EDUARDO KOJI TAMURA

EFEITO DA MELATONINA SOBRE A
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM
CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA

São Paulo

2006

EDUARDO KOJI TAMURA

EFEITO DA MELATONINA SOBRE A
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM
CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de
Fisiologia.

Orientadora: Regina Pekelmann
Markus

São Paulo

2006

Ficha Catalográfica

Tamura, Eduardo Koji

Efeito da melatonina sobre a
produção de óxido nítrico em células
endoteliais em cultura

75 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Fisiologia,
2006.

1. Melatonina 2. Óxido nítrico 3.
Células endoteliais

I. Universidade de São Paulo. Instituto
de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Aos meus pais pelo grande
auxílio e incentivo

Aos grandes amigos Elena
A.L. Malpezzi-Marinho &
Eduardo A.V. Marinho por todo
o incentivo e por abrirem as
portas na minha carreira

DEDICO

“Felicidade é a certeza de que nossa vida
não está se passando inutilmente”

Érico Veríssimo

Aos meus pais, por nunca perderem as esperanças em mim, pelo total apoio e incentivo e por todo amor. Aos meus irmãos por todo o incentivo e pelo espelho de caráter e profissionalismo.

Ao casal Eduardo e Elena que são os principais responsáveis por este trabalho, sem eles não teria aprendido a gostar de fisiologia, são amigos indispensáveis, na minha vida pessoal, acadêmica e profissional. Minha carreira sempre será dedicada a este casal.

A Elisângela por alegrar minha vida com todo o amor que me presta e pelo apoio sempre incondicional.

Aos meus grandes amigos Alex, Bidu, Careca, Cléber, Fábio, Nilton, Robson, Rodnei e Vítor, por tudo o que representam na minha vida, sempre dispostos a me ouvir, a falar, a ensinar e a aprender.

Aos amigos de laboratório Carol, Daiane, Fernando, Lidiana, Livingstone e Mara por toda a amizade e colaboração. Ao grande amigo Pedro, pela sempre descontração, que me auxiliou muito nos momentos difíceis, sempre ouvindo os problemas, com grandes conselhos e com muitas cervejas. À pequena Érika, também pelas cervejas e pela grande amizade e por ter auxiliado com correções nesta tese. Às amigas Celina, Cíntia e Jussara que não estão mais presentes no laboratório mas que me auxiliaram muito no início do mestrado.

A Zulma por sempre estar disposta a auxiliar no que fosse preciso.

A Cláudia Lucia Martins da Silva por todo auxílio, amizade e pelo muito que aprendo a cada dia de convivência no laboratório, sendo de fundamental importância neste trabalho, com todo o auxílio nos experimentos, na análise dos resultados e na correção crítica e bem avaliada da tese.

A Débora pelo auxílio técnico, pela amizade e por seu constante bom humor, alegrando todos os dias no laboratório.

A Regina P. Markus pela orientação, paciência, confiança, incentivo e por todo o conhecimento exigido e passado durante todo o mestrado

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
1. Melatonina	1
2. Mecanismos de Ação da Melatonina	4
3. Células endoteliais	12
4. Enzima sintase do óxido nítrico (NOS)	14
5. Bradicinina - mediador da produção de NO por células endoteliais	15
6. Efeitos de Melatonina em Células Endoteliais	18
II - OBJETIVOS	22
III - MATERIAL E MÉTODOS	23
1. Animais	23
2. Reagentes	23
3. Cultura de células endoteliais	24
4. Determinação da concentração de NO intracelular por microscopia confocal	25
5. Avaliação da $[Ca^{2+}]_i$ através de microscopia confocal	26
6. Análise estatística	26
IV - RESULTADOS	28
1. Caracterização de células endoteliais de ratos em cultura	28
2. Padronização da metodologia para determinar a concentração intracelular de NO por microscopia confocal	28
3. Efeito da melatonina e análogos, sobre o aumento de NO induzido por bradicinina	34
4. Avaliação da $[Ca^{2+}]_i$ através de microscopia confocal	42
V - DISCUSSÃO	45
VI - CONCLUSÃO	56
VII - RESUMO	57
VIII - ABSTRACT	58
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Lista de Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	concentração intracelular de cálcio
5-HIAA	ácido 5-hidroxitriptofano
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AA-NAT	enzima arilalquilamina N-acetiltransferase
BK	bradicinina
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DMEM	Meio essencial de Dulbecco, modificado
DMSO	dimetilsulfóxido
E_{max}	efeito máximo
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
EPM	erro padrão da média
HIOMT	enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase
IFN-γ	interferon γ
IL-1	Interleucina 1
iNOS	sintase do óxido nítrico induzível
IUPHAR	União Internacional de Farmacologia
LPS	lipopolissacarídeo
MEL	melatonina
MT₁	receptor de melatonina do subtipo 1
MT₂	receptor de melatonina do subtipo 2
MT₃	receptor de melatonina do subtipo 3
NAS	N-acetilserotonina
nNOS	sintase do óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PBS	tampão fosfato
pD₂	logaritmo negativo da concentração do agonista que promove 50% do efeito máximo

SOD	enzima superóxido dismutase
TPH1	enzima triptofano hidroxilase 1
TNF α	fator de necrose tumoral α

I - INTRODUÇÃO

1. Melatonina

A melatonina, hormônio derivado da serotonina descrito por Lerner *et al.* (1958) como a substância que produzia alteração de cor da pele de anfíbios, é liberado pela glândula pineal no período de escuro. Esta molécula também marca o período do escuro em plantas, organismos unicelulares, bactérias e invertebrados (para revisão, Hardeland & Poeggeler, 2003). Em vertebrados a melatonina também é sintetizada pela retina, onde exerce uma ação parácrina participando de processos adaptativos da visão noturna (Tosini e Fukuhara, 2003). Mais recentemente foi verificado que células imunocompetentes da medula (Tan *et al.*, 1999), sangue periférico (Carrillo-Vico *et al.*, 2004) e colostro (Pontes *et al.* 2005), também sintetizam esta molécula e, neste caso, a ação não está ligada à marcação do ciclo claro/escuro ambiental, mas sim a diferentes funções celulares locais. Além disso, a melatonina é encontrada em altas concentrações na bile de vários mamíferos incluindo o homem, essas concentrações chegam a ser de duas a três vezes maiores do que a concentração noturna da melatonina no sangue, porém, a origem dessa melatonina ainda é desconhecida (para revisão, Reiter *et al.*, 2000)

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes no período de escuro. O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, formando a serotonina. A serotonina, por

sua vez é metabolizada a N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), e posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) dando como produto final a melatonina (para revisão, Simonneaux e Ribelayga, 2003) (Figura 1).

