadiano, “relógios circadianos” (núcleo supraquiasmático) e (3) vias de propagação que acoplam o marcapasso aos sistemas efetores (glândula pineal e melatonina).

O ritmo circadiano é uma adaptação do ciclo dia e noite, claro e escuro, ou seja, baseia-se nas informações fotoperiódicas. Essas informações sobre a iluminação ambiental são feitas através de um circuito neural que se inicia na retina, partir do trato retino-hipotalâmico que por sua vez comunica-se com os núcleos supraquiasmáticos conectando-se por fim com a coluna intermediolateral da medula espinhal. A partir desta, a informação fótica chega até a glândula pineal, via inervação simpática, que sintetiza e libera a melatonina; esta funciona como um transdutor neuroendócrino, transformando as informações fotoperiódicas em um sinal que vai conferir ritmicidade para várias funções do organismo.

As principais características do sistema gerador de melatonina são a sua variação diurna e a sua grande sensibilidade à luz, a qual suprime a sua atividade. Foi observado que, não importando se o animal for ativo durante o dia ou à noite, a atividade da N-acetiltransferase (NAT) e os níveis de melatonina são sempre altos à noite ou durante a fase escura de um ciclo de iluminação claro-escuro controlado (Reiter, 1991; Zawilska e Nowak, 1999). O padrão de aumento noturno da produção da melatonina depende, além de outros fatores, das espécies e do tecido.

Nos mamíferos existem três padrões básicos de produção noturna da pineal (Reiter, 1987), o tipo mais comum é caracterizado por um pico de melatonina por volta da meia-noite. Em animais com esse padrão (por exemplo: a galinha, o rato, a cobaia), e em humanos, os níveis do hormônio aumentam gradualmente (iniciando logo que as luzes se apagam), alcançando picos por

volta da meia-noite e, então, declinando paulatinamente durante a segunda metade da noite chegando a níveis baixos diurnos. Nos seres humanos, os níveis plasmáticos mais altos de melatonina são encontrados entre 2 e 3h da manhã. A duração da síntese ou do conteúdo elevado de melatonina está diretamente correlacionada com a duração da noite, sendo inibida com a exposição à luz.

O principal relógio circadiano em todos os vertebrados está localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo e estes possuem alta densidade de receptores para a melatonina. A principal atuação da melatonina sobre os órgãos alvos depende da hora do dia, nos NSQ, onde a melatonina é capaz de sincronizar os disparos do relógio. Foi demonstrado *in vitro* que a frequência de disparos do NSQ é reduzida pela melatonina e que a maior sensibilidade a este hormônio é observada 3 horas antes e 3 horas após o início do escuro (Stehele et al., 1989).

A melatonina é capaz de ajustar ritmos circadianos de animais de laboratório mantido em livre curso e de indivíduos cegos que não tem percepção da luz. A capacidade da melatonina em ajustar ritmos em livre curso, depende dos NSQ e da hora de administração, portanto, tanto em tecido isolado quanto em animais foi demonstrado que a melatonina atua diretamente sobre os NSQ, esta ação é a base de uma das aplicações clínicas da melatonina, que é o ajuste do ritmo circadiano em viagens transmeridionais (jet lag) e em indivíduos cegos.

1.5.2- SISTEMA ENDÓCRINO

Os primeiros estudos dos efeitos da melatonina enfocavam a sua ação como transdutor da informação fotoperiódica para a reprodução animal. Modificações, particularmente na duração da produção noturna da melatonina, representam o sinal através do qual ela influencia a reprodução em animais com procriação sazonal (Cagnacci e Volpe, 1996). Em algumas espécies a melatonina, além do seu papel na reprodução, também exerce efeito no início da puberdade;

assim, pinealectomia em ratos e hamsters adianta o início da puberdade, enquanto a administração de melatonina retarda. Além disso, a administração de melatonina à ratas prenhas retarda a maturação de filhotes fêmeas.

A ação da melatonina sobre a reprodução tem sido confirmada (Cagnacci e Volpe, 1996), no entanto, não é possível generalizar a sua ação como hormônio pró- ou antigonadotrófico, pois esta ação depende da espécie animal e da hora de administração. A melatonina serve de pista temporal para o organismo de tal forma que a função reprodutora seja ajustada às variações sazonais, assim sendo, a melatonina traduz informações temporais para o eixo hipotalâmico-hipófise-gônadas, coordenando sinais de reprodução.

Receptores para a melatonina foram localizados na eminência média e *pars tuberalis* da hipófise de diferentes espécies de animais. A estimulação destes receptores leva a uma diminuição ou aumento da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), dependendo da espécie. Em hamsters, a melatonina atua como agente anti-gonadotrófico, reduzindo a concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), testosterona e prolactina; em ovinos, a melatonina reduz a amplitude e frequência da liberação pulsátil do LH, principalmente controlando a liberação do hormônio liberador do LH.

Embora já tenha sido demonstrado em células cultivadas da adenohipófise de animais neonatos que a melatonina pode regular negativamente a liberação do hormônio luteinizante induzida por GnRH, esta ação não foi demonstrada em adultos, portanto a atuação da melatonina diretamente em células da adenohipófise é controversa, sendo bem estabelecida apenas sua ação sobre o hipotálamo. Embora a reprodução humana não seja exatamente considerada sazonal, existe uma sazonalidade na concepção que é evidente (Roennenberg e Aschoff 1990, a e b; Cagnacci e Volpe 1996; Cagnacci, 1996), e esta parece ser influenciada por fatores ambientais, como o fotoperíodo e a temperatura.

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos exercidos pela melatonina no eixo reprodutivo das mulheres. Na fase folicular do ciclo menstrual normal, a secreção de gonadotropina, particularmente a amplitude do pulso secretório do LH, aumenta à noite (Filicori et al., 1986, Rossmanith e Yen, 1987) quando a melatonina é normalmente secretada, nessa fase do ciclo menstrual a administração de melatonina durante o dia aumenta a amplitude dos pulsos espontâneos do LH, e as respostas a ambos o LH e o FSH ao estímulo do GnRH (Cagnacci et al 1991). A relevância desses estudos na reprodução humana ainda não está estabelecida.

O efeito da melatonina em outros hormônios que podem influenciar o processo reprodutivo, como a prolactina, o hormônio do crescimento ou os hormônios tiroideanos, ainda não é bem conhecido. A melatonina pode aumentar a taxa noturna de prolactina (Waldhauser et al., 1987, Okatani e Sagara 1993, Cagnacci, 1996) e provavelmente a de TSH, sem modificar os níveis circulantes dos hormônios tiroideanos (Melis et al., 1995) O efeito da melatonina no hormônio do crescimento ainda não foi investigado em mulheres, embora nos homens ela possa estimular (Valcavi et al., 1993) ou não exercer nenhum efeito (Waldhauser et al., 1987) na secreção do hormônio do crescimento. Ainda não foi estabelecido se essas modificações desempenham algum papel no processo ovulatório e na função testicular.

1.5.3- SISTEMA IMUNOLÓGICO

A ação da melatonina sobre o sistema imunológico e as células imunocompetentes tem ganho importância à partir da década de 80, mas, antes disso já haviam vários relatos controversos sobre os efeitos da pinealectomia na resposta imunológica. Um dos primeiros relatos foi descrito em 1965 por Csaba et al mostrando uma desorganização do timo após pinealectomia em ratos neonatos. Porém, vários relatos de efeitos da melatonina em diferentes respostas

imunológicas somente foram confirmados quando caracterizados sítios de ligação para a melatonina em células do sistema imunológico.

Em 1993, Lopez-Gonzales et al descreveram um sítio de ligação de alta afinidade em linfócitos extraídos de sangue humano, e um de baixa afinidade em granulócitos humanos. Os sítios de ligação para a melatonina são mais abundantes em linfócitos CD4+ do que CD8+, sugerindo que os linfócitos CD4+ são as células mais responsivas à melatonina na subpopulação linfocitária, estas células possuem sítios de ligação para a melatonina que atuam via AMPc ou GMPc (Guerreiro et al., 1994). Nos linfócitos CD4+, a melatonina estimula a produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon γ (IFN γ), por outro lado, a administração de IL-2 inibe a produção de melatonina pela glândula pineal (Fraschini et al., 1998), indicando um sistema de retroalimentação negativo.

A ação da melatonina sobre o sistema imunológico é fortemente dependente do horário de administração, reforçando o conceito que este hormônio é um sincronizador temporal do organismo e sugerindo que o sistema imunológico pode responder diferentemente dependendo da hora do dia. A administração de melatonina no final da tarde tem ação imunoestimulante, aumentando a produção de anticorpos em camundongos estimulados com hemáceas de carneiros e a ação citotóxica de linfócitos T. No entanto, a administração da dose equivalente no período da manhã não promove alteração da resposta imune, enquanto doses 20 vezes maiores parecem agir como imunossupressor (Maestroni et al., 1987, Giordano et al., 1993).

Estudos recentes sugerem que a melatonina também é um hormônio modulador de processos inflamatórios crônicos. Em inflamação crônica induzida por agente infeccioso ou não, observa-se uma variação rítmica, esta variação é abolida por pinealectomia e restaurada por administração noturna de melatonina. Nestes estudos foram testadas apenas doses farmacológicas. O mecanismo subjacente a esta variação da lesão inflamatória crônica é a variação da

permeabilidade vascular, que é maior no período diurno em relação ao período noturno, estando em sincronia com a variação do edema (Petrovsky e Harrison, 1998; Lopes et al., 1997).

Os dados apresentados acima deixam evidente que a melatonina atua como um modulador da resposta inflamatória e imunológica. Os locais de atuação e mecanismos de ação da melatonina ainda estão em estudo.

Os efeitos da melatonina sobre o desenvolvimento e tratamento de câncer foram investigados e há relatos na literatura mostrando que este hormônio tem ação antiproliferativa e imunoestimuladora, quando utilizado em doses farmacológicas (acima de nM). Porém esta ação não é universal, sendo caracterizada principalmente em tumor de mama humano responsivo a estrógeno.

No entanto, melatonina tem sido testada como coadjuvante em tratamento quimioterápico associada com IL-2. Esta associação diminuiu a toxicidade de IL-2, bem como a dose de IL-2 no tratamento. Esses efeitos são atribuídos à ação antioxidante da melatonina e à capacidade de induzir a expressão do receptor de IL-2, aumentando a sensibilidade das células (Lissoni et al., 1997).

1.5.4- SISTEMA NERVOSO

A melatonina atua tanto sobre o sistema nervoso central quanto sobre o sistema nervoso periférico. Várias estruturas do sistema nervoso central de mamíferos possuem receptores para a melatonina, como por exemplo a ponte, o hipotálamo, o cerebelo e o hipocampo.

A ação mais evidente da melatonina no sistema nervoso central ocorre sobre os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo, isto é, sobre o "relógio biológico endógeno". Como já foi descrito anteriormente, esta ação tem importância fisiológica, inclusive no homem, e participa da organização temporal

do organismo. Outra ação muito estudada refere-se à sua modulação neuroendócrina que envolve o eixo hipotálamo-hipófise.

Além dos seus efeitos sobre o ritmo circadiano, vários autores tem mostrado que a melatonina exógena é capaz de induzir sono, e portanto, exercer um efeito hipnótico em mamíferos. A melatonina é capaz de reduzir a atividade locomotora e potencializar o sono induzido por barbitúricos em camundongos. Enquanto o primeiro efeito é inibido por antagonistas benzodiazepínicos enquanto o segundo não o é (Sugden, 1995; Markus e Lopes, 1998).

Uma provável interação entre a melatonina e o sistema GABAérgico vem sendo proposta desde 1974 quando foi descrita uma redução dos níveis de GABA em animais pinealectomizados e um aumento destes níveis após administração de melatonina (Antón-Tay, 1974). A melatonina também interfere no número de sítios de ligação para este neurotransmissor. Os sítios de ligação para GABA no sistema nervoso central apresentam um ritmo circadiano. Em ratos a menor densidade de sítios de ligação para GABA ocorre no período noturno, este ritmo é abolido por pinealectomia e restaurado com concentrações fisiológicas de melatonina (Acuña-Castroviejo et al., 1995).

A melatonina também atua no sistema glutamatérgico. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, atua via receptores ionotrópicos e metabotrópicos. A estimulação de receptores ionotrópicos leva a um aumento importante da entrada de íons cálcio e desencadeia reações neurotóxicas. Essas reações são devidas à formação de espécies reativas do oxigênio. A melatonina, em concentrações micromolares, é capaz de proteger culturas primárias de neurônios contra a excitotoxicidade de agonistas glutamatérgicos e a peroxidação lipídica de sinaptossomas isolados (Giusti et al., 1996). A atividade elétrica de neurônios do corpo estriado induzida por estimulação do córtex cerebral (Escames et al., 1994), e a liberação de dopamina

desta estrutura (Acuña-Castroviejo et al., 1995) é bloqueada de forma dose-dependente por melatonina.

1.6- MELATONINA E DOENÇA DE PARKINSON

Em 1958, Arvid Carlsson identificou a dopamina como um neurotransmissor independente. Cinco anos depois, foi descoberto que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos era a base etiológica da doença de Parkinson (Grace, 1993).

- Sistema Dopaminérgico:

A dopamina está presente na maioria das regiões do SNC, originando-se de longos axônios que partem da substância negra e área tegmentar ventral e inervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (Conn, 1994).

Neurônios dopaminérgicos sintetizam DA a partir de um aminoácido encontrado na dieta, a tirosina. A tirosina é transportada para dentro do neurônio dopaminérgico onde posteriormente sofre ação enzimática (Cooper et al., 1991). As enzimas que catalizam esta síntese são produzidas e estocadas no corpo celular dos neurônios. A tirosina hidroxilase (TH) é a primeira enzima atuante na síntese de DA. Essa enzima é inibida pelo produto final da via de biossíntese, a DA, constituindo o mecanismo de regulação contínua da velocidade de síntese (etapa limitante). É encontrada no citoplasma e cataliza a conversão da tirosina para o aminoácido L-Dopa (1-3,4-diidroxifenilalanina) que sofre a ação rápida de outra enzima a dopa descarboxilase produzindo a DA (Rang et al., 2001).

Após ser sintetizada, a DA é estocada em neurônios dopaminérgicos dentro de grânulos secretórios, para ser posteriormente liberada do terminal nervoso, durante um potencial de ação, através de processo cálcio-dependente.

Quando liberada na fenda sináptica, ela pode combinar-se com receptores pré-sinápticos e modular a sua própria liberação, através de um mecanismo de feedback-negativo. Ainda na fenda sináptica, a DA pode sofrer um processo de recaptação, através de sua ligação com uma proteína acoplada à membrana pré-sináptica, ou pode ligar-se aos seus receptores pós-sinápticos (Conn, 1994).

A dopamina exerce seus efeitos biológicos através de interação com receptores específicos. Em 1979, Keabian & Calne mostraram que a dopamina exercia seus efeitos através de sua ligação com dois receptores específicos, chamados D1 e D2, os quais apresentavam diferenças farmacológicas e biológicas, bem como distribuição anatômica diferente.

As diferenças farmacológicas baseavam-se no fato de que enquanto o receptor D1 se ligava a uma benzazepina, o antagonista seletivo SCH 23390, o receptor D2 se ligava com alta afinidade a butirofenonas, como espiroperidol e haloperidol. Estes dois receptores também exerciam seus efeitos através de ações biológicas diferentes, acoplando-se e ativando diferentes complexos de proteínas G. O receptor D1 interagia com o complexo Gs para ativar a adenililciclase, aumentando a formação de AMPc, enquanto o receptor D2 interagia com a proteína G inibitória (Gi), inibindo a adenililciclase consequentemente inibindo a produção de AMPc. Estes dois receptores apresentam uma alta distribuição anatômica no SNC, mas diferem proporcionalmente em áreas cerebrais específicas. Entretanto, com relação às desordens mentais, estes receptores estão presentes nas vias nigroestriatal e mesocorticolímbica (Rang et al., 2001).

A degradação metabólica da DA é feita no SNC principalmente por duas enzimas: a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT). A MAO existe em duas formas moleculares semelhantes, codificadas por genes separados (MAO- tipo A e tipo B). A MAO-A possui preferência de substrato para a serotonina. A MAO-B possui preferência de substrato para a feniletilamina. Ambas as isoformas atuam sobre a dopamina. Assim, a

degradação da dopamina é feita pela MAO que converte a DA em DOPAC (ácido 3,4 dihidroxifenilacético) a nível neuronal e pela COMT (catecol-O-metil transferase) que converte DA em HVA (ácido homovanílico) dentro do terminal sináptico (Rang et al., 2001). O HVA é o principal produto do metabolismo da DA nos seres humanos, enquanto DOPAC é o principal em roedores (Cooper et al., 1991).

- Doença de Parkinson

Muitos radicais livres são produzidos em todas as células do organismo como consequência do metabolismo do oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1992). Os danos moleculares mediados pelos radicais do oxigênio tem sido observados em um grande número de doenças e acredita-se que contribua para a perda neuronal e para as demências relacionadas com a idade.

O cérebro, embora não seja o único órgão que está exposto aos radicais livres, consome grandes quantidades de oxigênio, e possui poucos mecanismos de defesa oxidativos, tornando-o muito suscetível à espécies reativas do oxigênio. Existem muitas evidências de que os danos causados pelos radicais livres sejam particularmente prevalentes no cérebro e que funcionam como um importante fator em um grande número de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade, incluindo a doença de Parkinson (Reiter et al., 1999) **(Figura 13)**.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada por uma degeneração gradual do sistema dopaminérgico nigrostriatal, que resulta em uma redução do conteúdo de dopamina das fibras do estriado. Esta patologia é acompanhada por uma variedade de comportamentos sensoriais e motores, incluindo, tremor, rigidez e acinesia, e, embora outros sistemas neuronais possam estar envolvidos, a principal característica do parkinsonismo é a perda dos neurônios dopaminérgicos (Reiter et al., 1999, Kim

et al., 1998) (**Figura 14**). A etiologia da doença de Parkinson ainda permanece obscura, mas sabe-se que existe uma excessiva geração de radicais livres através do estresse oxidativo, a qual é a hipótese que tem recebido maior suporte experimental (Olanow, 1990; Fahn e Cohen, 1992; Skaper et al., 1999).

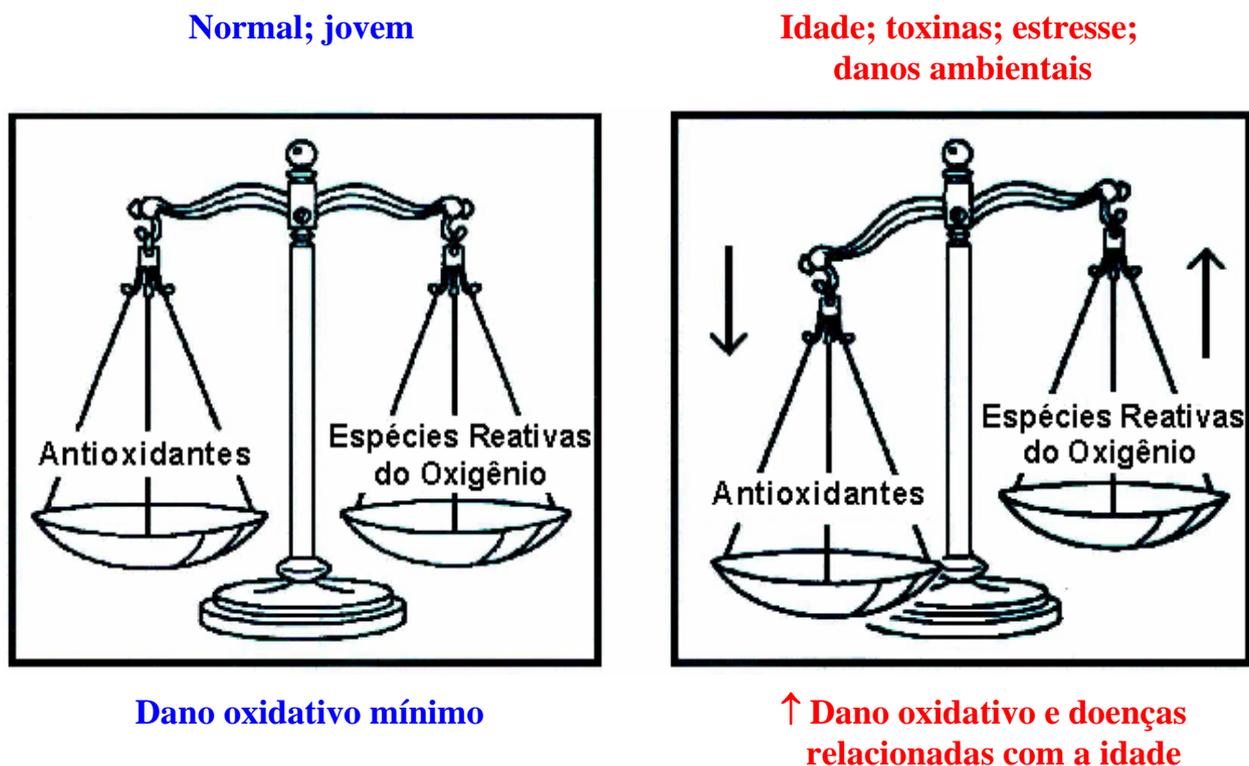


Figura 13: Diagrama representativo do papel potencial dos radicais livres no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade. Quando os organismos são jovens, a geração de radicais livres é controlada por uma série de antioxidantes, com o avanço da idade e a exposição à toxinas, ao estresse e aos danos ambientais ocorre um aumento da geração de radicais livres que torna ineficiente o sistema de defesa antioxidante, desequilibrando o processo de inativação dos radicais livres, que se acumulam acelerando o envelhecimento e promovendo o aparecimento de doenças relacionadas com a idade (Reiter et al., 1999a).

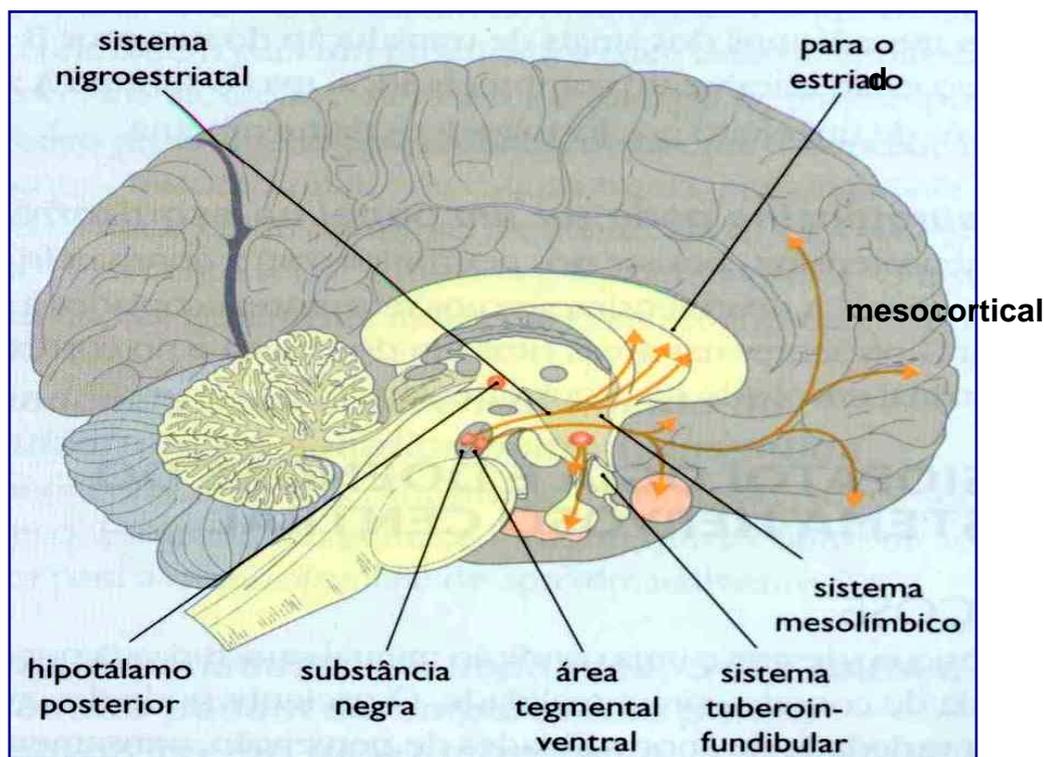


Figura 14: Distribuição das vias dopaminérgicas no SNC (Page et al., 1999).

Uma degeneração similar dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pode ser produzida em um modelo animal da doença de Parkinson criado pela injeção estereotáxica unilateral da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Ichitani et al., 1991, Przedborski et al., 1995). Nesse modelo ocorre uma destruição imediata e quase completa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em uma depleção dos níveis de dopamina no estriado ipsilateral a injeção.

Existem evidências que tanto os níveis de dopamina como os de serotonina e dos seus metabólitos estão todos diminuídos em fluido cérebro espinhal de pacientes portadores da Doença de Parkinson (Reiter, 1998).

As mudanças unilaterais na via nigroestriatal causadas pela injeção de 6-OHDA levam a uma assimetria funcional a qual é quantificada utilizando-se um teste rotacional induzido por agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) ou indiretos (anfetamina) (Przedborski et al., 1995).

A apomorfina é um agonista dopaminérgico que estimula diretamente os receptores D1 e D2, e de acordo com o modelo de teste comportamental rotacional, os animais lesionados com 6-OHDA e tratados com apomorfina giram em torno do próprio eixo em direção ao lado contralateral (não lesionado). Labandeira-Garcia et al., (1996) verificaram que existe uma perda marcante e progressiva dos terminais dopaminérgicos em apenas alguns dias após a lesão intraestriatal com 6-OHDA, que começa a ficar estável em cerca de duas semanas e permanece estável por até doze semanas.

Esse modelo é útil na monitorização dos efeitos de diferentes tratamentos, e a relevância do período de tempo para a aplicação do tratamento pode depender da estratégia, portanto, tratamentos preventivos ou protetores devem ser realizados pouco antes da lesão ou um pouco depois, quando a perda neuronal está acontecendo (Przedborski et al., 1995).

O estresse oxidativo mediado pela neurotoxina 6-OHDA desempenha um importante papel na degeneração do sistema dopaminérgico nigroestriatal (Gotz et al., 1990; Ichitany et al., 1991), o que propicia o uso de antioxidantes com efeitos protetores na prevenção da neurotoxicidade da 6-OHDA.

Como já foi mencionado anteriormente, estudos recentes verificaram que a melatonina possui propriedades antioxidantes e também pode agir como "sequestrador" de radicais livres (Joo et al., 1998). Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a melatonina pode proteger células, tecidos e órgãos contra os danos oxidativos induzidos por uma grande variedade de processos e agentes geradores de radicais livres (Floreani et al., 1997; Giusti et al., 1996;

Reiter et al., 1997; Kim et al., 1998). O mecanismo desta atividade parece estar relacionado com o "sequestro" direto de radicais livres e/ou o aumento do RNAm (Antolin et al., 1996; Kotler et al., 1998) e da atividade de muitas enzimas antioxidantes (Reiter et al., 1997).

2- OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que na doença de Parkinson ocorre perda dos neurônios dopaminérgicos, possivelmente devido a excessiva geração de radicais livres, e que a melatonina possui atividade neuroprotetora por inativar esses radicais, o objetivo deste trabalho foi estudar as possíveis propriedades neuroprotetoras da melatonina, utilizando um modelo experimental de doença de Parkinson produzido pela injeção estereotáxica de 6-OHDA em corpo estriado de rato.

2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos da melatonina, no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos, após lesão estriatal por injeção estereotáxica de 6-OHDA.
- Determinar os efeitos agudos da melatonina, em diferentes doses, sobre as concentrações de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de ratos submetidos a injeção estereotáxica de 6-OHDA.
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com melatonina sobre as concentrações de monoaminas e seus metabólitos e no comportamento rotacional de ratos submetidos a injeção estereotáxica de 6-OHDA.
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com melatonina sobre as concentrações de monoaminas e seus metabólitos e no comportamento rotacional de ratos submetidos a injeção estereotáxica de 6-OHDA.

- Determinar a densidade de receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos submetidos a injeção estereotáxica de 6-OHDA, após tratamento com melatonina.
- Verificar os efeitos do precursor da melatonina, a N-acetil-serotonina (NAS) no comportamento rotacional induzido por apomorfina e na densidade de receptores dopaminérgicos (D1 e D2-símile) em corpo estriado de ratos submetidos à injeção estereotáxica de 6-OHDA.
- Determinar o efeito da melatonina nos níveis de malonildialdeído (MDA) em ratos submetidos à injeção estereotáxica de 6-OHDA, para avaliar os possíveis efeitos antioxidantes da melatonina.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizadas ratos Wistar, machos, com peso variando entre 200 - 250 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão tipo purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório estipulados do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

3.2 - Drogas

3.2.1- Melatonina

A melatonina (Sigma Chemical Co. USA) foi dissolvida em Tween 80% (8%) e administrada nas doses de 2, 5, 10, e 25 mg/kg, i.p., geralmente por volta das 16h, 1 hora após a lesão com 6-OHDA e depois, diariamente durante 7 ou 14 dias.

3.2.2- 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) obtida da Sigma Chemical Co. USA, foi dissolvida em salina 0,9%, contendo 0,2% de ácido ascórbico (para evitar a oxidação espontânea da 6-OHDA), perfazendo uma solução na concentração final de 12 µg/µl.

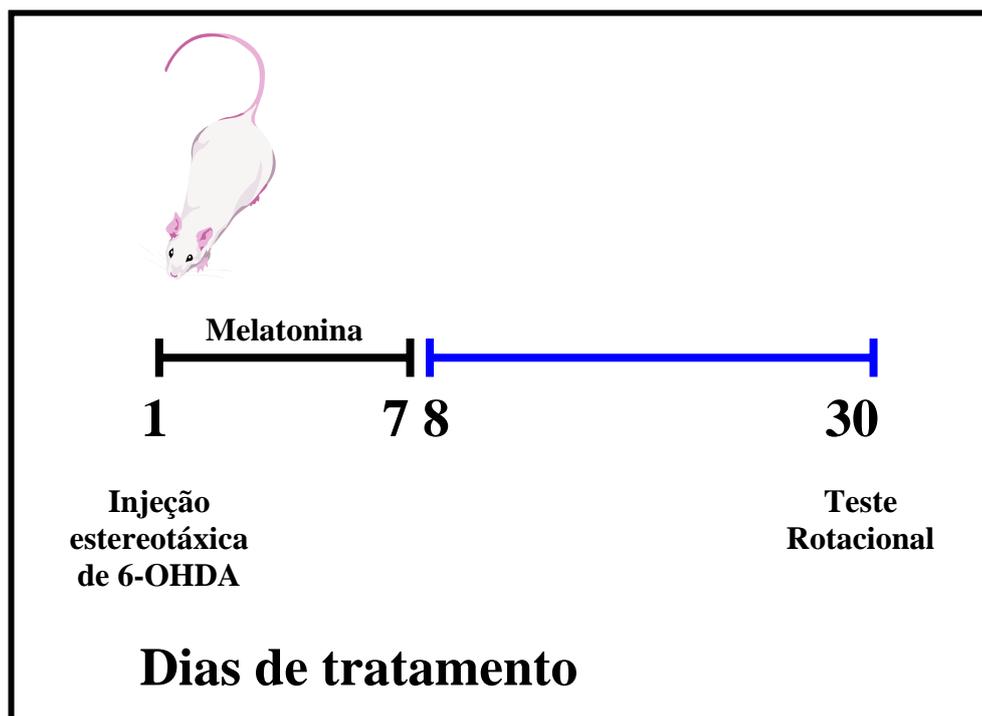
3.2.3- Apomorfina

A apomorfina (Sigma Chemical Co. USA) foi dissolvida em salina 0,9%, e a dose utilizada foi de 3 mg/kg, i.p.

3.3 – Tratamento dos grupos experimentais

- Protocolo 1

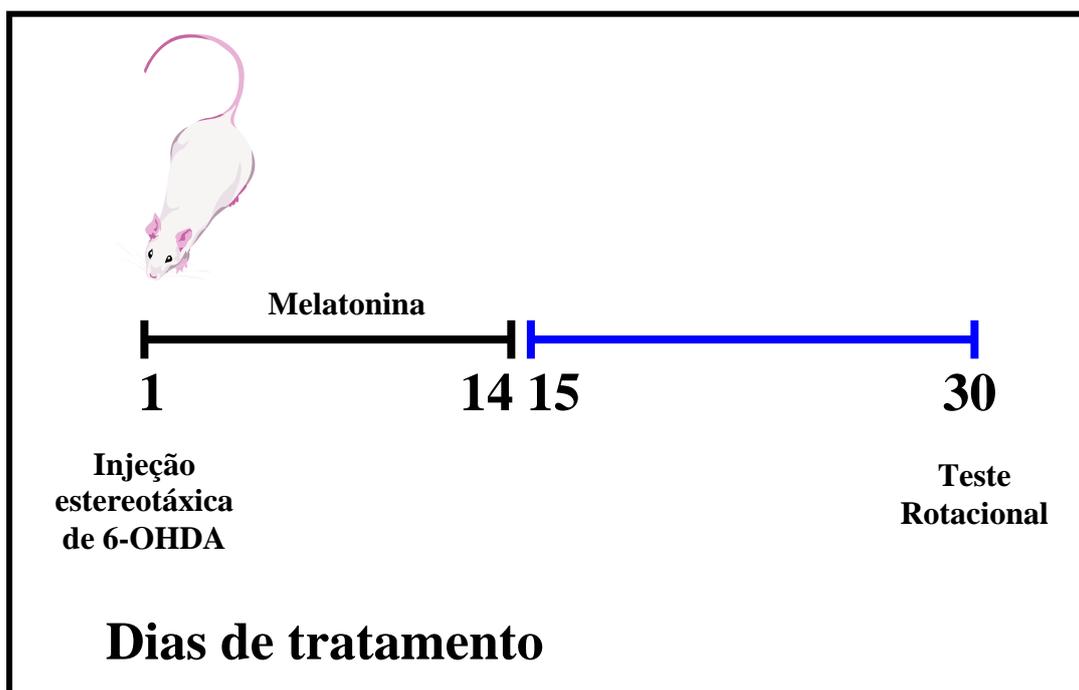
Os animais foram submetidos a lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA e tratados com melatonina nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p., por 7 dias, sendo o primeiro dia considerado como o dia da cirurgia e o tratamento iniciado 1 hora após a lesão, três semanas depois os animais foram tratados com apomorfina para a realização do teste rotacional e 24 horas depois do teste foram sacrificados para a realização dos testes.



Esquema 1: Tratamento da melatonina durante 7 dias após a lesão (protocolo 1).

- **Protocolo 2**

Tratamento crônico. Os animais foram submetidos a lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA e tratados com melatonina na dose de 5 mg/kg, i.p., durante 14 dias, sendo o primeiro dia considerado como o dia da cirurgia e o tratamento iniciado 1 hora após a lesão, duas semanas depois os animais foram tratados com apomorfina para a realização do teste rotacional e 24 horas depois foram sacrificados para a realização das análises.

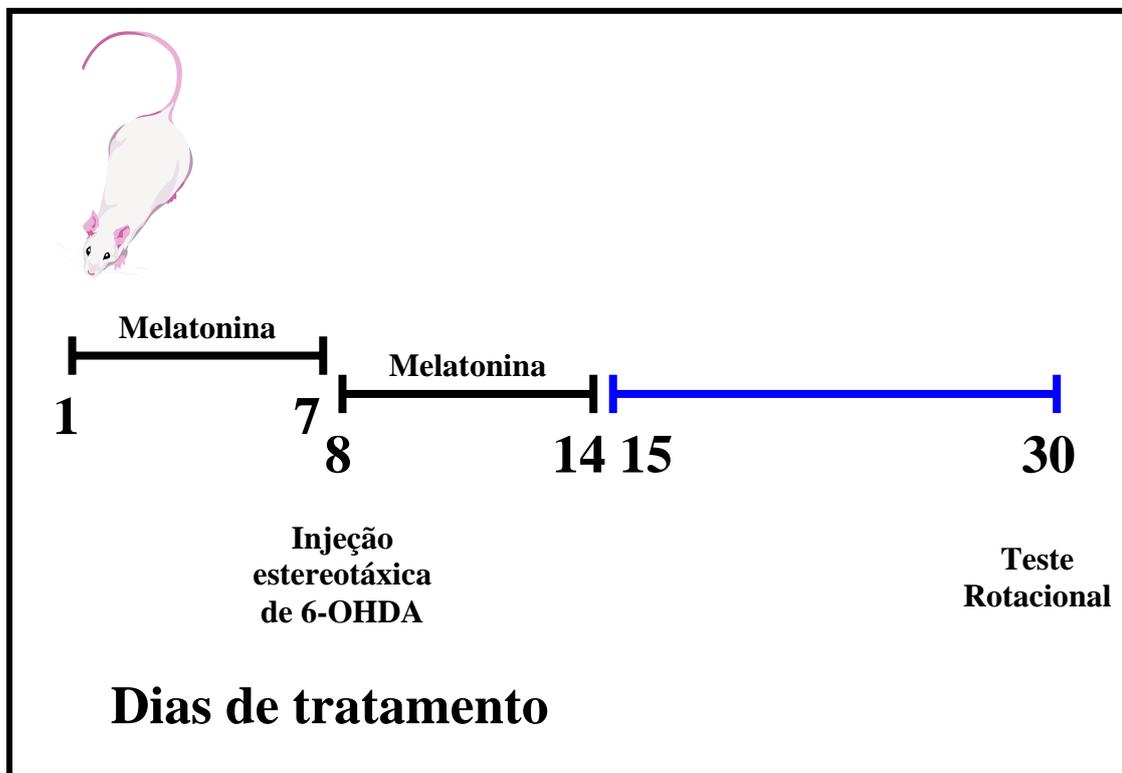


Esquema 2: Tratamento da melatonina durante 14 dias consecutivos após a lesão (protocolo 2).

- **Protocolo 3**

Pré-tratamento. Os animais foram tratados com melatonina na dose de 5 mg/kg, i.p., durante 7 dias, submetidos a lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA, e tratados mais uma vez com melatonina durante 7 dias, perfazendo duas semanas de tratamento, duas semanas depois os

animais foram tratados com apomorfina para a realização do teste rotacional e 24 horas depois foram sacrificados para a realização das análises.



Esquema 3: Tratamento da melatonina durante 7 dias antes da lesão e depois por mais 7 dias consecutivos após a lesão (protocolo 3).

3.4 - Material utilizado nos experimentos

- Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça);
- Banho maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- Centrífuga refrigerada (modelo Eppendorf);
- Contador de Cintilação Líquida Beckman (modelo LS 6500, CA, EUA);
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro (Sarstedt, Alemanha);
- Espectrofotômetro (modelo DU 640B, Beckman , CA, EUA);
- Equipamento para filtração a vácuo (Millipore Apparatus, Bedford, MA, EUA);

- Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SEFANEM, SP, Brasil);
- Filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Maidstone, England);
- Frascos de vidro para contagem de cintilação (*vials* Beckman, Fullerton, CA, EUA);
- Freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., EUA);
- Guilhotina (Harvard, EUA);
- Homogeneizadores (Bellico, EUA);
- Equipamento de HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Performance- Detector de fluorescência e eletroquímico (Shimadzu, Japão), constante de: Bomba de HPLC (LC-10 AD, Shimadzu Corp., Japão); Coluna para catecolaminas (modelo C 18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, Shimadzu, Japão); Pré-coluna (CLC G-ODS, 4mmD X 1 cm, Shimadzu, Japão); Detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu, Japão) e Eletrodo de carbono (Shimadzu); Degaseificador (DGU-2A Shimadzu, Japão); Integrador (C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japão);
- Injetor (Shimadzu Corp., Japan);
- Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca);
- Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);
- Sonicador (Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, EUA).

3.5 - Teste comportamental

3.5.1- Teste rotacional

Os animais foram submetidos ao teste rotacional quatro semanas após a lesão com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral)) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo foi observada durante 60 minutos (Kim et al, 1998).

3.6 - Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com tiopental (30mg/kg, i.p.) e com hidrato de cloral (200mg/kg, i.p.) e receberam uma injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA (duas injeções de 1µl de uma solução de 6-OHDA dissolvido em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico em uma concentração final de 12 µg /µl) dentro do corpo estriado direito (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 a partir do bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson 1986), usando uma seringa Hamilton de 5 µl . A seringa foi deixada no local de aplicação por 2 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente e depois ela foi retirada cuidadosamente (Kin et al, 1998).

3.7 - Dissecção da área cerebral (corpo estriado)

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo, 24 horas após o teste rotacional.

Em seguida, acompanhando a fissura sargital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecção que divulsionou o córtex delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex, depois de divulsionado, foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado (**Figura 15**).

O corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido) foi então isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecção, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.



Figura 15- Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de rato.

Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio, sob gelo, pesada e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior. Quando foi necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo 2 meses), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que as áreas 24h após a dissecação (Burke, 1987; Fiedler et al., 1987).

3.8- Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos

A determinação dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais, com as seguintes variações:

- Receptores D_1 -símile

Foi utilizado o ligante específico [3H]-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), de acordo com método previamente descrito (Meltzer et al., 1989).

- Receptores D₂-símile

Foi utilizado o ligante específico [3H]-espiroperidol (114,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), segundo uma adaptação do método previamente descrito (Kessler et al., 1991 e Meltzer et al., 1989).

- Método

O [3H]-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₁-símile. O ligante [3H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₂-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ (Kessler et al., 1991; Terai et al., 1989). Para bloquear os receptores serotoninérgicos no *binding* de D₂-símile, foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

A dopamina, um agonista dopaminérgico, foi adicionada, na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor D₁ para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim a ligação do [3H]-SCH23390, que fica livre. O mesmo foi feito com relação ao receptor D₂, mas neste caso foi utilizado o butaclamol, um antagonista de receptores dopaminérgicos, também com o intuito de determinar as ligações não-específicas. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida.

- Procedimento experimental

Logo após a dissecação da área cerebral em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

Os homogenatos, contendo 50-100 μg de proteína, foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores D_1 -símile, o tampão continha 0,135 a 10,8 nM de [3H]-SCH 23390 para experimentos de saturação. No caso dos receptores D_2 -símile, o tampão continha 10 μM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos, e 0,04 a 2,29 nM de [3H]-espiroperidol para experimentos de saturação. Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 μM (durante 10 minutos), no caso dos receptores D_1 , ou butaclamol 10 μM , no caso dos receptores D_2 sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61 %. O *binding* específico foi calculado como *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 5 μM ou butaclamol 10 μM , respectivamente para os receptores D_1 e D_2 , e os resultados foram expressos em fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

- Soluções reagentes

- **[3H]-espiroperidol** (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 µL de [3H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

- **[3H]- SCH 23390** (87 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 µl de [3H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

- Tampão Tris-HCl

Seis gramas de Tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 7,4.

- Tris HCl modificado

NaCl 120 mM; KCl 1mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4

- Mianserina

Comprimidos de mianserina (Tolvon 30 mg, Organon, SP, Brasil) foram macerados e diluídos em tampão tris-HCl, obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

- Dopamina (cloridrato de dopamina)

Dez miligramas de dopamina (Sigma) foram diluídas em 2 ml de tampão tris-HCl, tendo uma concentração final de 5 mg/ml. A esta solução, foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

- **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)**

O butaclamol (RBI, MA, EUA) foi dissolvido em ácido ascórbico a 0,1%, de forma a se obter uma concentração final de 10 μ M.

- **Coquetel de cintilação**

500 miligramas de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, EUA).

3.9- Dosagem de proteína

3.9.1- Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25 °C, utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry et al., 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração protéica fotometricamente. Inicialmente, é feita uma reação biureto de baixa eficiência, na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Essa cor biureto é característica de todas as proteínas, e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois, o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em comprimento de onda de 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckam DU 640B.