Figura 1 - Via Biossintética da Melatonina. A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano e as enzimas que convertem o triptofano em serotonina, a TPH1 e a 5HTP descarboxilase, possuem uma ampla distribuição no organismo, sendo a produção de serotonina muito maior nos tecidos neurais. As duas enzimas que convertem serotonina em melatonina possuem uma distribuição mais limitada. Retirado e adaptado de Reiter *et al.* (2000).

A serotonina também pode sofrer uma desaminação oxidativa, através da ação da enzima monoaminoxidase, sendo transformada em 5-hidroxitriptofol ou oxidado a ácido 5-hidroxitriptofol (5-HIAA) (para revisão, Simonneaux e Ribelayga, 2003).

O passo limitante na síntese de melatonina é a conversão de serotonina à N-acetilserotonina. Esta conversão ocorre apenas no período de escuro e é interrompida no final da noite, ou quando existe um pulso de luz durante o período de escuro. Durante o período de escuro a atividade da enzima N-acetiltransferase está aumentada em até 100 vezes. Este aumento pode ser devido ao aumento da transcrição gênica, como ocorre em roedores (Roseboom *et al.*, 1996), ou à diminuição da degradação da proteína, que é sintetizada continuamente, como ocorre nos ungulados (Schomerus *et al.*, 2000). Independente do tipo de mecanismo intrínseco que controla o aumento noturno da atividade da N-acetilserotonina, o sinal que ativa este mecanismo é o aumento da liberação de noradrenalina a partir de uma via simpática controlada pelos núcleos supraquiasmáticos, que são a sede do relógio biológico.

Os núcleos supraquiasmáticos recebem inervação direta da retina, através do trato retino-hipotalâmico e transmitem, através de uma via polissináptica a informação “está escuro” para a glândula pineal, através da liberação de noradrenalina (para revisão, Simonneaux e Ribelayga, 2003). Desta forma, tanto a melatonina como a N-acetilserotonina só são produzidas durante a fase de escuro e ambas devem ser consideradas como hormônios

temporizadores, já que a N-acetilserotonina é um passo limitante para a produção de melatonina e também só é produzida durante a fase de escuro (figura 2).

Figura 2 – A enzima AA-NAT é regulada pela luz. Na presença de luz a transcrição do RNA mensageiro é bloqueada e na ausência de luz esta transcrição é ativada resultando na síntese de N-acetilserotonina (NAS), precursor imediato da melatonina. No escuro também são ativados mecanismos que regulam a atividade da AA-NAT. Para que este sinal seja eficiente, o RNA mensageiro é rapidamente traduzido e sua meia-vida é bastante curta, dependendo de neo-transcrição (adaptado de Simonneaux e Ribelayga, 2003).

2. Mecanismos de Ação da Melatonina

A melatonina é uma molécula com características lipofílicas e desencadeia diferentes ações de acordo com a concentração e com o local de ação. Além de adaptações sazonais e ajuste de ritmos circadianos, diversas outras ações são ligadas à participação da melatonina, como a mudança de cor de pele em anfíbios, o envolvimento em processos relacionados ao sono, a

inibição da iniciação do câncer e do crescimento do tumor e a estimulação do sistema imunológico (para revisão, Reiter *et al.*, 2002). Os efeitos da melatonina são observados em uma grande faixa de concentração, o que evidencia que este hormônio atua por diferentes vias. Como descrito em maior detalhe abaixo, há efeitos que ocorrem apenas com concentrações na faixa de μM - mM , enquanto outros ocorrem na faixa de pM - nM . Esta grande variabilidade implica em ações ligadas, ou não, à ritmicidade circadiana. A concentração noturna máxima de melatonina no plasma em mamíferos está na faixa de pM - nM e ações dependentes da produção extra pineal, são observadas em concentrações maiores, na faixa de μM - mM .

Um dos efeitos mais conhecidos e bem estudados de altas concentrações de melatonina é a capacidade de atuar como antioxidante (Reiter *et al.*, 2002, Bilici *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2004). Os radicais livres incluem o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), o ânion superóxido (dióxido ou $\text{O}_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO) que são gerados a partir do O_2 . Possuem alta reatividade, o que leva à oxidação de moléculas estruturais e essenciais para a atividade celular. Portanto, o aumento da concentração destes radicais, que são gerados como sub-produto de diferentes reações químicas, causa disfunção, ou mesmo morte celular. A melatonina, em altas concentrações, atua como “scavenger” de radicais livres (Poeggeler *et al.*, 2002), como demonstrado por ensaios “*in vitro*”, através da formação de 3-hidroximelatonina, que resulta da ligação direta, independente de ação enzimática, de radicais hidroxila com a melatonina (Tan *et al.*, 1998). O fato de 3-hidroximelatonina ser um dos metabólitos do hormônio da pineal na

urina de humanos levou Tan e colaboradores (1998) a concluir que este processo ocorreria também “*in vivo*”.

Um outro mecanismo de ação que pode resultar em efeito anti-oxidante é o aumento da atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase e glutathione oxidase. A SOD é responsável por converter o $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser uma molécula tóxica para a célula, na presença do ferro (Fe^{2+}) por exemplo, forma o radical $\bullet OH$, que é citotóxico. Outra importante molécula antioxidante é a glutathione peroxidase, que converte justamente o H_2O_2 , em duas moléculas de H_2O . O H_2O_2 também pode ser convertido em H_2O e O_2 pela ação da enzima catalase (para revisão, Rodriguez *et al.*, 2004).

A melatonina exógena aumenta a atividade de moléculas antioxidantes tais como a SOD em diversos tecidos (fígado, rins e cérebro de ratos), e também a atividade da enzima catalase em rins e cérebro de ratos (Liu & Ng, 2000). A atividade da enzima glutathione peroxidase também é muito citada, por ser aumentada na presença de melatonina, como observado em cérebros de ratos (Barlow-Walden *et al.*, 1995).

Baixas concentrações de melatonina também podem exercer efeito antioxidante através da síntese ou ativação de enzimas envolvidas no processo. Os ritmos de melatonina plasmática e atividade de superóxido dismutase (SOD) pulmonar e cortical são sincrônicos, sugerindo que esta enzima, responsável pela rápida remoção de $O_2^{\bullet-}$ das células, seja regulada pela melatonina (Albarran *et al.*, 2001).