3.9.2- Soluções Reagentes

- **Reagente A:** Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;

- **Reagente B:** $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;

- **Reagente C:** Solução de cobre alcalino (24 ml do reagente A com 1 ml do reagente B, misturados no momento de usar);

- **Reagente de Folin:** Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;

- **Solução de albumina sérica bovina** (Sigma, St Louis, MO, EUA) 1 mg/ml em água bidestilada.

3.10 – Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC

- Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (**Figura 16**). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna, e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a

corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos, e no segundo caso os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo, foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo, seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

- Procedimento experimental

Os animais foram decapitados quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, 24h após o teste rotacional e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sob gelo. O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10 %. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO_4) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 μl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC (**Figura 16**), para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e

tetrahidrofurano 1,7 % v/v. Dopamina (DA), Ácido diidroxifenilacético (DOPAC), Ácido homovanílico (HVA), Serotonina (5-HT) e Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.



Figura 16- Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica

- Soluções Reagentes

- **Fase Móvel**

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ

Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, EUA) e completado o volume para 471,5 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

- Ácido Perclórico 0,1 M

Foram adicionados 1,8 ml de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 mL.

- Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados expressos em ng/g de tecido (**Figura 17**).

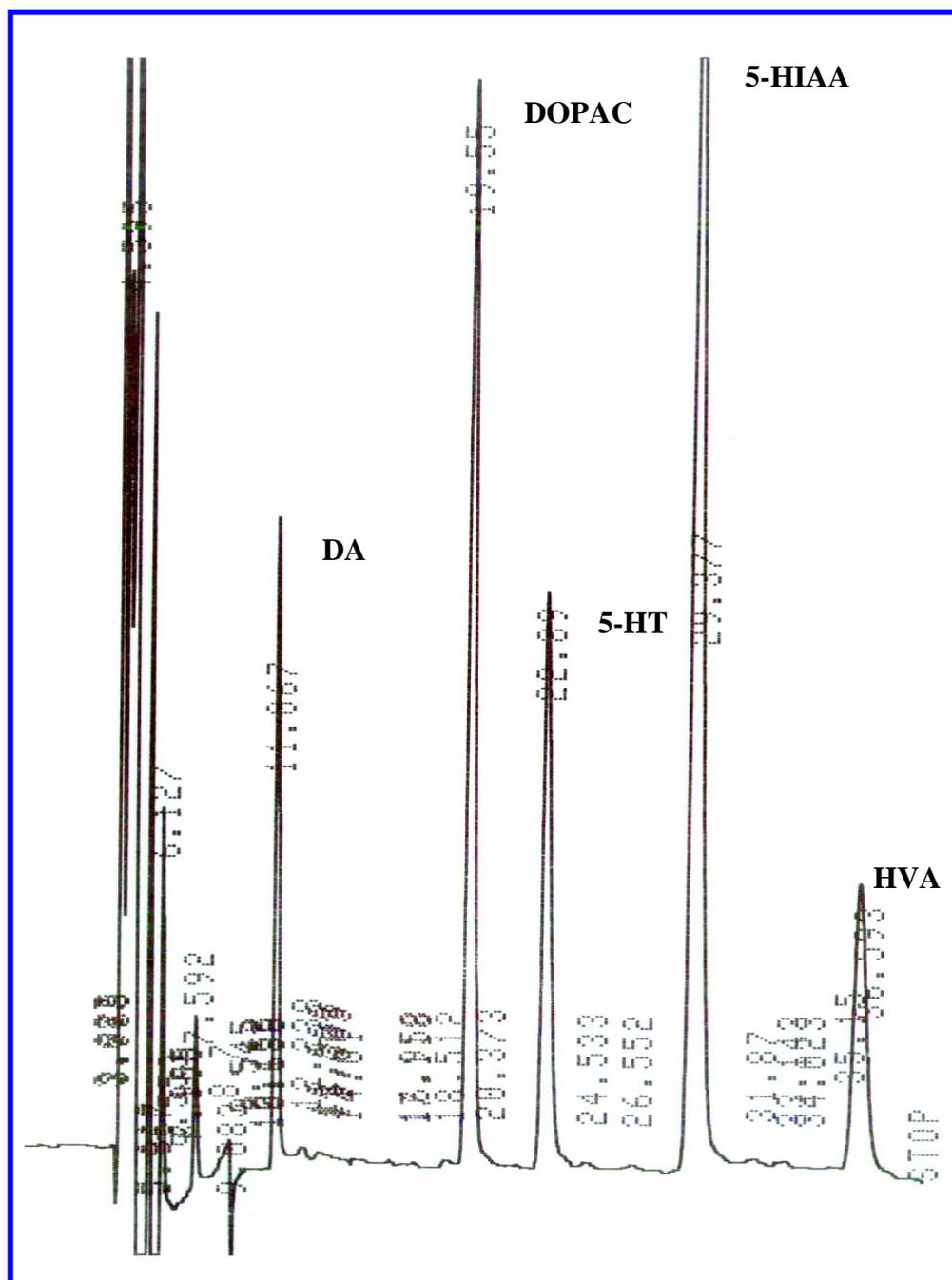


Figura 17- Cromatograma das dosagens das monoaminas detectados eletroquimicamente usando HPLC. Dopamina (DA), 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

3.11 - Dosagem de MDA

- Método

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica e receberam uma injeção unilateral de 6-OHDA, como mencionado anteriormente, e foram tratados com melatonina (5mg/kg, i.p.) 1 hora após a lesão e depois durante 7 dias, no oitavo dia os animais foram decapitados e tiveram os seus cérebros dissecados sob gelo. O estriado foi utilizado para preparar homogenatos a 10% em solução de KCl 1,15%. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5mL do homogenato, 3,0mL de ácido fosfórico 1,0% e 1,0mL de TBA 0,6%. A mistura foi, então, aquecida (100°C) durante 45 minutos, depois foi resfriada, misturada a 4,0mL de N-butanol, agitada e centrifugada à 1200 r.p.m. por 10 minutos. A fase do N-butanol foi separada por centrifugação e a absorbância foi medida em 535 e 520 nm. A diferença das absorbâncias foi usada como valor do MDA (Uchiyama e Mihara, 1977).

- Soluções reagentes:

- KCl (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1,15% em água destilada.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA - Sigma, Brasil) a 0,6% em água destilada.
- Ácido fosfórico (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) a 1,0% diluído em água destilada.
- N-butanol (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil).

3.12 - Análise estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *Instar*. Para comparação de dados paramétricos, o teste “t” de Student foi utilizado para comparação de médias de dois grupos e Análise de Variância (Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*) para comparações

múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1 – Estudos Comportamentais:

Os ratos com lesão estriatal unilateral apresentaram um comportamento rotacional característico após a administração de apomorfina (3mg/kg, i.p.), quatro semanas após a lesão (controles $156,4 \pm 13,3$ rotações/hora). Este comportamento esteriotipado foi significativamente diminuído em 60, 89, 78 e 47%, com o tratamento com melatonina nas doses de 2, 5, 10 e 25mg/kg, i.p. (Mel 2: $56,7 \pm 6,4$; Mel 5: $16,4 \pm 1,7$; Mel 10: $33 \pm 4,5$ e Mel 25: $81,3 \pm 11,8$ rotações/hora), durante 7 dias após a lesão, quando comparado com os controles, respectivamente. O efeito máximo foi observado nas doses de 5 e 10mg/kg, e foi de algum modo menor do que com a mais alta dose de melatonina (25mg/kg) (**Figura 1**).

A **Figura 2** mostra o efeito da melatonina (5mg/kg, i.p., tratado 1h após a lesão com 6-OHDA e diariamente durante 14 dias) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (3mg/kg) em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA. Nesse caso houve uma diminuição do número de rotações em cerca de 96% (Mel 5 14d: $6,7 \pm 0,9$ rotações/hora) quando comparado com o grupo controle (controles $156,4 \pm 13,3$ rotações/hora), essa diminuição foi ainda maior do que no grupo tratado por 7 dias apenas (89%) com a mesma dose (5 mg/kg,i.p.).

A **Figura 3** mostra o efeito do pré-tratamento com melatonina (5mg/kg, diariamente durante 7 dias antes da injeção estereotáxica de 6-OHDA, seguido da continuação do tratamento, 1h após a lesão por mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento, no comportamento rotacional induzido pela apomorfina em ratos, quatro semanas após a lesão com 6-OHDA. Foi observada uma diminuição em cerca de 86% (Mel 5 2s: $21,6 \pm 2,5$ rotações/hora) do número de rotações quando comparado ao grupo controle (controles $156,4 \pm 13,3$

rotações/hora), semelhante ao resultado obtido com o grupo tratado por 7 dias apenas (89%) com a mesma dose (5 mg/kg,i.p.).

A **Figura 4** mostra o efeito da NAS (5mg/kg, i.p. 1h após a lesão, com 7 dias de tratamento) no comportamento rotacional induzido por apomorfina quatro semanas após a lesão com 6-OHDA em comparação com o controle e com o grupo tratado com melatonina, seguindo o mesmo protocolo. A NAS promoveu uma diminuição do número de rotações semelhante àquela ocorrida com o grupo tratado com melatonina na mesma dose, cerca de 88,7% e 89,5%, respectivamente (NAS: $17,6 \pm 1,7$ e Mel 5: $16,4 \pm 1,7$ rotações/hora), quando comparado ao grupo controle (controles $156,4 \pm 13,3$ rotações/hora).

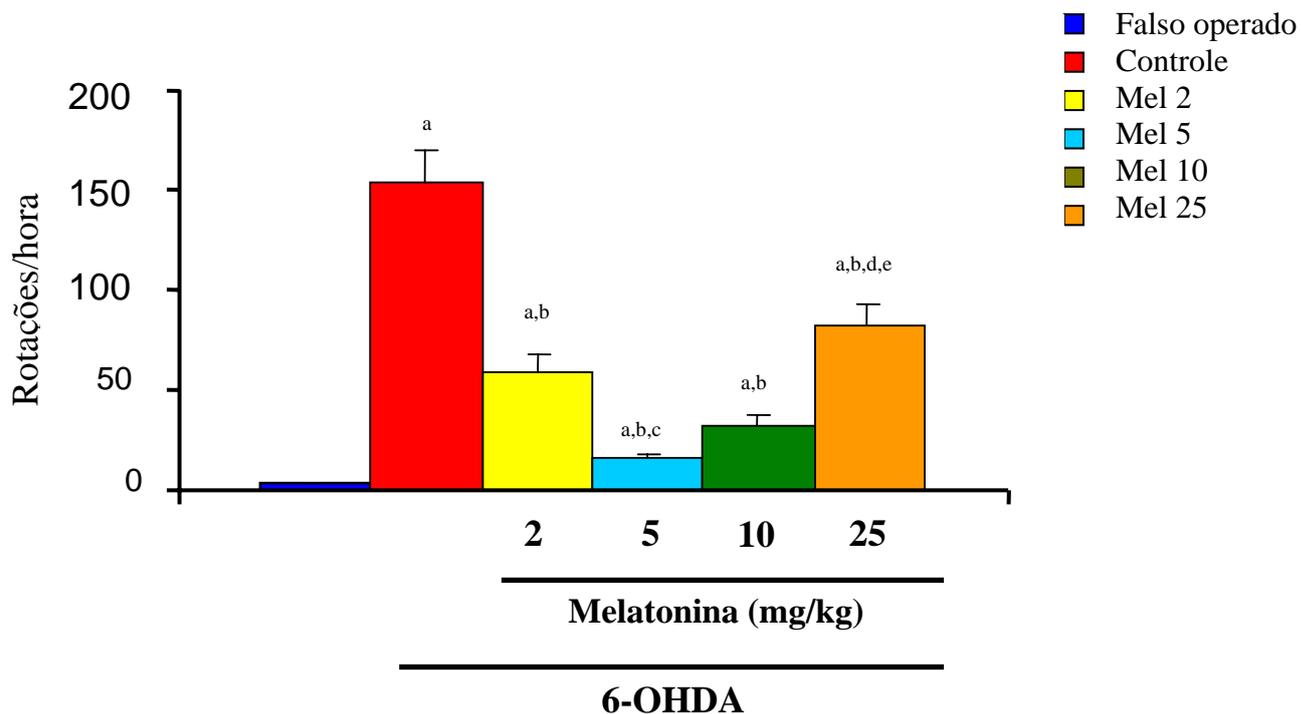


Figura 1- Efeito da melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA. Quatro semanas após a lesão com 6-OHDA o número de rotações contralaterais foi registrado por 60 min. Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-20). Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls. a vs falso operados, b vs controles (6-OHDA), c vs Mel 2, d vs Mel 5 e e vs Mel 10, respectivamente, com $p < 0,05$.

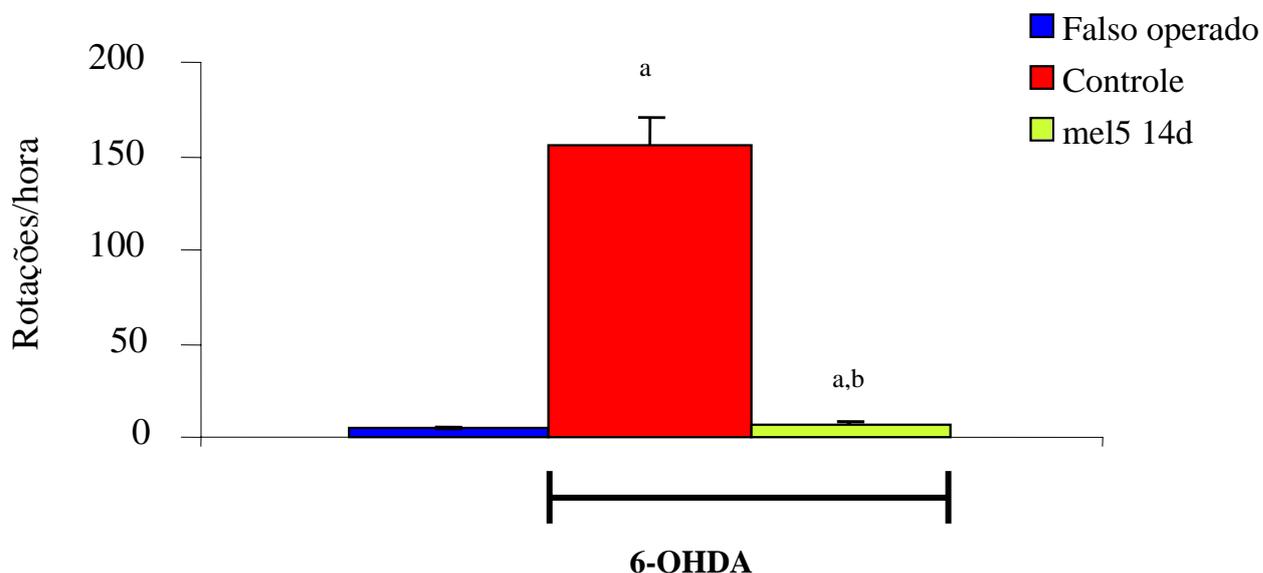


Figura 2- Efeito da melatonina (5mg/kg, i.p. tratado 1h após a lesão com 6-OHDA e diariamente durante 14 dias,) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA. Quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, o número de rotações contralaterais foi registrado por 60 min. Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-8). Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls. a,b vs falso operados e controles (6-OHDA), respectivamente, com $p < 0,05$.

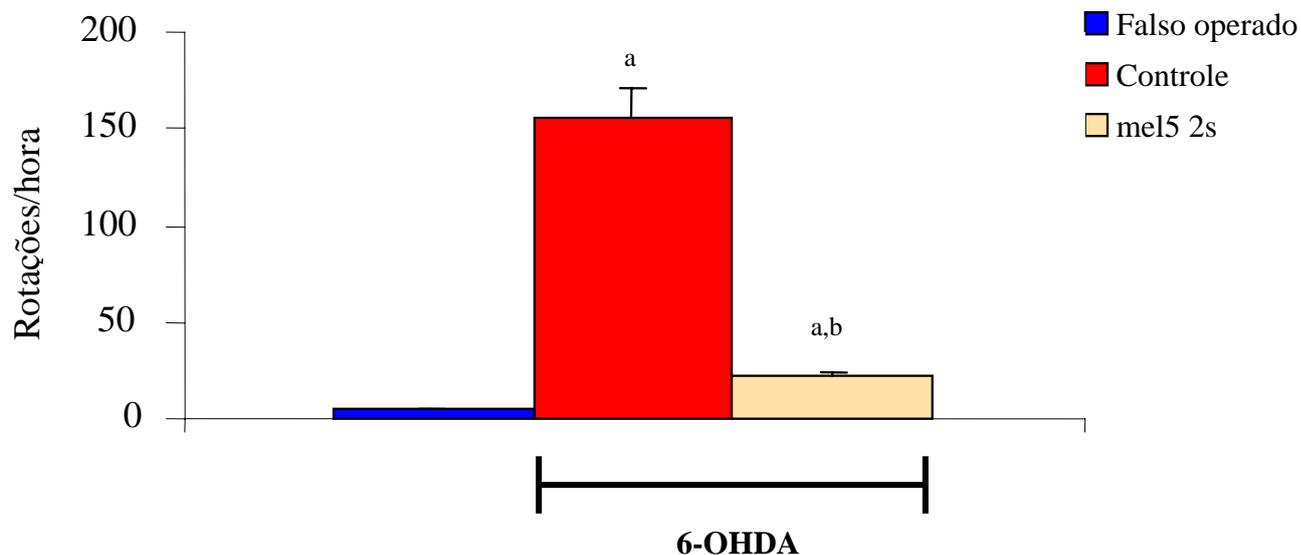


Figura 3- Efeito da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, antes da injeção com 6-OHDA e 1h após a injeção de 6-OHDA mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA. Quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, o número de rotações contralaterais foi registrado por 60 min. Os resultados são expressos como média±EPM do número de experimentos (6-20). Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls. a,b vs falso operados e controles (6-OHDA), respectivamente, com $p < 0,05$.

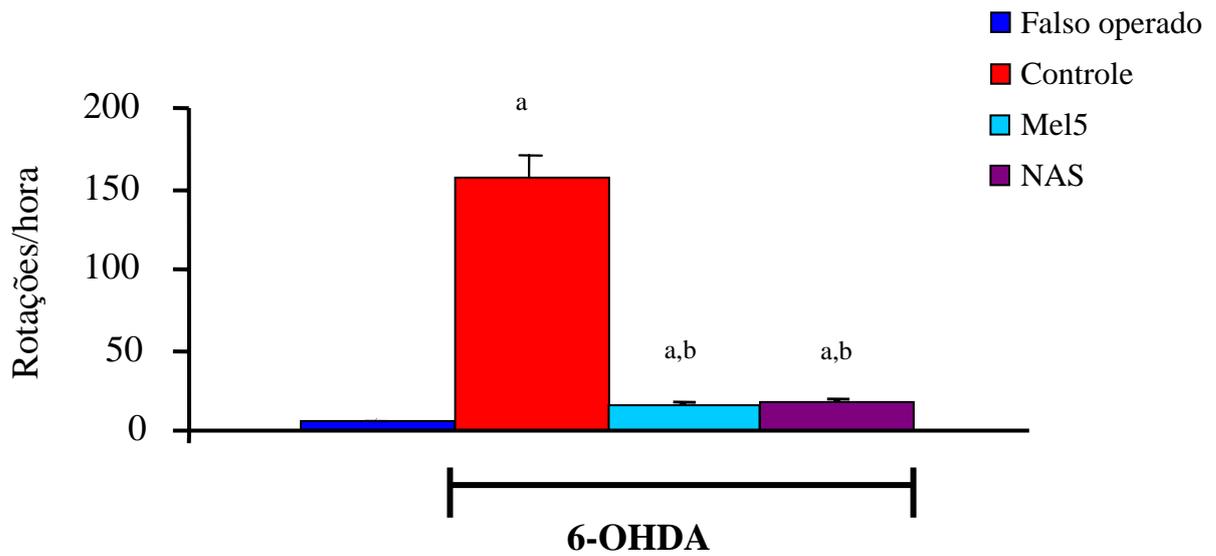


Figura 4- Efeitos da melatonina (5mg/kg, i.p.) e da NAS (5mg/kg, i.p.) no comportamento rotacional induzido pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão estriatal estriatal induzida pela 6-OHDA. Quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, o número de rotações contralaterais foi registrado por 60 min. Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (6-20). Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls. a,b vs falso operados e controles (6-OHDA), respectivamente, com $p < 0,05$.

4.2 – Estudos Bioquímicos:

4.2.1 – Ensaio de *Binding*

Os resultados do *binding dopaminérgico* mostram que a melatonina (5mg/kg, i.p.) aumentou significativamente o Bmax do [³H]-SCH 23390 em cerca de 43% (Bmax - Mel 5: $277,8 \pm 25,8$), indicando uma *upregulation* do receptor D1. Este efeito foi oposto ao ocorrido com os valores do Kd, os quais mostraram uma diminuição de cerca de 48% (Kd – Mel 5: $1,5 \pm 0,10$) quando comparado ao controle (Bmax – Cont: $194,8 \pm 19,0$ e Kd – Cont: $2,9 \pm 0,38$). Nenhum efeito foi observado no número de receptores D2. Foi observada uma diminuição, embora não significativa, nos valores do Kd (25%) dos receptores D2 (Kd – Mel 5: $2,1 \pm 0,23$) (**Tabela 1**).

Foi observado um resultado semelhante com o grupo da NAS, com uma tendência ao aumento do Bmax do [³H]-SCH 23390 (NAS: $245,3 \pm 27,6$), e uma diminuição significativa nos valores do Kd em cerca de 62% (NAS: $1,1 \pm 0,28$). Nenhum efeito significativo foi observado em relação ao número dos receptores D2 mas, assim como a melatonina, a NAS também diminuiu significativamente os valores do Kd (55%) em relação ao controle (Kd – NAS: $1,2 \pm 0,21$ e Cont: $2,7 \pm 0,25$), sendo essa diminuição também significativa em relação ao grupo tratado com melatonina (43%) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Efeitos da melatonina (Mel) e da N-acetilserotonina (NAS) na densidade dos receptores dopaminérgicos em corpo estriado de ratos tratados com 6-OHDA.

Grupo	D1 - [³ H]-SCH23390		D2 - [³ H]-spiroperidol	
	Bmax	Kd	Bmax	Kd
Controle	194,8±19,0(6)	2,9±0,38(6)	209,3±16,6(6)	2,7±0,25(6)
Mel 5	277,8±25,8(7) ^a	1,5±0,10(7) ^a	203,2±13,0(7)	2,1±0,23(7)
NAS	245,3±27,6(6)	1,1±0,28(6) ^a	240,3±37,9(7)	1,2±0,21(7) ^{a,b}

A melatonina (5mg/kg, i.p.) e a NAS (5mg/kg, i.p.) foram administradas 1h após a lesão com 6-OHDA e depois diariamente por 7 dias. Os controles foram tratados com salina 0,9%. Quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais foram decaptados e o corpo estriado utilizado para os ensaios de binding. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos em parênteses. [³H]-SCH 23390 e [³H]-espiroperidol foram usados como ligantes para os receptores D1 e D2-símiles, respectivamente. ^{a,b} vs Controle (6-OHDA) e Mel 5, respectivamente, com $p < 0,05$ (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

4.2.2 – Dosagens de Monoaminas:

Os níveis das monoaminas em corpo estriado de ratos, quatro semanas após a injeção estereotáxica de 6-OHDA, e o efeito do tratamento com a melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p.) estão apresentados na **tabela 2**. A injeção estereotáxica de 6-OHDA causou dano oxidativo e consequente destruição tecidual evidenciada pela diminuição em cerca de 77 à 85% dos conteúdos das monoaminas e de seus metabólitos no lado ipsilateral (estriado direito lesionado) quando comparado com o lado contralateral (lado contrário a lesão que não recebeu injeção de 6-OHDA) dos controles. Nos lados contralaterais dos grupos falso operados, controles (lesionados com 6-OHDA e tratados com salina) e tratados com melatonina não foram observadas diferenças significativas entre os valores dos níveis de monoaminas.

Nos grupos tratados com a melatonina nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg houve uma diminuição em cerca de 60, 44, 54 e 67%, respectivamente, nos conteúdos de DA no lado ipsilateral (lado lesionado (I), DA - Mel 2 I: $1911,3 \pm 186,0$; Mel 5 I: $2646,4 \pm 189,6$; Mel 10 I: $2179,1 \pm 186,4$ e Mel 25 I: $1585,3 \pm 163,5$) quando comparado com o lado contralateral (lado não lesionado, Cont C: $4728,7 \pm 339,4$) dos controles, e em cerca de 48, 67, 50 e 54% nos conteúdos de DOPAC (Mel 2 I: $1012,6 \pm 67,7$; Mel 5 I: $658,2 \pm 74,7$; Mel 10 I: $1010,2 \pm 123,1$ e Mel 25 I: $937,5 \pm 89,2$), enquanto os conteúdos de HVA diminuíram cerca de 51, 63, 33 e 46% (HVA - Mel 2 I: $243,0 \pm 18,5$; Mel 5 I: $185,9 \pm 23,3$; Mel 10 I: $332,7 \pm 49,8$ e Mel 25 I: $270,4 \pm 20,1$) também quando comparado com o lado contralateral dos controles (DOPAC - Cont (C): $2018,1 \pm 92,5$ e HVA Cont (C): $498,3 \pm 49,3$).

Como foi observado anteriormente, no grupo controle (lesionado com 6-OHDA e tratado com salina) essas diminuições nos níveis das monoaminas foram ainda maiores (DA - Cont (I): $703,0 \pm 52,3$; DOPAC Cont (I): $365,5 \pm$

37,1; HVA Cont (I): $84,5 \pm 6,8$). Nos grupos tratados com melatonina, os conteúdos de DA foram recuperados a valores cerca de 3,2; 3,8; 3,1 e 2,3 vezes aqueles dos controles (6-OHDA), e os conteúdos de DOPAC a valores 2,9; 2,2; 3,9 e 3,2 vezes, nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg, respectivamente. Uma diferença significativa também foi vista entre os níveis de DA nos grupos tratados com melatonina 2, 5, 10 e 25 mg/kg. Nesta condição, a proteção mediada pela melatonina nos ratos lesionados com 6-OHDA foi inversamente proporcional a dose, onde a dose de 5 mg/kg foi aquela que apresentou o melhor efeito.

O tratamento com a melatonina nas doses de 2 e 10 mg/kg diminuiu em cerca de 30 e 41%, respectivamente, os conteúdos de 5HT no lado ipsilateral (lado lesionado, 5HT - Mel 2 I: $491,1 \pm 53$; Mel 10 I: $410,0 \pm 43,9$) destes grupos quando comparado com o lado contralateral (lado não lesionado) dos controles (5HT - Cont (C): $697,8 \pm 62,6$), e nas doses de 5 e 25 mg/kg não foi observada nenhuma diferença significativa (5HT - Mel 5 I: $683,1 \pm 41,1$; Mel 25 I: $697,5 \pm 79,2$). Nenhuma diferença significativa foi vista entre quaisquer dos grupos com relação aos níveis de 5-HIAA (Cont (C): $569,5 \pm 43,4$; Mel 2 I: $328,0 \pm 27,7$; Mel 5 I: $358,9 \pm 29,2$; Mel 10 I: $469,8 \pm 39,5$; Mel 25 I: $492,3 \pm 30,0$).

A **Figura 5** mostra uma diminuição em cerca de 83% (DA - Cont: $17 \pm 1,5$ - Ipsilateral/contralateral %) no conteúdo de DA nos ratos lesionados com 6-OHDA (controles) no lado ipsilateral (lesionado) quando comparado com o lado contralateral. Todos os valores foram obtidos dos mesmos animais, onde o lado contralateral foi usado para comparação com o lado ipsilateral (lesionado) do mesmo animal. No grupo tratado com melatonina, nas doses mais baixas de 2 e 5 mg/kg, essa diminuição foi apenas de 48 e 38% respectivamente (DA - Mel 2: $46 \pm 4,4$ e Mel 5: $61,6 \pm 5,0$ - Ipsilateral/contralateral %), e a percentagem de diminuição para as doses mais altas foi de 51,5 e 63,5% para as doses de 10 e 25 mg/kg, respectivamente (DA - Mel 10: $48,4 \pm 2,8$ e Mel 25: $36,5 \pm 2,8$ -

Ipsilateral/contralateral %), mostrando que o efeito da melatonina foi inversamente proporcional a sua dose.

Houve uma diminuição nos níveis de DOPAC na mesma proporção que nos níveis de DA, cerca de 83% (DOPAC - Cont: $17 \pm 1,8$ - Ipsilateral/contralateral %), quando comparado o lado contralateral (lesionado) com o lado ipsilateral do mesmo animal. Nos grupos tratados com melatonina nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg, essa diminuição foi significativamente menor, cerca de 36, 51, 32 e 56%, respectivamente (DOPAC - Mel 2: $63,6 \pm 5,7$; Mel 5: $49 \pm 5,3$; Mel 10: $67,5 \pm 3,3$; Mel 25: $43,5 \pm 3,4$ - Ipsilateral/contralateral %). Os níveis de HVA também diminuíram significativamente no grupo controle (lesionado com 6-OHDA e tratado com salina), cerca de 70% (HVA - Cont: $30,5 \pm 4,3$ - Ipsilateral/contralateral %), e nos grupos tratados com melatonina essa diminuição também foi menor, cerca de 44, 51, 33 e 52%, respectivamente (HVA - Mel 2: $56,3 \pm 4,0$; Mel 5: $48,7 \pm 6,0$; Mel 10: $66,8 \pm 6,7$ e Mel 25: $48,2 \pm 2,6$ - Ipsilateral/contralateral %).

Foi observada uma diminuição de 72% (Cont: $27,6 \pm 2,7$ - Ipsilateral/contralateral %) nos níveis de 5HT no grupo controle (lesionado com 6-OHDA e tratado com salina) quando comparado o lado contralateral com o lado ipsilateral (lesionado) do mesmo animal. No grupo tratado com melatonina nas doses de 2, 5 e 10 mg/kg, houve uma diminuição de cerca de 39, 27 e 31%, respectivamente (5HT - Mel 2: $56,8 \pm 3,4$; Mel 5: $72,8 \pm 5,4$ e Mel 10: $69,2 \pm 6,1$ - Ipsilateral/contralateral %) enquanto na dose mais alta (25 mg/kg) a diminuição foi de 51% (5HT - Mel 25: $48,8 \pm 4,2$ - Ipsilateral/contralateral %).

Exceto por uma diminuição de 34% observada nos níveis de 5-HIAA com o grupo tratado com melatonina na dose de 2 mg/kg (5-HIAA - Mel 2: $64,4 \pm 3,9$ - Ipsilateral/contralateral %), nenhum outro efeito foi observado neste parâmetro (**Figura 6**). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo falso

operado (lado contralateral e ipsilateral) e o lado contralateral dos ratos lesionados com 6-OHDA, controles e tratados com melatonina, em nenhum dos parâmetros analisados.

A **Figura 7** mostra os resultados obtidos variando a duração do tratamento com a melatonina. Neste caso os animais foram tratados com melatonina na dose de 5mg/kg (a dose que apresentou o melhor resultado nos outros testes) 1 hora após a injeção estereotáxica de 6-OHDA e diariamente durante 14 dias. Foi observada uma diminuição nos níveis de DA de apenas 17,7% (DA - Mel 5 14d: $82,3 \pm 3,5$ - Ipsilateral/contralateral %), no lado ipsilateral (lado lesionado) quando comparado com o lado contralateral (estriado esquerdo, lado que não recebeu injeção estereotáxica de 6-OHDA) do mesmo animal, essa diminuição foi ainda menor do que aquela observada com o tratamento na mesma dose por apenas 7 dias (38%). Os níveis de DOPAC apresentaram uma diminuição de apenas 1,7% (DOPAC – Mel 5 14d: $98,3 \pm 10$ - Ipsilateral/contralateral %) e os níveis de HVA não apresentaram nenhuma variação quando comparado o lado ipsilateral com o contralateral (HVA – Mel 5 14d: $106 \pm 11,9$ - Ipsilateral/contralateral %).

Os níveis de 5HT diminuíram apenas cerca de 25% (5HT – Mel 5 14d: $74,5 \pm 10,7$ - Ipsilateral/contralateral %) no grupo tratado com melatonina (5mg/kg, i.p. 14d), de modo semelhante ao ocorrido com o grupo tratado com a mesma dose durante 7 dias (27%). Nenhuma alteração foi observada nos níveis de 5-HIAA (5HIAA – Mel 5 14d: $102,7 \pm 5,9$ - Ipsilateral/contralateral %) (**Figura 8**).

A **Figura 9** mostra o efeito do pré-tratamento com melatonina na dose de 5mg/kg durante 7 dias antes da injeção estereotáxica de 6-OHDA, seguido da continuação do tratamento, 1h após a lesão por mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento. Os níveis de DA diminuíram 36% (DA – Mel 5 2s: $64,3 \pm 6,2$ - Ipsilateral/contralateral %) e os níveis de DOPAC diminuíram 54 %

(DOPAC – Mel 5 2s: $46,0 \pm 2,8$ e - Ipsilateral/contralateral %). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a mesma dose (5mg/kg, i.p.) no tratamento por 7 dias após a lesão, sem o pré-tratamento (DA - Mel 5: $61,6 \pm 5,0$ e DOPAC - Mel 5: $49 \pm 5,3$ - Ipsilateral/contralateral %).

Os níveis de HVA diminuíram cerca de 15% (HVA – Mel 5 2s: $84,9 \pm 8,3$ – Ipsilateral/contralateral %), enquanto no grupo tratado melatonina na mesma dose (5mg/kg, i.p.), durante 7 dias após a lesão, sem o pré-tratamento, a diminuição foi de apenas 51% (HVA - Mel 5: $48,7 \pm 6,0$ – Ipsilateral/contralateral %).

Os níveis de 5HT diminuíram cerca de 45% (5HT – Mel 5 2s: $54,7 \pm 4,1$ - Ipsilateral/contralateral %) com esse tratamento e os níveis de 5-HIAA obtidos foram semelhantes aos do grupo controle, com uma diminuição de cerca de 16% (5-HIAA – Mel 5 2s: $84,3 \pm 8,3$; Cont: $82,6 \pm 8,4$ - Ipsilateral/contralateral %) (**Figura 10**).

Tabela 2. Efeitos da melatonina nos níveis de dopamina (DA), serotonina (5HT) e seus metabólitos (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA.

Grupos	DA	DOPAC	HVA	5HT	5HIAA
Cont C	4728.7 ± 339.4	2018.1 ± 92.5	498.3 ± 49.3	697.8 ± 62.6	569.5 ± 43.4
Cont I	703.0 ± 52.3 ^a	365.5 ± 37.1 ^a	84.5 ± 6.8 ^a	162.1 ± 12.2 ^a	481.6 ± 32.7
Mel 2 C	4652.5 ± 265.1	1673.8 ± 125.7	453.3 ± 18.6	693.0 ± 46.2	482.0 ± 38.2
Mel 2 I	1911.3 ± 186.0 ^b	1012.6 ± 67.7 ^b	243.0 ± 18.5 ^b	491.1 ± 53.7 ^{b,c}	328.0 ± 27.7
Mel 5 C	5019.4 ± 492.5	1674.0 ± 122.1	311.7 ± 54.9	815.7 ± 60.1	367.7 ± 16.7
Mel 5 I	2646.4 ± 189.6 ^b	658.2 ± 74.7 ^b	185.9 ± 23.3	683.1 ± 41.1 ^b	358.9 ± 29.2
Mel 10 C	4163.2 ± 315.2	1729.7 ± 212.1	461.7 ± 25.8	560.7 ± 62.3	566.5 ± 31.8
Mel 10 I	2179.1 ± 186.4 ^b	1010.2 ± 123.1 ^b	332.7 ± 49.8 ^b	410.0 ± 43.9 ^{b,c}	469.8 ± 39.5
Mel 25 C	4112.1 ± 153.7	1694.6 ± 108.4	535.9 ± 27.5	622.5 ± 45.7	590.2 ± 26.3
Mel 25 I	1585.3 ± 163.5 ^{b,c,d}	937.5 ± 89.2 ^b	270.4 ± 20.1 ^b	697.5 ± 79.2 ^{b,d}	492.3 ± 30.0

A melatonina (Mel) foi administrada (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p.) diariamente durante 7 dias, 1h após a lesão com 6-OHDA. Quatro semanas após a injeção de 6-OHDA no corpo estriado, os animais foram decapitados para a dosagem das monoaminas. Os resultados foram expressos como média ± SEM com 6 - 20 animais. Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA e o Student-Newman-Keuls. a vs Cont C, b, vs. controle I (Cont, 6-OHDA); c, vs. Mel 5; d, vs. Mel 10 com $p < 0.05$. I = ipsilateral; C = lado contralateral. Dopamina (DA), 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

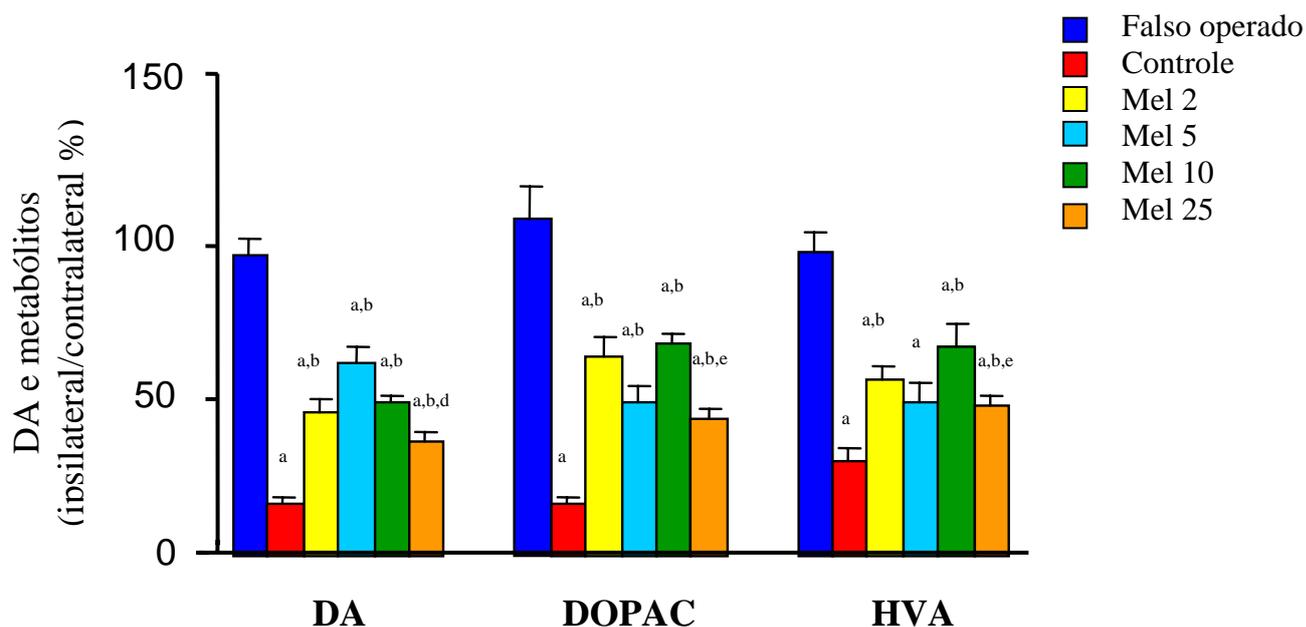


Figura 5- Efeitos da melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 6-20). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, vs. Falso operado; b, vs. controle (6-OHDA); c, vs. Mel 2; d, vs. Mel 5; e, vs Mel 10 com $p < 0.05$. Dopamina (DA), 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

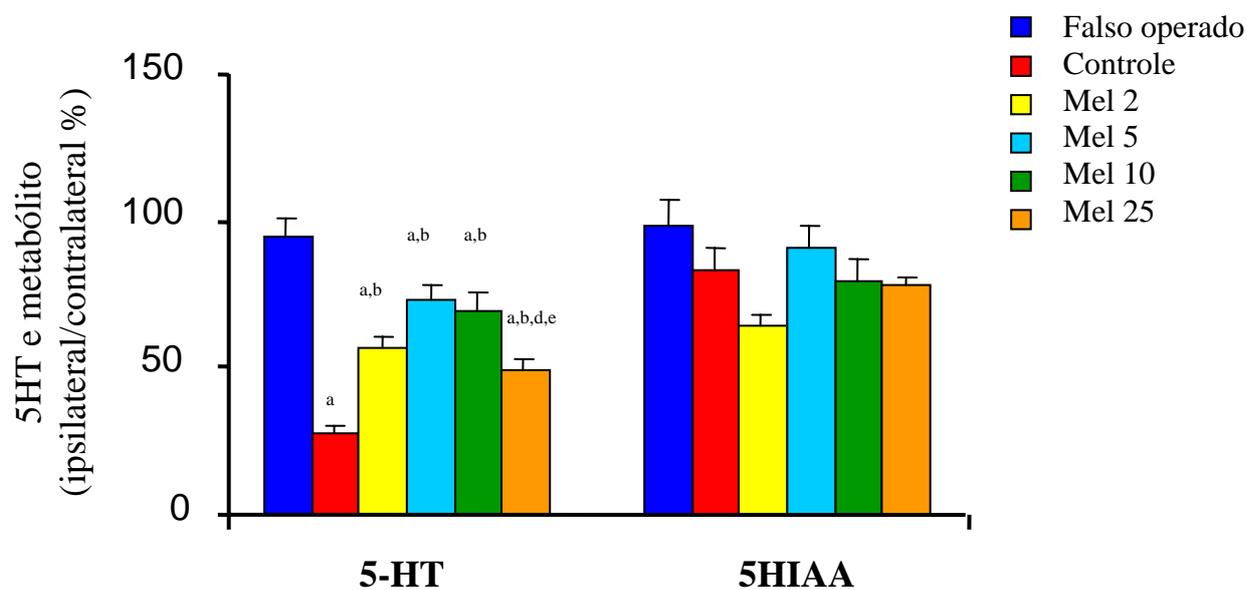


Figura 6- Efeitos da melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de 5HT e 5-HIAA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 6-20). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, vs. Falso operado; b, vs. controle (6-OHDA); c, vs. Mel 2; d, vs. Mel 5; e, vs. Mel 10 com $p < 0.05$. Serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