A melatonina também atua inibindo a expressão da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) responsável pela formação em grandes quantidades do radical livre óxido nítrico, como demonstrado no modelo de macrófagos murinos estimulados por lipopolissacarídeo onde a melatonina (mM) inibe a expressão da iNOS (Gilad *et al.*, 1998). Este efeito deve-se à inibição do fator de transcrição NF-κB. Além disso, Cuzzocrea *et al.* (1998) demonstraram que no modelo de choque séptico, e inflamação induzida por administração de carragenina (ou plasma ativado por zimosan) em patas e cavidades pleurais de ratos, que a melatonina exógena (mM) diminui a atividade da iNOS. Por outro lado, no modelo de pleurisia induzida por carragenina, os animais foram mantidos durante uma semana em luz constante, o que resulta na depleção da melatonina produzida pela glândula pineal, observou-se um aumento na migração de polimorfonucleares e no volume do exsudato pleural, porém, não foram observadas alterações na atividade da iNOS (Cuzzocrea *et al.*, 1999).

Um outro mecanismo de ação pelo qual baixas concentrações de melatonina podem modificar funções celulares é através da ligação com calmodulina, proteína que participa da maioria dos eventos intracelulares em vertebrados superiores, possui a capacidade de ligação e regulação em uma grande diversidade de proteínas-alvos, incluindo enzimas, canais iônicos, receptores e proteínas do citoesqueleto. Suas ações resultam tanto por uma ação direta, como através da formação de complexo com o cálcio (para revisão, Kortvely & Gulya, 2004).

A melatonina é capaz de ligar-se à calmodulina purificada com alta afinidade apresentando uma constante de dissociação (K_d) de 180 pM, o que sugere que esta ligação tenha uma relevância fisiológica (Benítez-King *et al.*, 1993; Benítez-King & Antón Tay, 1993). A primeira evidência da interação entre a calmodulina e a melatonina em células foi sugerida através de ensaios com linhagens celulares (MDCK, célula epitelial de cão; N1E-115, neuroblastoma de camundongo), onde foi observado que a adição de melatonina (1 nM) nas células provocava uma diminuição da atividade de uma isoforma da enzima fosfodiesterase dependente de calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1991). Posteriormente, verificou-se que este é o mecanismo responsável pela inibição da atividade e da autofosforilação da calmodulina-quinase II, isolada de cérebros de rato (Benítez-King *et al.*, 1996), e da atividade da isoforma da adenilil ciclase dependente do complexo cálcio-calmodulina, presente em miotubos de rato em cultura (Almeida-Paula *et al.*, 2005).

Uma ação que também é dependente do complexo cálcio-calmodulina é a ativação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), presente constitutivamente em diversos tipos celulares, e alguns trabalhos da literatura demonstram que a melatonina modula a produção de NO também em diversos tipos celulares. A melatonina em baixa concentração (1 nM) inibe a atividade da isoforma constitutiva da NOS em cerebelo de ratos e este efeito é atribuído à capacidade de ligação com a calmodulina (Pozo *et al.*, 1997). A atividade da isoforma neuronal da NOS (nNOS) de ratos também foi inibida por diferentes concentrações de melatonina (1 nM a 1 mM), sendo este efeito revertido quando

a incubação era realizada com a adição de altas concentrações de calmodulina (León *et al.*, 2000). Outro resultado semelhante foi observado por Bettahi *et al.* (1996) na atividade da NOS de hipotálamo de rato, quando após a administração de melatonina, ou após coletarem hipotálamos durante o período do escuro, estes hipotálamos apresentavam menor atividade da NOS. Em outro modelo (retina de hamster) também foi observada uma diminuição na atividade da enzima NOS após a administração da melatonina (1 pM – 10 nM) (Sáenz *et al.*, 2002).

A melatonina também se liga com alta afinidade (pM a nM) a receptores clássicos membrana (MT₁ e MT₂) (Reppert *et al.*, 1994); a um sítio receptor, muito provavelmente constituído por uma enzima (MT₃) (Nosjean *et al.*, 2000) e a receptores nucleares (Becker-Andre *et al.*, 1994; Garcia-Mauriño, 1998).

A ligação da melatonina em receptores nucleares foi sugerida em ensaios com a linhagem celular de drosófila SL-3, transfectadas com o receptor Z para retinóide β (RZR β). Quando estas células eram incubadas com melatonina, os autores observavam um aumento na expressão dos genes transfectados (Becker-Andre *et al.*, 1994). Também foi observado em ensaios de “binding” em linhagens celulares de epitélio humano (HeLa) que a melatonina liga-se a estes receptores em baixas concentrações, da ordem de nM (Becker-Andre *et al.*, 1994). Em 1997, os mesmos autores publicaram uma retratação, no qual afirmavam que nem todos os experimentos realizados eram reprodutíveis e, portanto, suas conclusões poderiam não ser verdadeiras (Becker-Andre *et al.*, 1997). No entanto, a ligação da melatonina a receptores nucleares tem sido

sugerida em outros modelos, como por exemplo, em células mononucleares do sangue periférico, onde através de ensaios de “binding” e do uso de antagonistas seletivos para os receptores RZR/ROR, foi demonstrada a ligação da melatonina nestes receptores (Garcia-Mauriño, 1998).

Diversas outras ações da melatonina são atribuídas à ligação aos seus receptores de membrana. Os receptores MT₁ e MT₂ pertencem à família de receptores de sete domínios transmembrânicos, acoplados à proteína G (Reppert *et al.*, 1994) e o receptor MT₃, na realidade é a enzima quinona redutase II (Nosjean *et al.*, 2000). Segundo o comitê de nomenclatura IUPHAR este receptor ainda é “grafado” em letras itálicas por não ter sido clonado (Dubocovich *et al.*, 2000).

Os receptores MT₁ e MT₂ apresentam 60% de homologia na sequência de aminoácidos (Reppert *et al.*, 1995), possuem uma alta afinidade para melatonina (faixa pM), além de serem semelhantes quanto à ordem de potência para os seguintes compostos: 2-iodomelatonina > melatonina >> N-acetilserotonina >> serotonina > prazosin (Masana & Dubocovich, 2001). No entanto, o receptor MT₂, é distinguido farmacologicamente do receptor MT₁ através do análogo 4P-PDOT (Dubocovich *et al.*, 1997), visto ser este seletivo para os receptores MT₂, podendo atuar como antagonista competitivo (Hunt *et al.*, 2001) ou agonista parcial (Lotufo *et al.*, 2001).