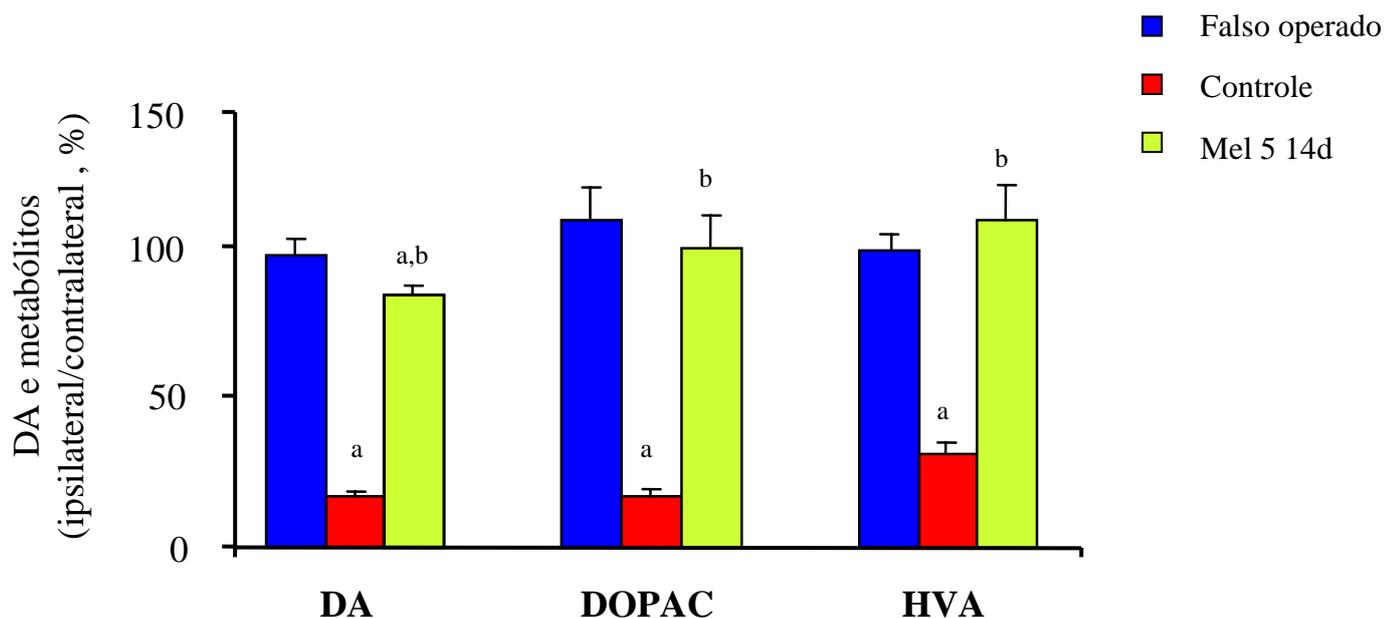


Figura 7- Efeitos da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 8). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, vs. Falso operado; b, vs. controle (6-OHDA); com $p < 0.05$. Dopamina (DA), 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

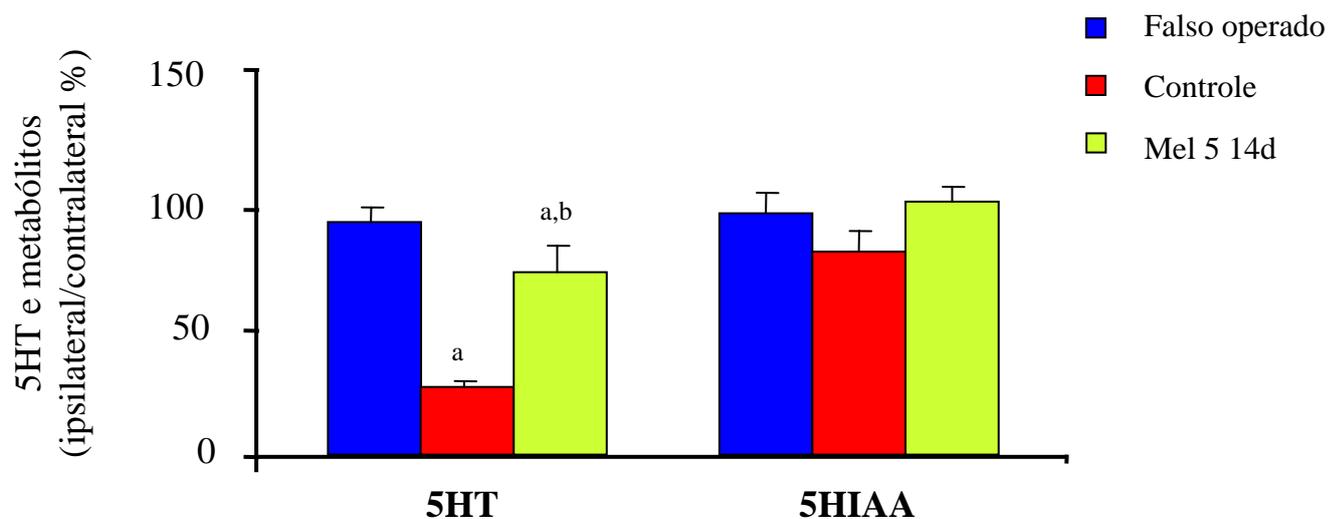


Figura 8- Efeitos da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 14 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) nos níveis de 5HT e 5-HIAA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de rato (lado ipsilateral/contralateral, %). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 8). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, vs. Falso operado; b, vs. controle (6-OHDA); com $p < 0.05$. Serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

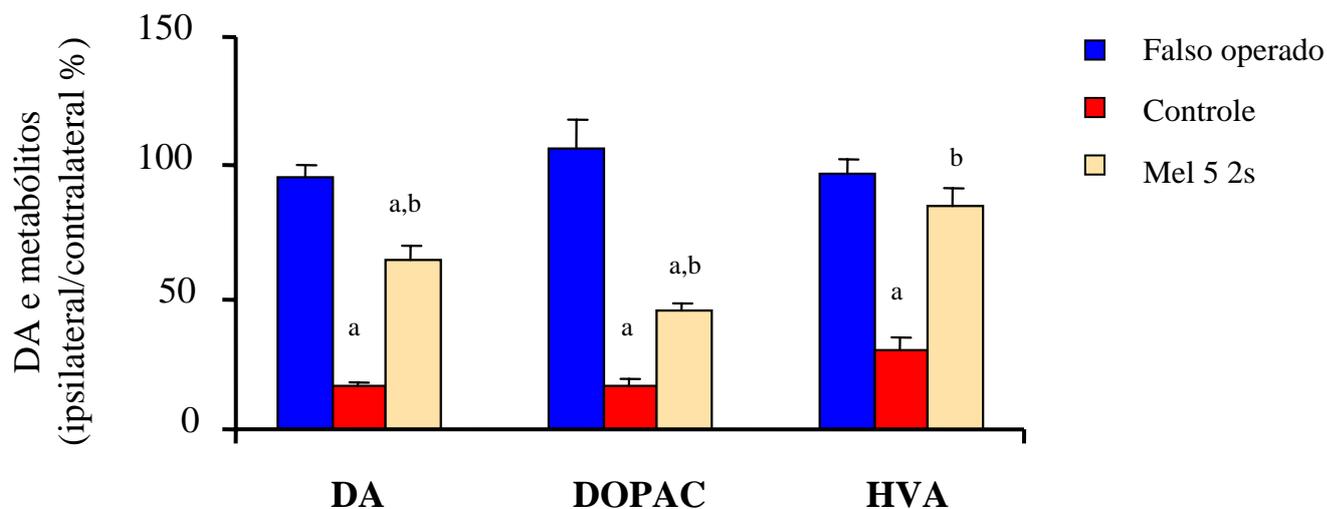


Figura 9- Efeitos da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, antes da injeção com 6-OHDA e 1h após a injeção de 6-OHDA, mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento) nos níveis de DA, DOPAC e HVA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 8). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, vs. Falso operado; b, vs. controle (6-OHDA); com $p < 0.05$. Dopamina (DA), 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

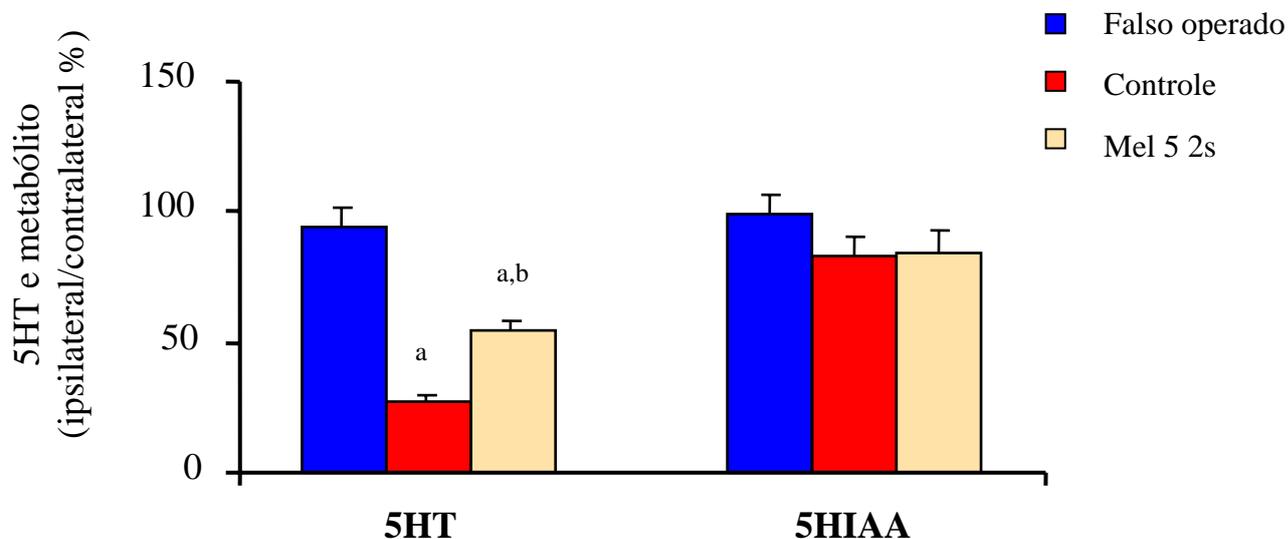


Figura 10- Efeitos da melatonina (5 mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, antes da injeção com 6-OHDA e 1h após a injeção de 6-OHDA mais 7 dias, perfazendo 2 semanas de tratamento) nos níveis de 5HT e 5-HIAA (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos (lado ipsilateral/contralateral, %). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n = 8). Para análise estatística, foram utilizados ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. a, vs. Falso operado; b, vs. controle (6-OHDA); com $p < 0.05$. Serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram detectados eletroquimicamente através da técnica de HPLC.

4.2.3 – Dosagem de MDA:

Foi realizada uma avaliação do efeito da melatonina na lesão oxidativa induzida pela lesão com 6-OHDA através do teste do TBARS para a quantificação dos níveis de malonildialdeído (MDA), como índice de peroxidação lipídica. Os animais foram submetidos à lesão unilateral com 6-OHDA; os controles foram tratados com salina 0,9%. O grupo Mel 5 foi tratado com melatonina (5mg/kg, i.p.) diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA, 24 horas após o último dia de tratamento os animais foram sacrificados e foi realizada a dosagem dos níveis de MDA.

Foi observado um aumento significativo nos níveis de MDA no lado ipsilateral (lesionado, Cont I: $68,2 \pm 1,2$) quando comparado com o lado contralateral (Cont C: $54,2 \pm 1,5$) nos animais controles e uma diminuição nos animais tratados com melatonina no lado ipsilateral (Mel 5 I: $58,5 \pm 1,9$) quando comparado com o lado ipsilateral dos controles (**Figura 11**). No grupo falso operado (FO) não foram observadas alterações significativas nesse parâmetro (FO C: $53,8 \pm 0,5$ e FO I: $54,2 \pm 0,9$). O tratamento com melatonina produziu uma recuperação dos níveis de MDA em níveis semelhantes ao grupo falso operado (FO: 104,3%, Mel 5: 105,7%) (**Tabela 3**).

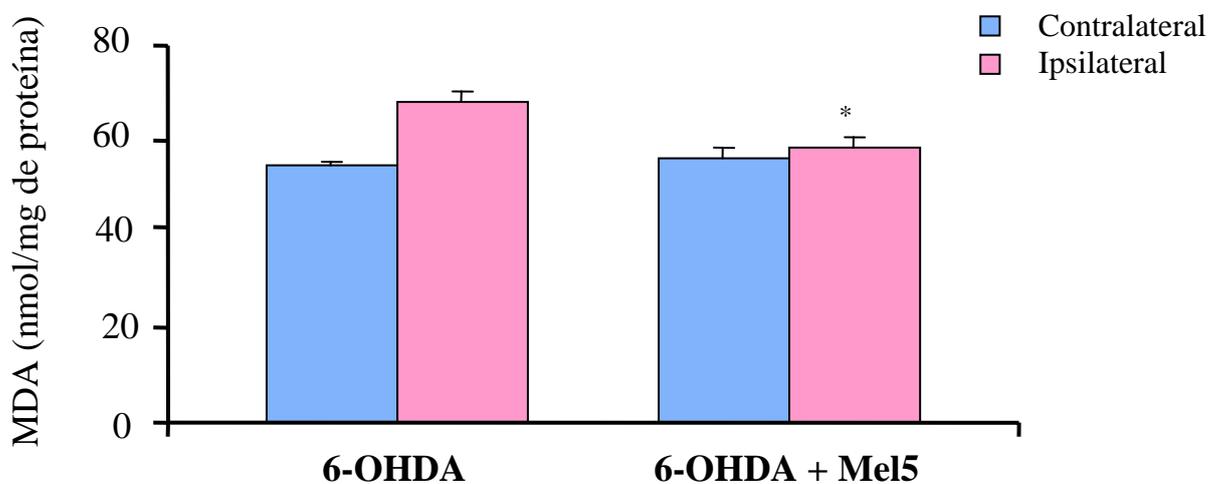


Figura 11- Efeitos da melatonina (5mg/kg, i.p. diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA) na peroxidação lipídica em ratos com lesão estriatal induzida pela 6-OHDA. A peroxidação lipídica foi determinada através do teste de ácido tiobarbitúrico para a quantificação dos níveis de malonildialdeído (MDA) nos homogenatos. Os resultados são expressos como média \pm EPM do número de experimentos (7-10). Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls. * vs controles (6-OHDA) ipsilateral, com $p < 0,05$.

Tabela 3: Efeitos da melatonina nos níveis estriatais de MDA em ratos lesionados com 6-OHDA.

	Níveis de MDA (nmol/mg de proteína)		
	Contralateral (C)	Ipsilateral (I)	I/C (%)
FO	53,81±0,47 (05)	54,25±0,93 (05)	104,3±1,8 (05)
Controle	54,21±1,46 (10)	68,19±1,191 (10)a	126,8±5,3 (10)a
Mel 5	55,87±2,4 (07)	58,5±1,9 (07)b	105,7±5,3 (07)b

A melatonina (5mg/kg, i.p.) foi administrada diariamente durante 7 dias, 1h após a injeção de 6-OHDA no estriado direito. 24 horas após o último dia de tratamento os animais foram sacrificados. A peroxidação lipídica foi determinada através do teste de ácido tiobarbitúrico para a quantificação dos níveis de malonildialdeído (MDA) nos homogenatos. Os resultados são expressos como média±EPM do número de experimentos em parênteses. Foram usados o teste ANOVA e Student-Newman-Keuls como post hoc test. a, b vs FO e controle (6-OHDA) ipsilateral, respectivamente, com $p < 0,05$.

5- DISCUSSÃO

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma neurotoxina utilizada experimentalmente para induzir a doença de Parkinson em animais. Seu mecanismo de ação parece envolver uma degeneração do sistema nigroestriatal e a conseqüente redução dos conteúdos de dopamina no corpo estriado e na substância negra. A 6-OHDA depleta os neurônios catecolaminérgicos através da produção de espécies reativas do oxigênio por reação de oxidação não-enzimática (Zigmond et al., 1989). Existem muitas evidências de que a neurotoxicidade mediada pela 6-OHDA ocorre através do estresse oxidativo, levando à excessiva geração de radicais livres e a morte celular (Rojas et al., 1996; Kumar et al., 1995; Hou et al., 1997); então o dano oxidativo causado pela 6-OHDA pode ser prevenido por uma grande variedade de antioxidantes (Cadet et al., 1989).

No modelo experimental da doença de Parkinson em ratos, as fibras nigroestriatais são destruídas unilateralmente através da injeção estereotáxica de 6-OHDA, e os animais respondem a agonistas dopaminérgicos, incluindo a apomorfina, apresentando rotações contralaterais (no sentido contrário ao da lesão) (Carman et al., 1991; Ungersted, 1971). Por outro lado, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e a conseqüente perda dos seus terminais nervosos no estriado são responsáveis pela maioria dos distúrbios motores vistos na doença de Parkinson (Kim et al., 1998).

A melatonina (N-acetil-metoxi-triptamina), um hormônio secretado pela glândula pineal, age como seqüestrador de radicais livres e antioxidante, e possui a propriedade de atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica penetrando no interior das células e nos compartimentos subcelulares (Skaper et al., 1999; Hardeland et al., 1993). Existem evidências de que a melatonina também possa agir estimulando algumas enzimas antioxidantes importantes, como a superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e a glutathiona redutase e, assim, estabilizando

membranas celulares. Em modelos experimentais utilizados no estudo de doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson, a melatonina se mostrou efetiva na redução do dano neuronal (Reiter et al., 1999).

Vários estudos têm demonstrado as ações antioxidantes da melatonina *in vivo* e *in vitro* (Clapp-Lilly et al., 2001; Raghavendra e Kulkarni, 2001; Antunes et al., 1999; Acuna-Castroviejo et al., 1997; Iacovitti et al., 1997). A melatonina pode reduzir a peroxidação lipídica (Sewerynek et al., 1995; Melchiorri et al., 1995; Reiter, 1995; Daniels et al., 1998; Princ et al., 1998; Reiter et al., 1998; Siu et al., 1999; Karbownik et al., 2001), o dano às proteínas (Tesoriere et al., 1999) e ao DNA (Ortiz et al., 2001; Tan et al., 1994; Tang et al., 1998; Morioka et al., 1999; Vijayalaxmi et al., 1999). Kim et al, 1998 mostraram que o tratamento com melatonina reduz a morte celular de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais em ratos tratados com 6-OHDA, sugerindo que a melatonina possui uma importante ação neuroprotetora.

Para avaliar os efeitos da melatonina no modelo experimental da doença de Parkinson com injeção intraestriatal de 6-OHDA, foram analisados alguns parâmetros: o efeito comportamental motor da lesão nigroestriatal, utilizando-se o teste rotacional e os efeitos bioquímicos da lesão, através do estudo de binding (para verificar os efeitos da melatonina em relação aos receptores dopaminérgicos D1 e D2), das dosagens de monoaminas (para avaliação da função neuronal no local da lesão e do efeito da melatonina na proteção e recuperação celular) e da medida da peroxidação lipídica (dosando malonildialdeído (MDA) como marcador do estresse oxidativo. A melatonina foi analisada nesse modelo em várias doses (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p.) e o protocolo de tratamento principal (protocolo 1) foi administrar melatonina 1 hora após a lesão e depois durante 7 dias consecutivos.

Trabalhos recentes utilizaram o tratamento crônico com a melatonina, durante 4 ou duas semanas consecutivas, para avaliar o seu efeito como

antioxidante (Oxenkrub et al., 2001; Raghavendra e Kulkarni, 2001) ou como modulador do sistema dopaminérgico (Hamdi, 1998). De acordo com esses trabalhos, resolvemos, então, no presente trabalho, modificar o protocolo de tratamento e fazer um grupo submetido à lesão estereotáxica com 6-OHDA tratado com melatonina da mesma forma que o protocolo inicial (protocolo 1), 1 hora após a lesão, e depois, aumentando-se o tempo de tratamento para 14 dias consecutivos (protocolo 2), para avaliar o efeito do tratamento crônico com melatonina neste modelo experimental, utilizando apenas a dose que apresentou o melhor efeito no protocolo 1 (5 mg/kg, i.p.).

Um outro objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do pré-tratamento com melatonina durante sete dias antes da injeção estereotáxica de 6-OHDA seguido da continuação deste tratamento por mais sete dias, após a lesão, utilizando apenas a dose que apresentou o melhor efeito no protocolo 1 (5 mg/kg, i.p.) (protocolo 3). Muitos trabalhos utilizam o pré-tratamento para avaliar os efeitos da melatonina como antioxidante (Herrera et al., 2001; Lin, 2001; Othman et al., 2001; Wakatsuki e Okatani, 2000) e neuroprotetor (Wakatsuki et al., 2001; Imam et al., 2001; Lapin et al., 1998; Itzhak et al., 1998). O objetivo deste novo protocolo experimental foi avaliar se, o pré-tratamento com a melatonina iria proteger de uma maneira mais eficaz o tecido cerebral dos danos oxidativos mediados pela injeção de 6-OHDA.

As indolaminas em geral são conhecidas por influenciar os processos de oxidação biológica (Bachurin et al., 1999; Noda et al., 1999; Wolfler et al., 1999; Karbownik et al., 2001; Calvo et al., 2001), uma delas, a N-acetilserotonina (NAS) tem sido relatada na literatura como um antioxidante (Longoni et al., 1997; Lezoualc'h et al., 1998; Siu et al., 1999; Reiter et al., 1999; Oxenkrub et al., 2001; Garcia et al., 2001; Siu et al., 2001). Ela possui a capacidade de atravessar as membranas (Menendez-Pelaez et al., 1993; Shida et al., 1994) assim como a melatonina e, em alguns estudos, tem se mostrado até mais potente, como antioxidante, do que a melatonina (Wolfler et al., 1999).

Em soro humano a N-acetilserotonina está presente em concentrações nanomolares (Wolfler et al., 1999), que são cerca de 10-100 vezes mais altas do que as concentrações de melatonina e, em vários tecidos, as concentrações de N-acetilserotonina também são maiores.

A N-acetilserotonina tem despertado interesse por causa do seu duplo papel na via metabólica da melatonina, como seu precursor e também como possível produto de transformação da melatonina (Bachurin et al., 1999). Existem evidências de que haja uma via metabólica específica (via O-desmetilase) que pode converter a melatonina de volta à NAS em vários tecidos de mamíferos (incluindo no homem), cerca de 30% da melatonina é desmetilada de volta à N-acetilserotonina (Leone e Silman 1984). Duell et al, 1998, sugerem que o efeito antioxidante da melatonina, em concentrações acima dos níveis fisiológicos, pode ser atribuída à N-acetilserotonina formada a partir desta.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a N-acetilserotonina pode ser considerada como um hormônio, uma indolamina endógena com as suas próprias ações fisiológicas (Allen et al., 1991; Yu et al., 1981; Pang et al., 1980; Barsacchi et al., 1998). Outros trabalhos sugerem que os efeitos da N-acetilserotonina ocorrem independentes da melatonina como, por exemplo, facilitando a memória (Prakhie e Oxenkrug, 1998; Bachurin et al., 1999), estabilizando membranas (Garcia et al., 2001), causando hipotermia (Morton, 1987), analgesia (Psarakis et al., 1988), como antihipertensivo (Oxenkrug, 1998 e 1999), antidepressivo (Prakhie e Oxenkrug 1998) e antioxidante (Bachurin et al., 1999; Wofler et al., 1999; Siu et al., 1999; Lezoualch et al., 1998; Reiter et al., 1999; Oxenkrug et al., 2001).