Um antagonista de melatonina muito utilizado e conhecido na literatura é o luzindol. Este análogo liga-se aos receptores MT₁ e MT₂, porém, em linhagens celulares de ovários de hamster chinês (CHO-K1) transfectadas com o

receptor MT₁ e MT₂ a potência do luzindol para deslocar a ligação da 2-[¹²⁵I]-melatonina do receptor MT₂ ($K_i = 7,3$ nM) foi cerca de 15 vezes maior do que para o receptor MT₁ ($K_i = 180$ nM) (Dubocovich *et al.*, 1998).

Os receptores MT₁ foram inicialmente caracterizados como receptores acoplados a proteína G_i, uma vez que a estimulação por melatonina inibe o aumento de AMPc induzido por forskolina, um ativador da enzima adenilil ciclase (Roka *et al.*, 1999). Posteriormente foi sugerido que pudessem acoplar tanto a proteína G_i, quanto a G_q (Brydon *et al.*, 1999). Estes estudos foram feitos em células HEK 293 transfectadas com cDNA para receptor de melatonina MT₁, nas quais observou-se que a estimulação com melatonina promovia aumento de cálcio e redução da quantidade de AMPc formado por estimulação com forskolina e co-precipitação do receptor com as duas isoformas de proteína G.

O receptor MT₂ também está acoplado à proteína G e quando ativado por melatonina, promove a inibição da adenilil ciclase em linhagens de fibroblasto de camundongos NIH 3T3 (Reppert *et al.*, 1995). Em linhagens celulares HEK 293 transfectadas com o receptor MT₂, foi demonstrado que após a incubação com melatonina, ocorre uma inibição do aumento de GMPc induzido por um inibidor não seletivo da enzima fosfodiesterase (IBMX). Contudo esta inibição não ocorre, quando a melatonina é adicionada nas células transfectadas somente com os receptores MT₁ (Petit *et al.*, 1999).

O receptor de melatonina do subtipo MT₃ apresenta um perfil farmacológico muito diferente dos demais. Possui um análogo seletivo, o 5-MCA-NAT (Molinari *et al.*, 1996) e uma potência maior para a N-

acetilserotonina do que para a própria melatonina. A ordem de potência foi assim descrita: 2-iodomelatonina > prazosin > N-acetilserotonina > 5-MCA-NAT > melatonina >> serotonina (Masana & Dubocovich, 2001). Este receptor, apesar de ter sido inicialmente descrito como um receptor acoplado à proteína G_q (Popova & Dubocovich, 1995), atualmente é aceito que tenha 95% de homologia na estrutura de aminoácidos com a enzima quinona redutase II (Nosjean *et al.*, 2000). Portanto, apenas dois subtipos de receptores de melatonina de mamíferos clonados são receptores de sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G, os subtipos MT₁ e MT₂.

3. Células endoteliais

As células endoteliais são responsáveis pelo controle da homeostasia vascular e de uma forma geral, pela possível interação entre as células sangüíneas e os tecidos. A localização, a capacidade de responder e produzir diferentes moléculas sinalizadoras permite sua participação em diferentes processos fisiológicos e fisiopatológicos (Cook-Mills & Deem, 2005).

Em 1980, Furchgott & Zawadzki demonstraram em aortas de coelhos isoladas que a acetilcolina promovia uma vasodilatação e que este efeito era dependente da presença do endotélio intacto devido à liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio, denominado inicialmente como EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*), e posteriormente caracterizado como óxido nítrico (NO) (Palmer *et al.*, 1987).

O NO modula o sistema vascular atuando na célula muscular lisa e ativando a enzima guanilil ciclase solúvel (GC) que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc e conseqüente vasodilatação (Denninger & Marletta, 1999) (figura 3). A produção de NO se dá a partir da captação do aminoácido L-arginina que é convertido em NO e L-citrulina pela enzima NOS. A ativação de receptores que promovem o aumento de cálcio intracelular em células que possuem as formas constitutivas de NOS leva a formação do complexo cálcio-calmodulina e conseqüente ativação da NOS.

Além de sua função vasodilatadora, o NO participa de outras funções fisiológicas tais como neurotransmissão e também em processos fisiopatológicos, tais como aterosclerose, danos de isquemia/reperfusão, carcinogênese, etc. (para revisão, Bishop & Anderson, 2005).

Figura 3 - Atuação do óxido nítrico (NO) nas células musculares lisas. O NO se difunde pela membrana e atua em outras células ativando guanilil ciclase (GC) e provocando conseqüente formação de GMP cíclico (GMPc).

4. Enzima sintase do óxido nítrico (NOS)

Existem três isoformas da enzima NOS, sendo duas constitutivas, a eNOS (NOS endotelial) e a nNOS (NOS neuronal) e uma isoforma induzível, a iNOS (NOS induzível), que é expressa em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais. Sua ativação independe de cálcio e é regulada por ativação transcricional em resposta, por exemplo, a citocinas como interferon γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α) ou interleucina 1 (IL-1) e também pelo lipopolissacarídeo (LPS) (Heba *et al.*, 2001).

A regulação e ativação da NOS constitutiva (nNOS e eNOS) é dependente da concentração de cálcio e da ligação do cálcio com a calmodulina, sendo estimulada por bradicinina, acetilcolina, ionóforo de cálcio e estradiol como descrito por vários trabalhos (Pittner *et al.*, 2003, Koyama *et al.*, 2002, Yi, 2002; para revisão, Govers & Rabelink, 2001).

5. Bradicinina - mediador da produção de NO por células endoteliais

Entre os vasodilatadores que atuam nas células endoteliais destacam-se as cininas (bradicinina e des-Arg⁹-bradicinina), que são responsáveis por vasodilatação e/ou contração de células endoteliais venulares contribuindo para o extravasamento de fluídos e proteínas plasmáticas (para revisão, Calixto *et al.*, 2000).

Os receptores para as cininas são conhecidos como B₁ e B₂; a bradicinina atua sobre receptores constitutivos B₂ e a des-Arg⁹-bradicinina sobre os receptores B₁ que não são expressos normalmente, sendo induzidos durante a resposta inflamatória (para revisão, Regoli *et al.*, 1998).

Existem várias evidências que apontam a bradicinina como um dos mais importantes mediadores para a regulação do tônus vascular, uma das evidências é pela sua localização, a molécula que origina a bradicinina, é o cininogênio, que apesar de ser encontrada em todo o organismo, existe em maior concentração nas paredes dos vasos sanguíneos, já que é secretada pelas células endoteliais e pela célula muscular lisa dos vasos. A enzima calicreína,

que converte o cininogênio em bradicinina é expresso na superfície também de células musculares lisas dos vasos e nas células endoteliais o que permite uma ação direta da bradicinina na regulação do tônus vascular (Mombouli & Vanhoutte, 1999).

Santos *et al.* (2003) demonstraram a ação da bradicinina sobre a migração de neutrófilos para sítios inflamatórios, através da ativação de receptores B₂, resultando em síntese e/ou liberação de TNF- α , IL-1 β e ativação de integrinas, o que também foi demonstrado por outros trabalhos descritos na literatura (Graham *et al.*, 1965; Campos *et al.*, 2002). Os principais efeitos provocados pela bradicinina são originados, por sua capacidade de ao se ligar no receptor, provocar uma cascata de reações intracelulares resultando no aumento da concentração de cálcio intracelular ([Ca²⁺]_i).

O cálcio é indispensável na regulação de enzimas, proteínas de transporte e canais iônicos. A maioria de suas ações é dependente de proteínas de ligação, que tem como função, intermediar o cálcio e a proteína a ser regulada, sendo a calmodulina, um dos exemplos mais marcantes. A interação cálcio-calmodulina participa na secreção de grânulos por mastócitos (Ohishi *et al.*, 1985), ativação e migração de monócitos, macrófagos e neutrófilos (Singh & Sodhi, 1999; Hu *et al.*, 2000), e na produção de NO por enzima constitutiva (Koyama *et al.*, 2002).

O receptor B₂ é um receptor acoplado à proteína G que pode ser encontrado em células endoteliais e quando ativado leva a ativação da fosfolipase C (PLC) gerando IP₃, o que resulta na liberação de cálcio de estoques

intracelulares e conseqüente produção de NO. A enzima eNOS foi localizada através de ensaios de “imunoblotting” nas cavéolas de células endoteliais em cultura (Shaul *et al.*, 1996). Cavéolas são invaginações da membrana encontradas principalmente em células endoteliais, adipócitos, fibroblastos e células musculares lisas, que tem como característica, uma grande quantidade de proteínas de membranas, denominadas caveolinas. Estas proteínas são importantes para a sinalização celular por manterem todas as proteínas sinalizadoras próximas por “ancoramento”, o que permite uma resposta, principalmente rápida e bem direcionada (Parton, 1996; Couet *et al.*, 1997). Ju *et al.* (1998) demonstraram por ensaios de “binding” *in vitro* que o receptor B₂ e a enzima eNOS na fase inativa estão co-localizados em forma de complexos na cavéola, e a ativação do receptor B₂ por bradicinina promove a dissociação do complexo, e coincidente ativação catalítica da eNOS (figura 4). Além disso, também está co-localizada com o receptor B₂ e a eNOS, o transportador de aminoácidos CAT-1, que está envolvido na captação e no transporte do aminoácido L-arginina para dentro da célula (Ju *et al.*, 1998).

Um outro fator envolvido na ativação da eNOS na cavéola de células endoteliais é a formação de um complexo da própria cavéola pelas caveolinas com a enzima eNOS, o que provoca a inibição da eNOS, sendo que este complexo, é dissociado na presença de cálcio-calmodulina, o que também permite a ativação da eNOS e conseqüente produção de NO (Michel *et al.*, 1997).

Figura 4 – Modelo demonstrando a cavéola da membrana de células endoteliais e a localização do receptor B₂ (B2R) e da enzima eNOS. A ativação do receptor por bradicinina (BK) promove a liberação de cálcio do retículo endoplasmático (ER) através da formação de IP₃, o que promove o aumento da formação de cálcio-calmodulina, resultando na ativação da eNOS e formação de NO.

6. Efeitos de Melatonina em Células Endoteliais

Poucos trabalhos na literatura referem os efeitos da melatonina sobre células endoteliais isoladas ou sobre as funções exercidas. Os poucos trabalhos relatam efeitos fisiológicos, como controle do tônus vascular, ou fisiopatológicos, como interação neutrófilo-endotélio, durante o processo inflamatório agudo.

A modulação do tônus vascular pela melatonina é dependente do modelo em estudo. Na ausência de endotélio, a melatonina atua sobre as células musculares lisas da artéria caudal de ratos, através de dois receptores distintos, que desencadeiam efeitos antagônicos. A ativação de receptores do subtipo MT₁ promove a potencialização da vasoconstrição, enquanto a ativação dos receptores MT₂ promove a vasodilatação (Doolen *et al.*, 1998, Masana *et al.*, 2002, Ersahin *et al.*, 2002). Contudo os mesmos autores demonstraram haver marcação para o RNAm dos receptores MT₁ e MT₂ tanto na túnica média (camada de músculo liso vascular) como na túnica íntima (camada de células endoteliais).

A melatonina (1 a 100 nM) potencia a vasoconstrição induzida por noradrenalina em artérias mamárias internas de humanos (Müller-Schweinitzer *et al.*, 2004) e nas concentrações de 1 e 10 µM potencia a vasoconstrição induzida por prostaglandina F_{2α} em artéria umbilical humana (Okatani *et al.*, 2001) sendo que estes efeitos são dependentes de endotélio intacto. Em artérias coronárias isoladas de suínos a melatonina (100 nM) potencia a vasoconstrição induzida por serotonina, sendo que este efeito desaparece após a remoção do endotélio (Yang *et al.*, 2001). De acordo com estes dados, podemos concluir que a melatonina modula o tônus vascular por ações diretas sobre o músculo liso e também através de efeitos dependentes de células endoteliais.

Estudos de processos fisiopatológicos sobre a interação neutrófilo-endotélio “*in vivo*” em ratos, indicam a presença de receptores de melatonina do

subtipo MT_2 e MT_3 em células endoteliais de veias pós-capilares. Esta interação é importante na fisiopatologia, por permitir a migração de neutrófilos para o tecido durante o processo inflamatório. A melatonina e análogos diminuem o rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio. Nos ensaios de rolamento, a melatonina inibe o rolamento de neutrófilos com maior potência que o análogo seletivo para os receptores MT_2 (4P-PDOT). O precursor da melatonina, N-acetilserotonina e o agonista seletivo para os receptores MT_3 , 5-MCA-NAT, não inibem o rolamento. Além disso, a adição do antagonista não seletivo luzindol (10 μ M), reverte o efeito da melatonina (Lotufo *et al.*, 2001). Por outro lado, nos ensaios de adesão de neutrófilo-endotélio, a N-acetilserotonina é mais potente que 5-MCA-NAT e este, mais potente que a melatonina, enquanto 4P-PDOT não produziu efeito (Lotufo *et al.*, 2001). De acordo com estes dados, a melatonina atua através de dois receptores distintos sobre o rolamento e a adesão de neutrófilos. Os receptores do subtipo MT_2 modulam o rolamento de neutrófilos, enquanto a ativação de receptores MT_3 resulta em inibição da adesão estimulada por leucotrieno B_4 . Considerando que rolamento e adesão de neutrófilos sobre o endotélio são mecanismos subjacentes ao aumento de permeabilidade celular presente em processos inflamatórios agudos, o fato da melatonina apenas bloquear o aumento de permeabilidade vascular induzido por leucotrieno B_4 e não alterar o aumento induzido por fMLP fortemente sugere que estes efeitos são resultantes de uma ação sobre o endotélio e não sobre os neutrófilos (Lotufo, 2003).