As ações da N-acetilserotonina e de outros indoles ainda estão sendo estudadas. Pouco se sabe sobre os efeitos da N-acetilserotonina *in vivo*. Muitos estudos relatam uma melhor atividade da N-acetilserotonina em relação a melatonina em algumas situações por exemplo, estabilizando membranas (Garcia

et al., 1997; Garcia et al., 2001), como neuroprotetor (Bachurin et al., 1999; Wolfler et al., 1999) ou como antioxidante (Wolfler et al., 1999). Entretanto, sabe-se que, em condições *in vivo*, a N-acetilserotonina é rapidamente metilada em melatonina (Oxenkrug e Requintina, 1994), podendo limitar o seu efeito.

Com base nesses estudos e no fato de que a N-acetilserotonina possui propriedades biológicas semelhantes à melatonina, resolveu-se verificar a ação da N-acetilserotonina no modelo de Parkinson com injeção estereotáxica de 6-OHDA, avaliando a sua interação com o sistema dopaminérgico nos ensaios de "binding" e no comportamento rotacional.

5.1 – Estudos Comportamentais

A injeção estereotáxica de 6-OHDA causa uma intensa destruição dos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e dos seus terminais no estriado (Ben-Shachar et al., 1991), resultando em uma disfunção motora característica. Essa destruição pode ser demonstrada através do tratamento com um agonista dopaminérgico, a apomorfina, a qual induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral) (Labandeira-Garcia et al., 1996).

Os nossos resultados mostraram que a administração intrastriatal de 6-OHDA produziu um número de rotações induzidas pela apomorfina em torno de 150 rotações/hora que foram significativamente diminuídas com o tratamento com melatonina, no protocolo 1, de maneira dose-dependente (cerca de 60, 89, 78 e 47% nas doses de 2, 5, 10 e 25 mg/kg,i.p., respectivamente) sugerindo um aumento nos níveis de dopamina no estriado lesionado e uma redução na supersensibilidade do receptor. Esses resultados foram consistentes com a dosagem dos níveis de dopamina, os quais foram parcialmente recuperados no lado ipsilateral dos grupos tratados com melatonina.

A curva de dose-resposta da melatonina se apresentou na forma de sino ("bell-shaped"), onde a dose que apresentou o melhor efeito foi a de 5 mg/kg (cerca de 16 rotações/hora), e esse efeito diminuiu com a dose mais baixa (2 mg/kg, cerca de 60 rotações/hora) e com a dose mais alta (25 mg/kg, cerca de 81 rotações/hora). Outros autores, Vlkolinský et al., 1999 observaram uma característica similar para a melatonina frente às alterações comportamentais induzidas pela apomorfina em animais lesionados com 6-OHDA.

O tratamento crônico com melatonina, durante 14 dias consecutivos, na dose de 5 mg/kg (protocolo 2), promoveu uma diminuição do número de rotações em cerca de 96% quando comparado ao grupo controle, ou seja, ainda maior do que aquele obtido com o tratamento na mesma dose durante 7 dias (protocolo 1) que foi de 89%, mostrando que a capacidade da melatonina de impedir a progressão da lesão depende da dose utilizada e o tempo de tratamento, nesse caso o tratamento prolongado por mais 7 dias além do protocolo inicial (protocolo 1), obteve maior êxito na recuperação ou proteção da lesão mediada pela melatonina. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por outros pesquisadores que demonstraram a importância do tempo de tratamento com a melatonina (Oxenkrub et al., 2001; Raghavendra e Kulkarni, 2001).

Os resultados obtidos com o protocolo 3 (pré-tratamento) foram semelhantes aqueles obtidos com o protocolo 1, ambos promoveram uma diminuição do número de rotações em cerca de 86 e 89%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle, mostrando que, nesse caso, o pré-tratamento não alterou os efeitos mediados pela melatonina, não promovendo uma proteção prévia à lesão induzida pela 6-OHDA.

Essa diferença dos efeitos da melatonina na mesma dose, variando-se apenas o tempo de tratamento pode ocorrer devido ao tipo de lesão mediada pela 6-OHDA, que é via geração de radicais livres e, portanto, é uma lesão caracterizada como tardia (demora para acontecer) e progressiva, mantendo o seu padrão por até 12 semanas, quando mecanismos compensatórios começam a

intervir modificando o padrão da lesão. A melatonina agindo por mais tempo poderia reverter a lesão e inibir a sua evolução, promovendo uma recuperação maior quando comparada com o tratamento por um período de tempo mais curto.

No tratamento com a N-acetilserotonina os resultados obtidos mostram que houve uma diminuição do número de rotações induzidas pela apomorfina semelhante ao grupo tratado com melatonina na mesma dose (5mg/kg), sugerindo um aumento nos níveis de dopamina no estriado lesionado e uma redução na supersensibilidade do receptor. Os efeitos mediados pela N-acetilserotonina são de um modo geral semelhantes aos da melatonina, por ser o seu precursor e também uma indolamina, como foi mencionado anteriormente. As diferenças nos efeitos podem estar na eficácia como antioxidante que pode ser maior com a N-acetilserotonina, a qual não foi encontrada nenhuma ação próoxidante.

5.2 – Estudos Bioquímicos

5.2.1 – Ensaio de *Binding*

O presente trabalho demonstrou que a melatonina aumentou significativamente o número de receptores D1, indicando um fenômeno do tipo "upregulation", e aumentou, com magnitude similar, a afinidade do receptor D1. Existem muitas evidências de que os efeitos da melatonina podem envolver a modulação do sistema dopaminérgico (Miles, 1989; Burton et al., 1991), além disso, tem sido demonstrado que a melatonina pode ser clinicamente efetiva na doença de Parkinson e no parkinsonismo induzido por neurolépticos, sugerindo uma interação com o sistema dopaminérgico.

Estudos sugerem que o receptor dopaminérgico do subtipo D2 desempenha um importante papel em várias doenças neurológicas como as

doenças de Alzheimer e Parkinson, e está envolvido com comportamentos psicomotores dopaminérgicos incluindo rotação e locomoção (Shinkai et al, 1997).

Hamdi (1998) mostrou que a afinidade (K_d), mas não o número (B_{max}) dos receptores dopaminérgicos D2, em estriado de ratos foram alterados com o tratamento com a melatonina. O autor postulou que a melatonina aumenta a afinidade dos receptores dopaminérgicos D2 através de mudanças conformacionais no sítio de ligação do receptor. Essa observação pode representar um mecanismo através do qual a melatonina exerce uma influência modulatória no sistema dopaminérgico.

Escames et al., (1996), relataram que a iontoforese da melatonina atenuou a resposta excitatória em neurônios estriatais enquanto a dos antagonistas D2 produziram um aumento da resposta excitatória. Esses resultados mostraram que os mesmos neurônios estriatais podem ser modulados pela melatonina e por antagonistas D2, embora, de acordo com esses autores, os efeitos desses dois compostos sejam mediados por diferentes mensageiros intracelulares. Outro trabalho (Naitoh et al., 1998), indicou que o receptor dopaminérgico D1 foi afetado nos ratos em estado fetal e neonatal quando a mãe foi previamente pinealectomizada.

O efeito da N-acetilserotonina na densidade dos receptores dopaminérgicos também foi semelhante ao grupo tratado com melatonina, exceto o número de receptores D1 que foi aumentado com o tratamento com melatonina e não sofreu nenhuma alteração com a N-acetilserotonina, entretanto, a afinidade dos receptores D1 e D2 foram aumentadas, e em relação a este último. O aumento foi significativamente maior até mesmo em relação ao grupo tratado com a melatonina. Estes resultados sugerem que a N-acetilserotonina (NAS) pode exercer uma ação modulatória no sistema dopaminérgico da mesma forma que a melatonina.

5.2.2 – Dosagens de Monoaminas

No presente trabalho, foi demonstrado que a 6-OHDA induziu a uma diminuição significativa nos níveis de DA, DOPAC e HVA quando medidos no lado ipsilateral comparando com o lado contralateral do mesmo animal. Foi também demonstrado que os níveis de 5HT diminuem, mas os níveis do seu metabólito, o 5HIAA não sofreram alterações significativas. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores que descreveram as mudanças bioquímicas no estriado degenerado após a injeção intracerebral com 6-OHDA (Zigmond et al., 1989; Ichitani et al., 1994), a qual diminui a função dopaminérgica e os níveis de dopamina.

Embora muitos trabalhos (Luthman et al., 1994; Molina-Holgado et al., 1993; Alexiuk et al., 1991) na literatura tenham verificado uma diminuição significativa dos níveis de 5HT e 5HIAA em estriado de ratos após lesão com 6-OHDA, muitos utilizaram animais com três dias de vida e não ratos adultos, como no nosso trabalho; outros (Breese et al., 1984), mostraram um aumento e nenhuma mudança nos conteúdos de 5HT e 5HIAA utilizando ratos neonatos e ratos adultos, respectivamente. Em adição, Zhou et al., 1991 mostraram um aumento significativo nos níveis de 5HT e 5HIAA em estriado de ratos adultos, embora, nesse caso, a diminuição dos níveis de DA no estriado tenha excedido 90% enquanto no nosso trabalho foi de cerca de 80%.

O presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Karstaedit et al., 1994. Estes pesquisadores mostraram que seis semanas após a lesão com 6-OHDA, os níveis de 5HT e 5HIAA foram significativamente diminuídos em estriado de ratos; segundo estes autores a perda da inervação dopaminérgica no estriado leva a um aumento do "turnover" da 5HT e uma depleção completa da 5HT no estriado.

Os nossos resultados mostraram que a melatonina restaurou parcialmente os conteúdos das monoaminas e seus metabólitos em ratos lesionados com 6-OHDA quando administrada 1 hora após a lesão e depois diariamente durante 7 dias. Kim et al., 1998 mostraram que o tratamento com melatonina diminui a morte neuronal de neurônios nigroestriatais dopaminérgicos em ratos tratados com 6-OHDA, sugerindo que este efeito pode ser consequência da potente ação antioxidante da melatonina. No presente trabalho, embora a porcentagem de diminuição (comparando o lado ipsilateral com o contralateral) tenha sido similar com as três menores doses de melatonina, elas foram muito mais baixas do que aquela detectada nos controles (ratos lesionados com 6-OHDA sem tratamento com melatonina), embora a porcentagem de diminuição tenha sido maior com as doses mais altas de melatonina, conferindo ao resultado uma curva de dose-resposta na a forma de sino ("bell-shaped").

Alguns autores (Willis e Armstrong, 1999) sugerem que embora existam muitas evidências dos efeitos antioxidantes e neuroprotetores da melatonina, ela pode, em alguns casos, aumentar a produção de radicais livres. A melatonina pode aumentar os níveis de amins no cérebro (Wendel et al., 1974) que consequentemente podem gerar o estresse oxidativo causando destruição celular. Além disso a melatonina, assim como outras amins, desempenham um importante papel na formação da neuromelanina e de outros produtos neurotóxicos que podem contribuir para aumentar a degeneração neuronal já existente em pacientes portadores da doença de Parkinson (Willis e Armstrong, 1999).

Willis e Armstrong (1999), afirmam ainda que a secreção da melatonina endógena durante a noite aumenta a síntese e a liberação de neurotransmissores dos neurônios em degeneração, e isto pode aumentar o estresse oxidativo que já está progredindo como resultado da degeneração causada pela doença de Parkinson e este processo pode ser ainda mais exacerbado com o estresse

oxidativo mediado pela terapia de reposição de dopamina. Esses autores sugerem que uma diminuição nos níveis de melatonina endógena podem contribuir para tratar a doença de Parkinson experimental.

A melatonina, assim como outros antioxidantes (ex.: ácido ascórbico), pode apresentar uma ação pró-oxidante em algumas situações, dependendo da dose empregada; as altas doses propiciam o aparecimento desse efeito. Wolfler et al, 2001, demonstraram esse efeito pró-oxidante da melatonina, e sugeriram que esse efeito pode ser específico para a melatonina, não se estendendo a outras indolaminas, já que não foi observado tal efeito utilizando-se a N-acetilserotonina, seu precursor.

Outros pesquisadores (Osseni et al., 2000) observaram as ações pró-oxidantes e antioxidantes da melatonina *in vitro*, utilizando células hepáticas humanas para avaliar a citotoxicidade da melatonina através da análise dos seus efeitos em vários parâmetros celulares: a viabilidade celular, a redução dos níveis intracelulares da glutathiona reduzida (GSH) e a produção espécies reativas do oxigênio (ERO), após incubação destas células com concentrações crescentes de melatonina (0,1-10,000 μM). Esse trabalho sugere que ocorre citotoxicidade *in vitro* mediada pela melatonina, cujo mecanismo está associado a estimulação da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e da diminuição dos níveis intracelulares da glutathiona reduzida (GSH). Eles concluem que os resultados obtidos mostram um efeito dual da melatonina, dependendo da concentração e do tempo de incubação.

De acordo com os resultados obtidos, o efeito do tratamento crônico com a melatonina na dose em que foi obtido o melhor resultado no protocolo inicial (5 mg/kg, i.p.) foi ainda melhor quando este foi ampliado para 14 dias de tratamento. A recuperação dos níveis das monoaminas e dos seus metabólitos mostradas nas figuras 7 e 8 foi maior do que aquela obtida com a mesma dose com tratamento por apenas 7 dias (figuras 5 e 6) e a diminuição do número de rotações induzidas por apomorfina também foi maior (figuras 1 e 2). Esses

parâmetros foram recuperados à níveis bem próximos aos do grupo falso operado, mostrando que com o aumento na duração do tratamento a melatonina pode reverter ainda mais os efeitos lesivos da 6-OHDA, talvez por permanecer mais tempo no organismo exercendo os seus efeitos como por exemplo, promovendo um aumento da capacidade antioxidante do cérebro, aumentando os níveis das enzimas antioxidantes endógenas (Oxenkrub et al., 2001) ou agindo como antioxidante direto (Imam et al., 2001; Herrera et al., 2001; Mohanan e Yamamoto, 2001; Yamamoto e Mohanan, 2001), inibindo a peroxidação lipídica e a geração de radicais livres mediada pela neurotoxina.

Os resultados obtidos mostraram que o efeito da melatonina no pré-tratamento foi semelhante àquele obtido com a mesma dose (5 mg/kg, i.p.) no protocolo inicial (tratamento com melatonina 1 hora após a lesão, e depois durante 7 dias), não tendo sido verificada, portanto, nenhuma melhora do efeito por causa da exposição prévia à melatonina. Estes resultados obtidos com as mudanças no protocolo sugerem que talvez o aumento no tempo de tratamento seja mais eficaz para melhorar o efeito final do que o pré-tratamento no que se refere à proteção contra os danos teciduais mediados pela 6-OHDA.

5.2.3 – Dosagem de MDA

O presente trabalho demonstrou que a administração intraestriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) produz dano oxidativo no estriado lesionado, que foi confirmado por uma elevação do produto da peroxidação lipídica, o malonildialdeído (MDA), observado nos animais do grupo controle (6-OHDA). O dano oxidativo no estriado pode ser prevenido através do tratamento com a melatonina, como determinado pela restauração dos níveis de MDA à níveis normais no grupo tratado com melatonina, sugerindo uma possível ação antioxidativa e neuroprotetora da melatonina.

As propriedades antioxidantes e neuroprotetoras da melatonina podem contribuir para a recuperação bioquímica, vista no estriado lesionado com 6-OHDA nos animais tratados, evidenciada pela restauração dos níveis de monoaminas e uma recuperação motora observada no teste rotacional.

Muitos estudos tem sugerido o envolvimento de espécies reativas do oxigênio ou radicais livres em várias doenças neurodegenerativas (Touitou, 2001; Reiter, 1995; Reiter, 1998; Raghavendra et al., 2001). Estes estudos também corroboram com a hipótese de que o estresse oxidativo pode estar implicado na patogênese da doença de Parkinson (Joo et al., 1998). Paralelamente, um grande número de trabalhos tem demonstrado que a neurotoxicidade da 6-OHDA é mediada pelo estresse oxidativo, levando a formação de radicais livres e, conseqüentemente, à morte celular no modelo animal da doença de Parkinson (Joo et al., 1998; Rojas et al., 1996; Ben-Shachar et al., 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com estes estudos, mostrando um aumento significativo nos níveis de malonildialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, como um índice de estresse oxidativo, no estriado lesionado com injeção intraestriatal de 6-OHDA. A demonstração de que a 6-OHDA induz o aumento nos níveis de MDA e este retorna aos níveis normais com o tratamento com melatonina também sugerem uma ação antioxidativa para a melatonina, possivelmente através da inativação de radicais livres (Joo et al., 1998).

A destruição dos neurônios dopaminérgicos em humanos está associada com doenças relacionadas com a idade, por exemplo a doença de Parkinson. Existem muitas evidências indicando que a destruição dos neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson envolve o acúmulo de radicais livres do oxigênio (Reiter, 1999). Baseado nessas observações, os resultados deste trabalho corroboram com a hipótese de que a melatonina pode ter efeitos

benéficos na terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, que são causadas pelo estresse oxidativo.

Este trabalho mostrou que a melatonina foi capaz de diminuir a morte de neurônios dopaminérgicos no modelo de lesão estriatal induzida pela 6-OHDA associada com o estresse oxidativo. Essa demonstração dos efeitos da melatonina como antioxidante e neuroprotetor corrobora com muitas outras na literatura científica, como já foi mencionado, mas embora os resultados obtidos se somem a muitos outros, para tentar provar esses efeitos benéficos da melatonina, eles ainda são contraditórios em alguns momentos, visto que a própria melatonina pode agir como pró-oxidante e, em algumas situações, promover citotoxicidade. Portanto, o uso terapêutico da melatonina em algumas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, ainda deve ser exaustivamente estudado até que se defina de maneira segura, a sua eficácia e a sua utilidade no tratamento.

Muitos outros efeitos benéficos da melatonina estão sendo estudados, mas até o momento o uso terapêutico da melatonina está restrito a algumas situações, como por exemplo no caso do *jet lag*. A melatonina é largamente utilizada como suplemento alimentar, embora poucas informações sobre os seus efeitos tóxicos agudos e crônicos, em animais ou em humanos, estejam disponíveis na literatura. A deficiência de informações sobre o uso seguro da melatonina, especialmente no tratamento por um longo período de tempo e sem nenhum controle, requer uma investigação mais detalhada desse composto.

6 – CONCLUSÕES

- ✓ A injeção intraestriatal de 6-OHDA causou destruição celular e déficit motor evidenciado pelo comportamento rotacional induzido pela apomorfina. O tratamento com melatonina, no protocolo 1 (Tratamento com melatonina durante 7 dias, iniciando 1 hora após a lesão), promoveu uma diminuição do número de rotações de maneira dose-dependente, onde a dose que apresentou o melhor efeito foi a de 5 mg/kg. A melatonina produziu uma recuperação da lesão, provavelmente, aumentando os níveis de dopamina no estriado lesionado e reduzindo a supersensibilidade do receptor dopaminérgico.
- ✓ O grupo submetido ao tratamento crônico com melatonina (protocolo 2 - tratamento com melatonina durante 14 dias, iniciando 1 hora após a lesão) apresentou uma diminuição ainda maior do número de rotações quando comparado aos controles, mostrando a importância do tempo de tratamento. Nesse caso, o tratamento durante 14 dias promoveu uma recuperação da lesão maior do que aquela apresentada com a mesma dose tratando-se apenas durante 7 dias. Isto ocorre provavelmente porque a lesão com 6-OHDA é uma lesão progressiva e lenta, e o tratamento crônico mantém os níveis de melatonina por mais tempo, inibindo a evolução da lesão.
- ✓ O pré-tratamento com melatonina (durante 7 dias antes da lesão e depois por mais 7 dias, na dose 5 mg/kg, i.p.-protocolo 3) apresentou um resultado semelhante aquele observado no protocolo 1 (tratamento com melatonina durante 7 dias, iniciando 1 hora após a lesão), mostrando que neste caso o efeito protetor da melatonina administrada antes da lesão (7 dias antes) não é significativo, sendo mais importante o tempo de tratamento após a lesão.
- ✓ Os níveis de monoaminas e dos seus metabólitos diminuíram significativamente (77-85 %) no estriado lesionado dos animais controle (submetidos à lesão com 6-OHDA e tratados com salina) e esses níveis foram

recuperados em até 60% (de maneira dose-dependente) nos animais lesionados e tratados com melatonina, no protocolo 1 (Tratamento com melatonina durante 7 dias, iniciando 1 hora após a lesão). O melhor efeito foi observado com a dose de 5 mg/kg. A curva dose-resposta, nesse caso, se apresentou na forma de sino, mostrando que o aumento do efeito não está diretamente relacionado ao aumento da dose.

- ✓ O grupo submetido ao protocolo 2 (tratamento com melatonina durante 14 dias, iniciando 1 hora após a lesão), assim como ocorreu no comportamento rotacional, apresentou o melhor efeito, com recuperação dos níveis de monaminas em até cerca de 80%. O grupo submetido ao protocolo 3 (pré-tratamento com melatonina durante 7 dias antes da lesão e depois por mais 7 dias, na dose 5 mg/kg, i.p) mostrou uma recuperação em cerca de 60%, semelhante ao observado no tratamento com o protocolo 1 (tratamento com melatonina durante 7 dias, iniciando 1 hora após a lesão).
- ✓ O tratamento com N-acetilserotonina promoveu uma diminuição do número de rotações induzidas pela apomorfina semelhante ao grupo tratado com melatonina na mesma dose (5mg/kg, i.p.), sugerindo uma ação semelhante a melatonina, provavelmente também através do aumento dos níveis de dopamina no estriado lesionado e redução da supersensibilidade do receptor.
- ✓ Nos ensaios de *Binding* verificou-se que a melatonina aumentou significativamente o número de receptores D1, indicando um fenômeno de “upregulation”, e aumentou, com magnitude similar a afinidade deste receptor, sugerindo uma possível ação modulatória da melatonina no sistema dopaminérgico.
- ✓ A N-acetilserotonina apresentou uma ação sobre os receptores dopaminérgicos semelhante àquela observada com a melatonina. Embora não tenha ocorrido nenhum aumento do número de receptores D1, como ocorreu

com a melatonina, a afinidade dos receptores D1 e D2 foram aumentadas com o tratamento com N-acetilserotonina, sugerindo que esta pode exercer também uma ação modulatória no sistema dopaminérgico.