Em resumo, os estudos acima descritos, onde foram estudados efeitos da melatonina sobre a modulação do tônus vascular, ou sobre a interação com leucócitos sugerem que este hormônio atue diretamente sobre as células endoteliais. No entanto, até o presente momento, a ação da melatonina sobre as células endoteliais em cultura ainda não foi investigada, impedindo que se conheça de forma mais direta o efeito deste hormônio sobre as mesmas.

II - OBJETIVOS

Avaliar o efeito da melatonina sobre a resposta de células endoteliais em cultura estimuladas por bradicinina.

1. Verificar o efeito da melatonina sobre a variação da concentração de NO intracelular estimulado por bradicinina em microscopia confocal.
2. Verificar o efeito da melatonina na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) estimulado por bradicinina em microscopia confocal.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Ratos Wistar machos adultos (3,5 a 5 meses). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 h, recebendo ração e água *ad libitum*.

2. Reagentes

Melatonina (Sigma), N-acetilserotonina (Sigma), Luzindol (Sigma), Bradicinina (Sigma), 4P-PDOT (Tocris), 5-MCA-NAT (Tocris), Calmidazolium (Sigma), DAF-FM (4-amina-5-metilamina-2',7'-difluorosceína diacetato) (Molecular Probes), Fluo-3 AM (Molecular Probes), DMEM (GIBCO), Soro Fetal Bovino (GIBCO), PECAM-1 (BD Biosciences Pharmingen). Todos os demais reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítico.

A melatonina e N-acetilserotonina foram diluídas inicialmente em etanol, sendo estocadas na concentração de 10 mM em etanol 10%. O luzindol, o 4-P-PDOT e o 5-MCA-NAT foram diluídos e estocados na concentração de 10 mM em etanol 100%. A bradicinina (10 mM) foi diluída em ácido acético 5%. DAF-FM e Fluo-3 AM foram estocados na concentração de 1 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. PECAM-1 foi diluído em azida sódica 0,09%.

3. Cultura de células endoteliais

A obtenção de células endoteliais da microcirculação foi realizada segundo protocolo descrito por Chen *et al.* (1995). Os ratos foram anestesiados por inalação de éter etílico e decapitados. O animal foi banhado em etanol 70% e os tecidos (cremaster) retirados em ambiente estéril (fluxo laminar). Os tecidos foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) (composição: NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, NaH₂PO₄H₂O 2 mM e KCl 5 mM) e cortados em pequenos cubos (aproximadamente 2 x 2 x 2 mm). Dois cubos foram colocados em cada poço da placa de 24 poços, e após 2 a 5 minutos, foram cobertos com meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, NaHCO₃ (44 mM) e gentamicina (40 mg/l) (pH 7,4). De acordo com trabalhos executados anteriormente em nosso laboratório o tempo entre colocar os pedaços de tecido na placa e adicionar o soro mostrou-se necessário e importante para que o pedaço fique aderido ao fundo da placa, levando a um aumento na quantidade de células obtidas.

As placas foram mantidas em estufas (37°C, 5% CO₂) e os pedaços de tecidos foram retirados após 48 horas e o meio parcialmente substituído. Segundo os autores, apenas células sanguíneas e endoteliais deixam o tecido neste período, sendo que as células sanguíneas são excluídas após uma ou duas passagens. As células foram subcultivadas utilizando a enzima pancreatina (GIBCO), que é menos agressiva às células do que a tripsina, utilizada pelos autores do método. As células endoteliais da primeira ou segunda passagem foram utilizadas nos ensaios de microscopia confocal.

As células endoteliais foram caracterizadas através da imunoreatividade ao anticorpo monoclonal contra PECAM-1 de rato (CD 31) (0,1 µg/10⁶ células) conjugado com R-ficoeritrina.

4. Determinação da concentração de NO intracelular por microscopia confocal

Células endoteliais (200µl, aproximadamente 10⁵ células/ml) plaqueadas em lamínulas de vidro coladas no fundo de placas com 14 mm de diâmetro (MatTek Corporation) foram mantidas por 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período as células foram lavadas com DMEM sem soro fetal bovino e carregadas por 50 minutos, com o indicador de NO DAF-FM diacetato, na concentração de 5 µM (37°C, 5% CO₂) e lavadas por duas vezes consecutivas com DMEM. Estas células eram utilizadas para medida da concentração intracelular de NO em um período de até 2 horas.

Foram selecionados campos contendo aproximadamente de 3 a 8 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliada através do programa LSM 510 (Zeiss). Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X), sendo utilizado um laser argônio para excitação do fluoróforo no comprimento de onda de 488 nm (intensidade - 4,3 mW; pinhole - 721 µm)e um filtro para emissão em 515-530 nm.

Após cada um dos experimentos, foi adicionado 1 mM de nitroprussiato de sódio (doador de NO) nas células endoteliais, como um controle positivo de fluorescência e NO.

5. Avaliação da $[Ca^{2+}]_i$ através de microscopia confocal

Células endoteliais cultivadas por 48 horas, como mencionado no item anterior, foram lavadas com tampão Krebs-Hepes (NaCl 120 mM; KCl 4,8 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; $MgSO_4$ 1,2 mM; $CaCl_2$ 1,3 mM; HEPES 25 mM e 0,1 % de albumina sérica bovina) e carregadas com o indicador de Ca^{2+} Fluo 3 (Molecular Probes) por incubação com a forma acetoximetil éster (5 μ M, 50 minutos a temperatura ambiente) seguida de duas lavagens consecutivas. Estas lâminas foram analisadas em seguida.

Foram selecionados campos contendo aproximadamente de 3 a 8 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliada através do programa LSM 510 (Zeiss). Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X), foi utilizado um laser argônio para excitação em 488 nm (4,3 mW; pinhole - 721 μ m, parâmetros utilizados em todos os experimentos) e um filtro para emissão em 515-530 nm.

6. Análise estatística

O número experimental foi computado a partir do número de culturas independentes e, em cada cultura foram avaliadas três placas, sendo que em cada placa foi acompanhado o registro de 3 a 5 células.

Todos os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) a partir do aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima da bradicinina. O teste

estatístico utilizado foi o teste t de Student e as amostras foram consideradas diferentes com uma probabilidade de $p < 0.05$.

Para a análise das curvas concentração-resposta individuais utilizamos a regressão não-linear considerando uma única população de receptores. Os valores dos parâmetros farmacológicos pD_2 (logaritmo negativo da concentração de bradicinina que promove 50% do efeito máximo) e E_{max} (efeito máximo da bradicinina) foram calculados pelo software GraphPad Prism 4.0. Para a obtenção dos valores médios, foram computados os valores individuais para cada célula e a partir destes valores foram calculadas a média e a medida de dispersão (EPM).

IV - RESULTADOS

1. Caracterização de células endoteliais de ratos em cultura

As células cultivadas foram todas marcadas com anticorpo para a molécula de adesão PECAM-1, o que caracteriza estas como células endoteliais (figura 5).

Figura 5 – Imagens de células endoteliais em cultura. A). Contraste de fase; B)

Incubadas com anticorpo de ratos PECAM-1 (CD 31).

2. Padronização da metodologia para determinar a concentração intracelular de NO por microscopia confocal

Esta padronização visou estabelecer a forma de adição das ferramentas farmacológicas e o tempo de aquisição dos dados.

As células foram, inicialmente, mantidas em placas que continham 100 μ l de meio de cultura e o fármaco (bradicinina) foi adicionado em um volume de 100 μ l com o dobro da concentração final (5 nM, 50 nM ou 1 μ M). As imagens foram adquiridas a cada 10 segundos por um total de 800 segundos (figura 6).

Nas três concentrações de bradicinina utilizadas o aumento máximo foi atingido em aproximadamente 100 segundos, sendo que a resposta máxima ao agonista foi observada com a concentração de 50 nM. A concentração de 5 nM promoveu um aumento de aproximadamente 50% da resposta máxima.

Figura 6 - Aumento da concentração de óxido nítrico intracelular em células endoteliais em cultura estimuladas por bradicinina (BK), nas concentrações de 5 nM, 50 nM e 1 µM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima obtida com bradicinina. Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 - 5 células

O passo seguinte foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de bradicinina (100, 200, 400 e 800 nM), mantendo 180 µl de DMEM na lamínula e adicionando 20 µl de bradicinina por concentração, todas as concentrações foram adicionadas cumulativamente sempre em concentrações crescentes.

A primeira concentração foi adicionada após 10 segundos de registro e o restante das concentrações foram adicionadas a cada 40 segundos e o intervalo entre a obtenção de cada imagem foi de 2 segundos e não mais 10 segundos. Na figura 7 verificamos que a bradicinina 100 nM aumentou significativamente a fluorescência a um nível superior a 80% da resposta máxima porque foi interrompido pela adição da segunda concentração (200 nM). As concentrações de 400 e 800 nM foram supramáximas, podendo inclusive levar a uma perda de fluorescência. Este experimento indicou que o intervalo entre as adições das sucessivas concentrações deve ser maior, para que o equilíbrio possa ser atingido.

Figura 7 - Aumento da concentração de óxido nítrico intracelular em células endoteliais em cultura estimuladas por concentrações cumulativas de bradicinina (BK) (100, 200, 400 e 800 nM) com intervalo de 40 segundos entre cada concentração. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima obtida com bradicinina. Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

Em seguida ampliamos o tempo para registro da fluorescência basal (30 segundos) e o intervalo entre as adições sucessivas de bradicinina (60 segundos, figura 8).

Figura 8 - Aumento da concentração de óxido nítrico intracelular em células endoteliais em cultura estimuladas por concentrações cumulativas de bradicinina (BK) (100, 200, 400 e 800 nM). Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima obtida com bradicinina. Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

Este ensaio demonstrou que bradicinina 100 nM provoca o aumento máximo da concentração de NO intracelular, e o aumento registrado na concentração seguinte (200 nM), foi praticamente nulo. Nas concentrações subseqüentes, houve até um pequeno decréscimo de fluorescência. Estes

resultados indicaram que o intervalo de tempo para atingir o pico de resposta é de 60 segundos.

Para finalizar a padronização do ensaio foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas (1, 3, 10, 30 e 100 nM, figura 9). A bradicinina induziu de forma concentração-dependente o aumento da fluorescência ($pD_2 = 8,07 \pm 0,09$, $E_{max} = 103,5 \pm 5$, $n = 4$), sendo o aumento máximo detectado na concentração de 100 nM. A diferença entre os valores absolutos de fluorescência basal e a bradicinina 100 nM, foi de 20 vezes, permitindo uma excelente definição de resposta. Portanto, os experimentos seguintes foram realizados com a adição de bradicinina de forma cumulativa (1, 3, 10, 30 e 100 nM) com 60 segundos de intervalo entre cada concentração.

Figura 9 – Aumento da concentração de óxido nítrico intracelular em células endoteliais em cultura estimuladas por concentrações cumulativas de bradicinina (BK) (1, 3, 10, 30 e 100 nM). Na figura A estão representados todos os pontos da curva e na figura B apenas os pontos de resposta máxima obtidos em cada concentração. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima obtida com bradicinina. Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

Na figura 10, são apresentados registros típicos do aumento induzido pelo doador de NO, nitroprussiato de sódio, na concentração de 1 mM que foi adicionado ao final de cada um dos experimentos.

Figura 10 - Células endoteliais incubadas com o indicador fluorescente de óxido nítrico intracelular DAF-FM (5 μ M / 50 min). Imagens obtidas no microscópio confocal todas de um mesmo campo. A) Imagem de contraste fase. B) Registro da fluorescência basal. C) Após 6 minutos da adição de nitroprussiato de sódio 1 mM.

Finalizando a caracterização do sistema em estudo foi avaliado a inibição da NOS por calmidazolium, um clássico bloqueador de calmodulina, (Schini & Vanhoutte, 1992). As células endoteliais foram pré-incubadas por 10 min. com calmidazolium, na concentração de 10 μ M, seguido da adição de bradicinina (1, 3, 10, 30 e 100 nM). O calmidazolium inibiu totalmente o aumento de óxido nítrico induzido por bradicinina (figura 11). Observamos ainda, uma diminuição dos níveis basais de NO conforme as concentrações de bradicinina eram adicionadas.