- ✓ A injeção estereotáxica de 6-OHDA promoveu um aumento significativo nos níveis de malonildialdeído (MDA), no estriado lesionado, e o tratamento com melatonina induziu uma diminuição desses níveis à valores próximos aos normais, sugerindo uma possível ação neuroprotetora e antioxidativa da melatonina, possivelmente através da inativação de radicais livres. Essa ação parece depender da dose utilizada e do tempo de tratamento.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNA-CASTROVIEJO D., COTO-MONTES A., MONTI M.G., ORTIZ G.G., REITER R.J. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. **Life Sci.**, v. 60, p. 23-29, 1997 .

ACUNA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; MACÍAS, M.; MUNÓZ HOYOS, A.; MOLINA CARBALLO, A.; ARAUZO, M.; MONTES, R.; VIVE, F. Cell protective role of melatonin in the brain. **J. Pineal Res.**, v. 19, p. 57-66, 1995.

ALEXANDER, A.M.; PETERS, J.A. Trends in Pharmacological Sciences, including Toxicological Sciences, Twelfth Edition, **Nomenclature Supplement**, 2001.

ALEXIUK, N.A.; VRIEND, J. Effects of daily afternoon melatonin administration on monoamine accumulation in median eminence and striatum of ovariectomized hamsters receiving pargyline. **Neuroendocrinology**, v. 54, p. 55-61, 1991.

ALLEN, A.E.; PANG, S.F.; NIR, I. The effect of environmental photoperiodicity on indole rhythms and locomotor activity in sighted and eye covered chickens. **J. Neural. Transm.**, v. 83, p. 107-119, 1991.

ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ, C.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; URIA, H.; KOTLER, M.L.; RODRIGUEZ-COLUNGA, M.S.; TOLOVIA, D.; MENENDEZ-PELAEZ, A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **FASEB J.** v. 10, p.882-890, 1996.

ANTÓN-TAY, F. Melatonin: effects on brain function. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.**, v. 11, p. 315-324, 1974.

ANTUNES, F.; BARCLAY, L.R.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.

ARMSTRONG, S.M.; REDMAN, J.R. Melatonin and circadian rhythmicity. Yu, H.S. and Reiter, R.J. In: Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications. **CRC Press**, p. 187-224, 1993.

BACHURIN, S.; OXENKRUG, G.; LERMONTOVA, N.; AFANASIEV, A.; BEZNOSKO, B.; VANKIN, G.; SHEVTZOVA, E.; MUKHINA, T.; SERKOVA, T. N-acetylserotonin, melatonin and their derivatives improve cognition and protect against β -amyloid-induced neurotoxicity. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 890, p. 155-166, 1999.

BALER, R.; COON, S.; KLEIN, D.C. Orphan nuclear receptor RZR β : Cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 220, p. 975-978, 1996.

BARLOW-WALDEN, L.R.; REITER, R.J.; ABE, M. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem. Int.**, v. 26, p. 497-510, 1995.

BARSACCHI, R.; KUSMIC, C.; DAMIANI, E.; CARLONI, P.; GRECI, L.; DONATO, L. Vitamin E consumption induced by oxidative stress in red blood cells is enhanced by melatonin and reduced by N-acetylserotonin. **Free Radical Biol. Med.**, v. 24, p. 1187-1192, 1998.

BENITEZ-KING, G.; ANTÓN-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. **Experimentia**, v. 49, p. 635-641, 1993.

BENITEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. **Life Sci.** v. 53, p. 201-207, 1993.

BENITEZ-KING, G.; HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. **Brain Res.** v. 557, p. 289-292, 1991.

BENITEZ-KING, G.; RIOS, A.; MARTINEZ, A.; ANTÓN-TAY, F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1290, p. 191-196, 1996.

BEN-SHACHAR, D.; ESHEL, G.; FINBERG, J.P.; YODIM, M.B. The iron chelator desferrioxamine (desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 1441-1444, 1991.

BERESFORD, I.J.M.; NORTH, P.C.; OAKLEY, N.R.; STARKEY, S.; BROWN, J.; FOORD, S.M.; ANDREWS, J.; COUGHLAN, J.; STRATTON, S.; DUBOCOVICH, M.L.; HAGAN, R.M. GR 196429: A nonindolic agonist at high-affinity melatonin receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 285, p. 1239-1245, 1998.

BETTAHI, I.; POZO, D.; OSUNA, C. Melatonin reduces nitric oxide synthase in rat hypothalamus. **J. Pineal Res.**, v. 20, p. 205-211, 1996.

BEYER, C.E.; STEKETEE, J.D.; SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. **Biochemical Pharmacology**, v.56, p. 1265-1272, 1998.

BREESE, G.R.; BAUMEISTER, A.A.; MACOWN, T.J.; EMERICK, S.G.; FRYE, G.D.; CROTTY, K.; MUELLER, R.A. Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. **J Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 231, p. 343-54, 1984.

BURKE, D.C. Planning a system of care for head injuries. **Brain Inj.**, v. 1, p. 189-198, 1987.

BURTON, S.; DAYA, S.; POTGIETER, B. Melatonin modulates apomorphine-induced rotational behaviour. **Experimentia** , v. 47, p. 466-469, 1991.

CADET, J.L.; KATZ, M.; JACKSON-LEWIS, V. and FAHN, S. Vitamin E attenuates the toxic effects of nigrostriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. **Brain Res.**, v. 476, p. 10-15, 1989.

CAGNACCI, A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 200-213, 1996.

CAGNACCI, A.; ELLIOTT, J. A. and YEN, S.S.C. Amplification of pulsatile LH secretion by exogenous melatonin in women., **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, p. 210-212, 1991.

CAGNACCI, A.; VOLPE, A. Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 19, p. 382-411, 1996.

CALVO, J.R.; REITER, R.J.; GARCIA, J.J.; ORTIZ, G.G.; TAN, D.X.; KARBOWNIK, M. Characterization of the protective effects of melatonin and related indoles against alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury in rats. **J. Cell Biochem.**, v. 80, p. 461-470, 2001.

CARDINALI, D.P.; VACAS, N.I.; BOYER, E.E. Specific binding of melatonin in bovine brain. **Endocrinology**, v. 105, p. 437-441, 1979.

CARLBERG, C.; WIESENBERG, I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 171-178, 1995.

CARMAN, L.S.; GAGE, F.H.; SHULTS, C.W. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. **Brain Res.**, v. 553, p. 275-283, 1991.

CHAN, T.Y.; TANG, P.L. Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 20, p. 187-191, 1996.

CLAPP-LILLY, K.L.; SMITH, M.A.; PERRY, G.; HARRIS, P.L.; ZHU, X.; DUFFY, L.K. Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 12, p. 1277-1280, 2001.

COHEN, M.; ROSELLI, D.; CHABNER, B. Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. **Nature**, v. 274, p. 894-895, 1978.

CONN, M.P. **Neuroscience in Medicine**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 1994.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, 6th ed. New York: Oxford University Press. 1991.

COSTA, E.J.X.; LOPES, R.; LAMY-FREUND, M.T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 19, p. 123-127, 1995.

CSABA, G.; TOROK, O.; FISCHER, J. Immunological competence of newborn and adult rat thymus and spleen after explanation in tissue culture. **Acta Biol. Acad. Sci. Hung.**, v. 16, p. 161-168, 1965.

DANIELS, W.M.U.; VAN RENSGURG, S.J.; VAN ZYL, J.M.; TALJAARD, J.J.F. Melatonin prevents β -amyloid-induced lipid peroxidation. **J. Pineal Res.** v. 24, p. 78-82, 1998.

DANIELS, W.M.W.; REITER, R.J.; MELCHIORRI, D. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6-phosphatase. **J. Pineal Res.**, v. 19, p. 1-09, 1995.

DEMIRYUREK, A.T.; CAKICI, I.; KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. **Parmacol. Toxicol.**, v. 82, n. 3, p. 113-117, 1998.

DUBOCOVICH, M.L. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, p. 50-56, 1995.

DUBOCOVICH, M.L.; CARDINALI, D.P.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; HAGAN, R.M.; KRAUSE, D.N.; SUGDEN, D.; VANHOUTTE, P.M.; YOCCA, F.D. Melatonin receptors. **The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification.** IUPHAR Media, London, p. 187-193, 1998.

DUBOCOVICH, M.L.; MASANA, M.I.; BENLOUCIF, S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. **Melatonin after Four Decades.** Ed James Olcese, New York, p. 181-190, 2000.

DUBOCOVICH, M.L.; MASANA, M.I.; IACOB, S.; SAURI, D.M. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit

retina ML1 presynaptic heteroreceptor. **Naunyn Schmiederbergs' Arch Pharmacol.**, v. 355, p. 365-375, 1997.

DUBOCOVICH, M.L.; YUN, K.; AL-GHOUL, W.; BENLOUCIF, S.; MASANA, M.I. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **FASEB**, v. 12, p. 1211-1220, 1998.

DUELL, P.B.; WHEATON, D.L.; SHULTZ, A.; NGUYEN, H. Inhibition of LDL oxidation by melatonin requires supraphysiologic concentrations. **Clin. Chem.**, v. 44, p. 1931-1936, 1998.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, n. 4/5, p. 221-357, 1998.

EISON, A.S.; MULLINS, U.L. Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. **Life Sci.**, v. 53, p. 393-398, 1993.

ESCAMES, G.; ACUNA CASTROVIEJO, D.; VIVES, F. Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. **Neuroreport**, v. 7, p. 597-600, 1996.

ESCAMES, G.; ARAUZO, M.; ACUNA, D.; VIVES, F. Electrophysiological study on the interaction of melatonin and dopamine in the striatal projection area of motor cortex. **Eur. J. Neurosci. Suppl.**, v. 7, p. 101, 1994.

FAHN, S.; COHEN, G. The oxidative stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. **Ann. Neurol.**, v. 32, p. 804-812, 1992.

FELIG, P.; BAXTER, J.D.; BROADUS, A.E.; FROHMAN, L.A. Endocrinology and metabolism. **McGraw-Hill, New York**, 1987.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIEDLER, E.P.; MARKS, M.J.; COLLINS, A.C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 983-990, 1987.

FILICORI, M.; SANTORO, N.; MERRIAM, G.R.; CROWLEY, W.F. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotrophin secretion throughout the human menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 62, p. 1136-1144, 1986.

FLOREANI, M.; SKAPER, S.D.; FACCI, L.; LIPARTITI, M.; GIUSTI, P. Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. **FASEB J.**, v. 11, p. 1309-1315, 1997.

FOULKES, N.S.; SASSONE-CORSE, P. Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. **Biochem. Biophys. Acta**, p. 101-121, 1996.

FOULKES, N.S.; WHITMORE, D.; SASSONE-CORSI, P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **Biology of the Cell**, v. 89, p. 487-494, 1997a.

FOULKES, N.S.; BORJIGIN, J.; SNYDER, S.H.; SASSONE-CORSI, P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 487-492, 1997b.

FOULKES, N.S.; BORJIGIN, J.; SNYDER, S.H.; SASSONE-CORSI, P. Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.93, p. 14140-14145, 1996a.

FOULKES, N.S.; DUVAL, G.; SASSONE-CORSI, P. Adaptive inducibility of CREM as a transcriptional memory of circadian rhythms. **Nature**, v. 381, p. 83-85, 1996b.

FRASCHINI, F.; DERMARTINI, G.; ESPOSTI, D.; SCAGLIONE, F. Melatonin involvement in immunity and cancer. **Biol. Signals Recept.**, v. 7, p. 61-72, 1998.

GARCÍA, J.J.; REITER, R.J.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J.R.; ORTIZ, G.G.; TAN, D.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation. **European J. of Pharmacol.**, v. 428, p. 169-175, 2001.

GARCIA, J.J.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Lett.**, 408, p. 297-301, 1997.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B. A.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. **Biomed & Pharmacother.**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GILAD, E.; CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. **Life Sci.**, v. 60, p. 169-174, 1997.

GIORDANO, M.; VERMEULEN, M.; PALERMO, M.S. Seasonal variation in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin. **FASEB J.**, v. 7, p. 1052-1054, 1993.

GIUSTI, P.; LIPARTITI, M.; FRANCESCHINI, D.; SCHIAYO, N.; FLOREANI, M.; MANEV, H. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. **FASEB J.**, v.10, p. 891-896, 1996.

GOTOH, T.; SHIKAMA, K. Generation of the superoxide radical during the autoxidation of oxymyoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 80, p. 397-399, 1976.

GOTZ, M.D.; FREYBERG, A. and RIEDERER, P. Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neural. Transm.**, v. 29, p. 241-249, 1990.

GRACE, A.A. Cortical regulation of subcortical dopamine system and its possible relevance to schizophrenia. **J. Neural. Transm.**, v.91, p. 111-134, 1993.

GUERRERO, J.M.; LOPEZ-GONZALEZ, M.A.; OSUNA, C.; CALVO, J.R. Specific binding of melatonin by immunocompetent cells in humans and rodents. Modifications during postnatal development. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 719, p. 369-377, 1994.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extra cellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 280, p. 1-8, 1990.

HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.; BLACKER, D.R. Oxidants, inflammation and antiinflammatory drugs. **FASEB J.**, v. 2, p. 2867-2873, 1988.

HAMDI, H. Melatonin administration increases the affinity of D2 dopamine receptors in the rat striatum. **Life Sci.**, v. 23, p. 2115-2120, 1998.

HARA, M.; ABE, M.; SUZUKI, T. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 78, p. 308-315, 1996.

HARDELAND, R.; REITER, R.J.; POEGGELER, B.; TAN D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuros. and Biobehavioral Reviews**, v.17, p. 347-357, 1993.

HARDELAND, R.; BALZER, I.; POEGGELER, B. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation and scavenging of free radicals. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 104-111, 1995.

HERRERA, F.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; MARTIN, V.; ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ, C. Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. **J. Pineal Res.**, v. 31, p. 356-362, 2001.

HO, A.K.; BURNS, T.G.; GROTA, L.J.; BROWN, G.M. Scheduled feeding and 24-hour rhythms of N-acetylserotonin and melatonin in rats. **Endocrinology**, 116, p. 1858-1862, 1985.

HOU, J.G.; COHEN, G.; MYTILINEOU, C. Basic fibroblast growth factor stimulation of glial cells protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: involvement of the glutathione system. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 76-83, 1997.

HUERTO-DELGADILLO, L.; ANTÓN-TAY, F.; BENITEZ-KING, G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as calmodulin antagonist. **J. Pineal Res.** v. 17, p. 55-62, 1994.

IACOVITTI, L.; STULL, N.D.; JOHNSTON, K. Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. **Brain Res.**, v. 768, p. 317-326, 1997.

ICHITANI, Y.; OKAMURA, H.; MATSUMOTO, Y.; NAGATSU, I.; IBATA Y. Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. **Brain Research**, v. 549, p. 350-353, 1991.

ICHITANI, Y.; OKAMURA, H.; NAKAHARA, D.; NAGATSU, I.; IBATA, Y. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. **Exp. Neurol.**, v. 130, p. 269-278, 1994.

IMAM, S.Z.; EL-YAZAL, J.; NEWPORT, G.D.; ITZHAK, Y.; CADET, J.L.; SLIKKER, W.Jr.; ALI, S.F. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. . **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 939, p. 366-380, 2001.

ITZHAK, Y.; MARTIN, J.L.; BLACK, M.D.; ALI, S.F. Effect of melatonin on methamphetamine-and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced

dopaminergic neurotoxicity and methamphetamine-induced behavioral sensitization. **Neuropharmacol.**, v. 37, p. 781-791, 1998.

JAKOBY, W.B.; ZIEGLER, D.M. The enzymes of detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 34, p.20715-20718, 1990.

JOO, W.S.; JIN, B.K.; PARK, C.W.; MAENG, S.H.; KIM, Y.S. Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. **Neuroreport**, v. 9, p. 4123-4126, 1998.

KARBOWNIK, M.; GITTO, E.; LEWINSKI, A.; REITER, R.J. Relative efficacies of indole antioxidants in reducing autoxidation and iron-induced lipid peroxidation in hamster testes. **J. Cell Biochem.**, v. 4, p. 693-699, 2001.

KARBOWNIK, M.; GITTO, E.; LEWINSKI, A.; REITER, R.J. Induction of lipid peroxidation in hamster organs by the carcinogen cadmium: melioration by melatonin. **Cell Biol. and Toxicol.**, v. 17, p. 33-40, 2001.

KARSTALDT, P.J.; KERASIDIS, H.; PINCUS, J.H.; MELONI, R.; GRAHAM, J.; GALE, K. Unilateral destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. **Exp. Neurol.**, v. 126, p. 25-30, 1994.

KAUR, H.; HALLIWELL, B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid: identification of uric acid oxidation products. **Chem. Biol. Interact.**, v. 73, p. 235-247, 1990.

KEBABIAN, J.W.; CALNE, D.B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, p. 93-96, 1979.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.

KESSLER, R.M.; ANSARI, M.S.; SCHMIDT, D.E.; PAULIS, T.; CLANTON, J.; INNIS, R.; AI-TIKRITI, M.; MANNING, R.G.; GILLESPIE, D. High affinity dopamine D2 receptor radioligands 2.[125I] epidepride, a potent and specific radioligand for the characterization of striatal and extrastriatal dopamine D2 receptors. **Life Sci.** v. 49, p. 617-618, 1991.

KHERER, J.P. Free radicals, mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxic.**, v. 23, p. 21-48, 1993.

KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H.; PARK, C.W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport** , v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KORF, H.W.; SCHOMERUS, C.; MARONE, E.; STEHLE, J.H. Signal transduction molecules in the rat pineal organ: Ca²⁺, pCREB and ICER. **Naturwissenschaften**, v. 83, p. 535-543, 1996.

KOTLER, M.; RODRIGUEZ, C.; SAINZ, R.M.; ANTOLIN, J.; MENENDEZ-PELAEZ, A. Melatonin increases gene expression for antioxidative enzymes in rat brain cortex. **J. Pineal Res.**, v. 24, p. 83-89, 1998.

KREBS, E.G.; BEAVO, J.A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. **Annu Rev. Biochem.**, v. 48, p. 923-959, 1979.

KRIEGER, D.T. Endocrine Rhythms. **Raven Press, New York**, 1979.

KUMAR, R.; AGARWAL, A.K. and SETH, P.K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 1703-1707, 1995.

LABANDEIRA-GARCIA, J.L.; ROZAS, G.; LOPEZ-MARTIN, E.; LISTE, I.; GUERRA, M.J. Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine

lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. **Exp. Brain Res.**, v. 108, p. 69-84, 1996.

LAPIN, I.P.; MIRZAEV, S.M.; RYZOV, I.V.; OXENKRUG, G.F. Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylenetetrazole in mice. **J. Pineal Res.**, v. 24, p. 215-218, 1998.

LEONE, R.M.; SILMAN, R.E. Melatonin can be differentially metabolized in the rat to produce N-acetylserotonin in addition to 6-hydroxy-melatonin. **Endocrinology**, v. 114, p. 1825-1832, 1984.

LEZOUALC'H, F.; SPARAPANI, M.; BEHL, C. N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB. **J. Pineal Res.**, v. 24, p. 168-178, 1998.

LIN, A.M. Coexistence of zinc and iron augmented oxidative injuries in the nigrostriatal dopaminergic system of SD rats. **Free Radical Biol. Med.**, v. 30, p. 225-231, 2001.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The role of O_2^- in the production of OH in vitro and in vivo. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 29-33, 1994.

LISSONI, P.; FUMAGALLI, L.; PAOLOROSSO, F.; ROVELLI, F.; ROSELLI, M.G.; MAESTRONI, G.J. Anticancer neuroimmunomodulation by pineal hormones other than melatonin: preliminary phase II study of the pineal indole 5-methoxytryptophol in association with low-dose IL-2 and melatonin. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v. 11, p. 119-122, 1997.

LIU, C.; WEAVER, D.R.; JIN, X.; SHEARMAN, L.P.; PIESCHL, R.L.; GRIBKOFF, V.K.; REPERT, S.M. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. **Neuron**. v. 19, p. 91-102, 1997.

LONGONI, B.; PRYOR, W. A.; MARCHIAFAVA, P. Inhibition of lipid peroxidation by N-acetylserotonin and its role in retinal physiology. **Biochem. Biophysical Res.**, v. 233, p. 778-780, 1997.

LOPES, C.; DELYRA, J.L.; MARKUS, R.P.; MARIANO, M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 23, p. 72-78, 1997.

LOPEZ-GONZALES, M.A.; CALVO, J.R.; SEGURA, J.J.; GUERRERO, J.M. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. **Biotechnol. Ther.**, v. 4, p. 253-262, 1993.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, M.A., GUERRERO, J.M., TORRONTERAS, R., OSUNA, C.; DELGADO, F. Ototoxicity caused by aminoglycosides is ameliorated by melatonin without interfering with the antibiotic capacity of the drugs. **J. Pineal Res.** 28, p. 26-33, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement, protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

LUTHMAN, J.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; LINDQVIST, E. Unilateral neonatal intracerebroventricular 6-hydroxydopamine administration in rats: I. Effects on spontaneous and drug-induced rotational behaviour and on postmortem monoamine levels. **Psychopharmacology**, v.116, p. 443-450, 1994.

MAESTRONE, G.J.M.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity: II melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 68, p. 384-391, 1987.

MANEV, H.; UZ, T.; KHARLAMOV, A. In vivo protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone: effect of exogenous melatonin and circadian rhythm. **Retr. Neurol. Neurosci.**, v.9, p. 251-256, 1996.

MARKUS, R.P.; LOPES, C. Glândula Pineal em: Fisiologia Humana, **Sistema Nervioso y sistema endócrino**, Ed Terceiro Milênio. p. 99-103, 1998.

MARSHALL, K.A.; REITER, R.J.; POEGGELER, B.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. **Free Radical Biol. Med.** v. 21, p. 307-315, 1996.

MARTÍN, M.; MACÍAS, M.; ESCAMES, G.; REITER, R.J.; AGAPITO, M.T.; ORTIZ, G.G.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **J. Pineal Res.** 28, p. 242-248, 2000.

MELCHIORRI, D.; REITER, R.J.; SEWERYNEK, E.; CHEN, L.D.; NISTICO, G. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. **FASEB J.** v.9, p. 1205-1210, 1995.

MELCHIORRI, D.; REITER, R.J.; CHEN, L.D.; SEWERYNEK, E.; NISTICO, G. Melatonin affords protection against kainate-induced in vitro lipid peroxidation in brain. **Eur. J. Pharmacol.** 305, p. 239-242, 1996.

MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E.; REITER, R.J. Effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. **Br J. Pharmacol.**, v. 121, p. 264-269, 1997.

MELCHIORRI, M.; REITER, R.J.; ATTIA, A.M. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage. **Life Sci.**, v. 56, p. 83-89, 1994.

MELIS, G.B.; CAGNACCI, A.; PAOLETTI, A.M.; SOLDANI, R.; ORRÚ, M.; SECCI, C. Melatonin administration increases TSH secretion in the follicular but not in the luteal phase of the woman menstrual cycle. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 18, p. 37, 1995.

MELTZER, H.Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J.C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D1- and D2- and serotonin pKi values. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** v. 251, p. 238-246, 1989.

MENENDEZ-PELAEZ, A.; POEGGELER, B.; REITER, R.J. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues. Immunological and radioimmunoassay evidence. **J. Cell Biochem.**, v. 53, p. 373-378, 1993.

MÍGUEZ, J.M.; RECEIO, J.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E.; ALDEGUNDE, M. Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster. **J. Pineal Res.** 25, p. 106-115, 1998.

MÍGUEZ, J.M.; RECIO, J.; VIVIEN-ROELS, B.; PÉVET, P. Diurnal changes in the content of indolamines, catecholamines, and methoxyindoles in the pineal gland of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): effect of photoperiod. **J. Pineal Res.** 21, p. 7-14, 1996.

MILES, A. Melatonin: perspectives in the life sciences. **Life Sci.**, v. 44, p. 375-385, 1989.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 1, p. 188-192, 1972a.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of anion superoxide in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972b.

MOHANAN, P.V.; YAMAMOTO, H. Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid. **Toxicol. Letters**, v. 19, p. 385-391, 2001.

MOLINA-HOLGADO, E.; DEWAR, K.M.; GRONDIN, L.; VAN GELDER, N.M.; READER, T.A. Changes of amino acid and monoamine levels after neonatal 6-hydroxydopamine denervation in rat basal ganglia, substantia nigra and raphe nuclei. **J. Neurosci. Res.**, v.35, p. 409-418, 1993.

MONTILLA, P.; TÚNEZ, I.; MUNOZ DE AGUEDA, M.C.; CABRERA, E.; MONTILLA MUNOZ, M.C.; PLASENCIA, J.; DE LA TORRE LOZANO, E. J. Protective effect of melatonin against oxidative stress induced by ligation of extra-hepatic biliary duct in rats: comparison with the effect of S-adenosyl-L-methionine. **J. Pineal Res.** 28, 143-149, 2000.

MORIOKA, N.; OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A. Melatonin protects against age-related DNA damage in the brains of female senescence-accelerated mice. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 202-209, 1999.

MORTON, D.J. Both hydroxy- and methoxyindoles modify basal temperature in the rat. **J. Pineal Res.**, v. 4, p. 1-5, 1987.

MULLER, D.P.; GROSS-SAMPSON, M.A. Neurochemical, neurophysiological and neuropathological studies in vitamin E deficiency. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 5, p. 239-247, 1990.

NAITOH, N.; WATANABE, Y.; MATSUMURA, K.; MURAI, I.; KOBAYASHI, K.; IMAI-MATSUMURA, K.; OHTUKA, H.; TAKAGI, K.; MIYAKE, Y.; SATOH, K.; WATANABE, Y. Alteration by maternal pinealectomy of fetal and neonatal melatonin and dopamine D1 receptor binding in the suprachiasmatic nuclei. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 253, p. 850-854, 1998.

NAMBOODIRI, M.A.A.; SUGDEN, D.; KLEIN, D.C.; GRADY, J.R.K.; MEFFORD, I.N. Rapid nocturnal increase in ovine pineal N-acetyltransferase activity and melatonin synthesis: effects of cycloheximide. **J. Neurochem.** 45, p. 832-835, 1985.

NODA, Y.; MORI, A.; LIBURDY, R.; PACKER, L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 159-163, 1999.

OHTA, Y.; KONGO, M.; SASAKI, E.; NISHIDA, K.; ISHIGURO, I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **J. Pineal Res.** 28, p. 119-126, 2000.

OKATANI, Y.; SAGARA, Y. Role of melatonin in nocturnal prolactin secretion in women with normoprolactinemia and mild hyperprolactinemia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 168, p. 854-861, 1993.

OLANOW C.W. Oxidation reactions in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 40, p. 32-37, 1990.

ORTIZ, G.G.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MORÁN-MOGUEL, C.; GARCÍA, J.J.; REITER, R.J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, p. 101-108, 2001.

OSSENI, R.A.; RAT, P.; BOGDAN, A.; WARNET, J.; TOUITOU, Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. **Life Sci.**, v. 68, p. 387-399, 2000.

OTHMAN, A.I.; EI-MISSIRY, M.A.; AMER, M.A. The protective avtion of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats . **Free Radical Res.**, v. 6, p. 173-177, 2001.

OXENKRUB, G.F. Antidepressive and antihypertensive effects of MAO-A inhibition: role of N-acetylserotonin. A review. **J. Neurobiol.**, v. 7, p. 213-224, 1999.

OXENKRUB, G.F. N-acetylserotonin and hypotensive effect of MAO-A inhibition (mini-review). **Vopr. Med. Khim.**, v. 43, p.522-526, 1998.

OXENKRUB, G.F.; REQUINTINA, P.; BACHURIN, S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models. **Annals New York Acad. Sci.**, v. 939, p. 190-199, 2001.

PABLOS, M.I.; AGAPITO, M.T.; GUTIERREZ, R. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutatione peroxidase in several tissues of chicks. **J. Pineal Res.**, v.19, p. 111-116, 1995.

PANG, S.F.; TANG, F.; TANG, P.L. Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. **J. Exp. Zool.**, 229, p. 41-47, 1984.

PANG, S.F.; YIP, M.K.; LIU, H.W.; BROWN, G.M.; TSUI, H.W. Diurnal rhythms of immunoreactive N-acetylserotonin and melatonin in the serum of male rats. **Acta Endocrinol.** v. 95, p. 571-575, 1980.

PAPPOLLA, M.; SAS, M.; BICK, R.J. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer's amyloid peptide. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 1683-1690, 1997.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, 2nd Edn, 1986.

PETROVSKY, N.; HARRISON, L.C. The chronobiology of human cytokine production. **Int. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 635-649, 1998.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci.** 55, p. 271-276, 1994.

PIERI, C.; MORONI, F.; MARRA, M.; MARCHESELLI, F.; RECCHIONI, R. Melatonin is an efficient antioxidant. **Arch. Gerontol. Geriatrics.** 20, p. 159-165, 1995.

PLESS, G.; FREDERIKSEN, T.J.P.; GARCÍA, J.J.; REITER, R.J. Pharmacological aspects of N-acetyl-5-methoxytryptamine (melatonin) and 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (pinoline) as antioxidants: reduction of oxidative damage in brain region homogenates. **J. Pineal Res.**, v. 26, p. 236-246, 1999.

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

POEGGELER, B.; REITER, R.J.; HARDELAND, R.; TAN, D.X.; BARLOW-WALDEN, L.R. Melatonin and structurally-related, endogenous indoles act as potent electron donors and radical scavengers in vitro. **Redox Report.**, v. 2, p. 179-184, 1996.

POZO, D.; REITER, R.J.; CALVO, J.M. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. **Life Sci.**, v. 55, p. 455-503, 1994.

POZO, D.; REITER, R.J.; CALVO, J.R.; GUERRERO, J.M. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. **J. Cell. Biochem.** v. 65, p. 430-442, 1997.

PRAKHIE, I.V.; OXENKRUB, G.F. The effect of nifedipine, Ca⁺⁺ antagonist, on activity of MAO inhibitors, N-acetylserotonin and melatonin in the mouse tail suspension test. **Int J. Neuropsychopharmacol.**, v. 1, p. 35-40, 1998.

PRINC, F.G.; MAXIT, A.G.; CARDALDA, C.; BATLLE, A.; JUKNAT, A.A. In vivo protection by melatonin against δ -aminolevulinic acid-induced oxidative damage and its antioxidant effect on the activity of haem enzymes. **J. Pineal Res.**, v.24, p. 1-8,1998.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M. JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; TOGASAKI, D.M. Dose-dependent lesions of dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, p. 631-647, 1995.

PSARAKIS, S.; BROWN, G.; GROTA, L.J. Analgesia induced by N-acetylserotonin in the central nervous system. **Life Sci.**, v. 42, p. 1109-1116, 1988.

QI, W.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; SIU, A.W.; GARCÍA, J.J. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium (III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. **J. Pineal Res.**, v. 29, p. 54-61, 2000.

RAGHAVENDRA, V.; KULKARNI, S.K. Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks. **Free Radical Biol. and Med.**, v. 30, p. 595-602, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Ed. Guanabara Koogan, p.515-528, 2001.

REITER, R.J.; TANG, L.; GARCIA, J.J.; MUNOZ-HOYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sciences**, v. 60, p. 2255-2271, 1997.

REITER, R.J.; CABRERA, J.; SAINZ, R.M.; MAYO, C.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D. Melatonin as a pharmacological agent against neuronal loss in experimental models of Huntington's disease, Alzheimer's disease and Parkinsonism. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, pp. 471-485, 1999.

REITER, R.J.; GUERRERO, J.M.; GARCIA, J.J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging: relation to melatonin. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 854, p. 410-424, 1998.

REITER, R.J. Pineal Melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v 12, p. 151-180, 1991.

REITER R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J.**, v. 9, p. 526-533, 1995a.

REITER, R.J. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. **Experimental Gerontology**, v. 30, p. 199-212, 1995b.

REITER, R.J. Cyoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. **Nutrition**, v. 14, p. 691-696, 1998.

REITER, R.J. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. **Eur J. Endocrinol.**, v. 134, p. 412-418, 1996.

REITER, R.J. The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. **Life Sci.**, v.46, p. 2119-2131, 1987.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; CABRERA, J.; DARPA, D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 467, p. 379-387, 1999.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into light: cloning and classification of subtypes. **Trens Pharmacol. Sci.**, v. 17, p. 100-102, 1996.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; RIVKEES, S.A.; STOPA, E.G. Putative melatonin receptors in a human biological clock. **Science**, v. 242, p. 78-81, 1988.

ROCA, A.L.; GODSON, C.; WEAVER, D.R.; REPPERT, S.M. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel_{1a} melatonin receptor. **Endocrinology**, v. 137, p. 3469-3477, 1996.

ROENNEBERG, T.; ASCHOFF, J. Annual rhythm of human reproduction: I. biology, sociology, or both? **J. Biol. Rhythms.**, v. 5, p. 195-216, 1990a.

ROENNEBERG, T.; ASCHOFF, J. Annual rhythm of human reproduction: II Environmental correlations. **J. Biol. Rhythms**, v. 5, p. 217-239, 1990b.

ROJAS, P.; CERUTIS, D.R.; HAPPE, H.K.; MURRIN, L.C.; HAO, R.; PFEIFFER, R.F.; EBADI, M. 6-hydroxydopamine-mediated induction of rat brain metallothionein I mRNA. **Neurotoxicology**, v. 17, p. 323-334, 1996.

ROSEBOOM, P.H.; COON, S.L.; BALER, R.; McCUNE, S.K.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C. Melatonin synthesis: analysis of the >150-fold increase in serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 137, p. 3033-3044, 1996.

ROSSMANITH, W.; YEN, S.S.C. Sleep-associated decrease in LH pulse frequency during the early follicular phase of the menstrual cycle: evidence for an opioidergic mechanism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 65, p. 713-718, 1987.

SACK, R.L.; LEWY, A.J.; ERB, D.L.; VOLLMER, W.M.; SINGER, C.M. Human melatonin production decreases with age. **J. Pineal Res**, v 3, p. 379-388, 1986.

SCIANO, J.C. Exploratory laser flash photolysis study of free radical reaction and magnetic field effects in melatonin chemistry. **J. Pineal Res.**, v. 19, p. 189-194, 1995.

SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: prominent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v.118, p. 7-16, 1991.

SEWERYNEK, E.; MELCHIORRI, D.; ORTIZ, G.G.; POEGGELER, B.; REITER, R.J. Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. **J. Pineal Res.**, v.19, p. 51-56, 1995.

SEWERYNEK, E.; REITER, R.J.; MELCHIORRI, D. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. **Hepato-Gastroenterology.**, v. 43, p. 898-905, 1996.

SHIDA, C.S.; CASTRUCCI, A.M.L.; LAMY-FREUND, M.T. High melatonin solubility in aqueous medium. **J. Pineal Res.**, v. 16, p. 198-205, 1994.

SHINKAI, T.; ZHANG, L.; MATHIAS, S.A.; ROTH, G.S. Dopamine induces apoptosis in cultured rat striatal neurons; possible mechanism of D₂-dopamine receptor neuron loss during aging. **J. Neurosci. Res.**, v. 47, p. 393-399, 1997.

SIU, A.W.; REITER, R.J.; TO, C.H. Pineal indolamines and vitamin E reduce nitric oxide induced lipid peroxidation in rat retinal homogenates. **J. Pineal Res.**, v.27, p. 122-127, 1999.

SIU, A.W.; CHEUNG, J.P.; TO, C.H.; CHAN, E.K.; CHAN, J.K.; CHEUNG, J.C. N-acetyl-serotonin reduces copper (I) ion-induced lipid peroxidation in bovine retinal homogenates. **Acta. Ophthalmol. Scand.**, v. 79, p. 69-71, 2001.

SKAPER, S.D.; FLOREANI, M.; CECCON, M.; FACCI, L.; GIUSTI, P. Exitotoxicity, oxidative stress and the neuroprotective potential of melatonin. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, p.107-118, 1999.

STEHLE, J.H.; FOULKES, N.S.; MOLINA, C.A.; SIMONNEAUX, V.; PÉVET, P.; SASSONE-CORSI, P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. **Nature**, v. 365, p. 314-320, 1993.

STEHLE, J.H.; FOULKES, N.S.; PÉVET, P.; SASSONE-CORSI, P. Developmental modulation of pineal gland function: synchronized CREM inducibility and adrenergic stimulation. **Mol. Endocrinol.**, v. 9, p. 706-716, 1995.

STEHLE, J.H.; VANECEK, J.; VOLLRATH, L. Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. **J. Neural Transm.-Gen. Sect.**, v. 78, p. 173-177, 1989.

STOLC, S. Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Sci.**, v. 65, p. 1943-1950, 1999.

SUGDEN, D. Sedative potency and 2-[125]iodomelatonin binding affinity of melatonin analogues. **Psychopharmacology**, v. 117, p. 362-370, 1995.

TAKAHASHI, J.S. Circadian rhythms. ICER is a nicer at night. **Curr. Biol.**, v.4, p.165-168, 1994.

TAN, D.X.; REITER, R.J.; CHEN, L.D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L.C.; BARLOW-WALDEN, L.R. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 215-218, 1994.

TAN, D. X.; CHEN, L.D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine J.**, v. 1, p. 57-60, 1993.

TANG, L.; REITER, R.J.; LI, Z.R.; ORTIZ, G.G.; YU, B.P.; GARCIA, J.J. Melatonin reduces the increase in 8-hydroxydeoxyguanosine levels in the brain

and liver of kainic acid treated rats. **Mol. Cell. Biochem.** v. 178, p. 299-303, 1998.

TERAI, M.; HIDAKA, K.; NAKAMURA, Y. Comparison of [3H]YM-09151-2 with [3H]spiperone and [3H]raclopride for dopamine d-2 receptor binding to rat striatum.. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 173, p. 177-182, 1989.

TESORIERE, L.; DÀRPA, D.; CONTI, S.; GIACONE, V.; PINTANDI, A.M.; LIVREA, M.A. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insight into the radical-scavenging activity. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 95-105, 1999.

TOUITOU, Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. **Exp. Gerontol.**, v. 36, p. 1083-1100, 2001.

TURRENS, J.F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A.L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 408-414, 1985.

U.S. Department of Health and Human Services. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council-Guide for the care and use of laboratory animals. **Washington**, 83p, 1985.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Annal. Biochem.**, v. 86, p. 271-278, 1977.

UNGERSTED U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostratal system in the rat brain. **Acta Physiol. Scand.**, v. 36, p. 69-93, 1971.

UZ, T.; GIUSTI, P.; FRANCESCHINI, D. Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. **Neuroscience**, v. 73, p. 631-637, 1996.

VAKKURI, O.; LEPPALUOTO, J.; VUOTEENANO, O. Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as a tracer. **Acta Endocrinol.**, v. 106, p. 152-157, 1984.

VALCAVI, R.; ZINI, M.; MAESTRONI, G.J.; CONTI, A.; PONTIROLI, I. Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than growth hormone-releasing hormone. **Clin. Endocrinol.**, v.39, p. 193-199, 1993.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **American Physiological Society.**, v. 78, p. 687-721, 1998.

VIJAYALAXMI, M.; MELTZ, M.L.; REITER, R.J.; HERMAN, T.S. Melatonin and protection from genetic damage to bone marrow and blood elements: whole-body irradiation studies in mice. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 221-225, 1999.

VIJAYALAXMI, M.; REITER, R.J.; HERMAN, T.S. melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. **Mutat Res.**, v. 371, p. 221-228, 1996.

VIJAYALAXMI, M.; REITER, R.J.; SEWERYNEK, E. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. **Radiat. Res.**, v. 143, p. 102-114, 1995.

VISWANATHAN, M.; SIOW, Y.L.; PAULOSE, C.S.; DAKSHINAMURTI, K. Pineal indoleamine metabolism in pyridoxine-deficient rats. **Brain Res.** 473, p. 37-42, 1998.

VLKOLINSKÝ, R.; STOLC, S. Effects of stobadine, melatonin, and other antioxidants on hypoxia/reoxygenation-induced synaptic transmission failure in rat hippocampal slices. **Brain Res.** v. 850, p. 118-126, 1999.

WAKATSUKI, A.; OKATANI, Y. Melatonin protects against the free radical-induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. **J. Pineal Res.**, v. 28, p. 172-178, 2000.

WAKATSUKI, A.; OKATANI, Y.; SHINOHARA, K.; IKENOUE, N.; KANEDA, C.; FUKAYA, T. Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage. **J. Pineal Res.**, v. 30, p. 22-28, 2001.

WALDHAUSER, F.; LIEBERMAN, H.R.; LYNCH, H.J.; WALDHAUSER, M.; HERKNER, K.; FRISCH, H.; VIERHAPPER, H.; WALDHAUSER, W.; SCHEMPER, M.; WURTMAN, R.J.; CROWLEY, W.F. A pharmacological dose of melatonin increases PRL levels in males without altering those of GH, LH, FSH, TSH, testosterone or cortisol. **Neuroendocrinology**, v. 46, p. 125-130, 1987.

WEAVER, D.R.; REPERT, S.M. The Mella melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. **NeuroReport**, v.8, p. 109-112, 1996.

WILLIS, G.L.; ARMSTRONG, S.M. A therapeutic role for melatonin antagonism in experimental models of Parkinson's disease. **Physiology & Behavior**, v. 66, p. 785-795, 1999.

WOLFLER, A.; ABUJA, P.M.; SCHAUENSTEIN, K.; LIEBMANN, P.M. N-acetylserotonin is a better extra- and intracellular antioxidant than melatonin. **FEBS Lett.**, v. 449, p. 206-210, 1999.

WOLFLER, A.; SCHAUENSTEIN, K.; LIEBMANN, P.M. Lack of calmodulin antagonism of melatonin in T-lymphocyte activation. **Life Sci.** v. 63, p. 835-842, 1998.

YAMAMOTO, H.A.; MOHANAN, P.V. Preventive effect of melatonin against DNA damage induced by cyanide, kainate, glutathione/Fe(3+)/O(2), or H(2)O(2)/Fe(2+). **J. Pineal Res.**, v. 31, p. 314-319, 2001.

YAMAMOTO, H.A.; TANG, H.W. Melatonin attenuates L-cysteine-induced seizures and lipid peroxidation in the brain of rats. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 108-117, 1996.

YU, H.S.; PANG, S.F.; TANG, P.L.; BROWN, G.M. Persistence of circadian rhythms of melatonin and N-acetylserotonin in the serum of rats after pinealectomy. **Neuroendocrinology**, v. 32, p. 262-265, 1981.

ZAWILSKA, J.B.; NOWAK, J.N. Melatonin: from biochemistry to therapeutic applications. **Polish J. Pharmacol.**, v. 51, p. 3-23, 1999.

ZHDANOVA, I.V.; WURTMAN, R.J. Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent. **J. Biol. Rhythms**, v. 12, p. 644-650, 1997.

ZHOU, F.C.; BLEDSOE, S.; MURPHY, J. Serotonergic sprouting is induced by dopamine-lesion in substantia nigra of adult rat brain. **Brain Res.**, v. 556, p. 108-116, 1991.

ZIGMOND, M.J.; BERGER, T.W.; GRACE, A.A.; STRICKER, E.M. Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury. Studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of Parkinsonism. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 10, p. 185-200, 1989.

ZIGMOND, M.J.; STRIKER, E.M. Animal models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. **Int. Rev. Neurobiol.** v.31, p. 01-79, 1989.