Figura 11 – Efeito do calmidazolium (10 µM) sobre o aumento da concentração intracelular de óxido nítrico induzido por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de NO foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular DAF-FM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de calmidazolium). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

3. Efeito da melatonina e análogos, sobre o aumento de NO induzido por bradicinina

O passo seguinte foi avaliar o efeito produzido por diferentes tempos de incubação de melatonina 10 nM sobre o aumento de fluorescência induzido por bradicinina 100 nM. Diferentes células, em lamínulas independentes, foram pré-incubadas com melatonina (10 nM) por 30 segundos, 10 minutos e 30 minutos.

Antes do término dos diferentes tempos de pré-incubação com melatonina, a aquisição dos dados no microscópio confocal foi iniciada. A bradicinina (100 nM) foi adicionada ao final de cada um dos tempos, e os níveis de fluorescência registrados (figura 12).

Os resultados da figura 12 demonstraram que a melatonina na concentração de 10 nM promoveu uma inibição do aumento de NO intracelular induzido por bradicinina em todos os tempos de pré-incubação testados.

Figura 12 - Efeito da melatonina (MEL) na concentração de 10 nM com diferentes tempos de pré-incubação (30 seg, 10 min e 30 min) sobre o aumento da concentração de óxido nítrico intracelular em células endoteliais em cultura induzido por bradicinina (BK) (100 nM). Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de melatonina). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 - 5 células.

O efeito de concentrações menores de melatonina (0,1 e 1 nM) pré-incubadas por 1 min sobre células endoteliais e seguidas da adição de bradicinina (1, 3, 10, 30 e 100 nM), está demonstrado na figura 13.

Melatonina na concentração de 0,1 nM não afetou o aumento concentração-dependente induzido por bradicinina, no entanto, a adição de melatonina na concentração de 1 nM por 1 min, inibiu quase que totalmente o aumento de NO intracelular induzido por bradicinina nas células endoteliais. Nesta concentração a melatonina reduziu o efeito máximo da bradicinina sem alterar o valor de pD_2 (Tabela 1).

Figura 13 - Efeito da melatonina (MEL) sobre o aumento da concentração intracelular de óxido nítrico induzido por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de NO foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular DAF-FM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de melatonina). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

Tabela 1 - Efeito da melatonina sobre os parâmetros farmacológicos da bradicinina em células endoteliais em cultura.

Condição	pD ₂	E _{max}	N
Controle	8,14 ± 0,05	108,40 ± 1,01	4
MEL 0,1 nM	8,27 ± 0,20	102,10 ± 6,65	3
MEL 1 nM	ND	9,04 ± 4,36*	3

*significativamente diferente do controle (p < 0,001) Teste *t* de Student.

ND - não determinável; MEL - melatonina

Posteriormente, foi avaliado o efeito do precursor da melatonina, a N-acetilserotonina, também pré-incubado por 1 min seguido da adição de bradicinina (1, 3, 10, 30 e 100 nM) nas células endoteliais. Ao contrário da melatonina, a N-acetilserotonina inibiu tanto na concentração de 1 nM, quanto na concentração de 0,1 nM o aumento máximo de NO intracelular estimulado por bradicinina (figura 14). Apenas na concentração 0,01 nM a N-acetilserotonina não alterou significativamente o E_{max} da bradicinina. Desta forma, a N-acetilserotonina mostrou-se cerca de 10 vezes mais eficaz do que a melatonina quanto à inibição do efeito da bradicinina. (Tabela 2).

Figura 14 – Efeito da N-acetilserotonina (NAS) nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 nM sobre o aumento da concentração intracelular de óxido nítrico induzido por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de NO foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular DAF-FM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de N-acetilserotonina). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

Tabela 2 – Efeito da N-acetilserotonina sobre os parâmetros farmacológicos da bradicinina em células endoteliais em cultura.

Condição	pD ₂	E _{max}	N
Controle	8,07 $\pm$ 0,12	102,2 $\pm$ 2,7	3
NAS 0,01 nM	8,47 $\pm$ 0,22	105,5 $\pm$ 3,8	3
NAS 0,1 nM	ND	ND	3
NAS 1 nM	ND	ND	3

ND (não determinável); NAS – N-acetilserotonina

Para verificar se a ação da melatonina e do precursor N-acetilserotonina seria mediada pela ativação dos receptores MT_3 , utilizou-se o análogo seletivo 5-MCA-NAT. Este, adicionado 1 minuto antes da adição de bradicinina nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 nM, não alterou sobre o aumento de NO induzido por bradicinina (figura 15, Tabela 3).

Figura 15 - Efeito do 5-MCA-NAT nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 nM sobre o aumento da concentração intracelular de óxido nítrico induzido por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de NO foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular DAF-FM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de 5-MCA-NAT). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

Tabela 3 - Efeito do 5-MCA-NAT sobre os parâmetros farmacológicos da bradicinina em células endoteliais em cultura.

Condição	pD ₂	E _{max}	N
Controle	8,09 $\pm$ 0,14	105,0 $\pm$ 4,7	3
5-MCA-NAT 0,01 nM	8,63 $\pm$ 0,16	95,36 $\pm$ 2,9	3
5-MCA-NAT 0,1 nM	7,82 $\pm$ 0,13	113,7 $\pm$ 6,3	3
5-MCA-NAT 1 nM	8,25 $\pm$ 0,12	97,87 $\pm$ 3,2	3

Para testar se o efeito era mediado por receptores MT_2 foi utilizado o ligante seletivo 4P-PDOT, que em ensaios de adesão de leucócitos a células endoteliais apresentou efeito de agonista parcial (Lotufo *et al.*, 2001). Este ligante, mesmo na concentração de 100 nM, não modificou a produção de NO induzida por bradicinina (figura 16, Tabela 4).

Figura 16 - Efeito do 4P-PDOT (100 nM) sobre o aumento da concentração intracelular de óxido nítrico induzido por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de NO foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular DAF-FM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de 4P-PDOT). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 - 5 células.

Tabela 4 - Efeito do 4P-PDOT sobre os parâmetros farmacológicos da bradicinina em células endoteliais em cultura.

Condição	pD ₂	E _{max}	N
Controle	8,37 ± 0,17	94,05 ± 4,99	3
4P-PDOT 100 nM	8,19 ± 0,07	98,42 ± 5,46	3

Em seguida, o antagonista de receptores MT₁ e MT₂, luzindol, foi pré-incubado na concentração de 10 µM por 1 hora, seguido da adição de melatonina na concentração de 1 nM por 1 minuto. Logo após este tempo, as concentrações cumulativas de bradicinina foram adicionadas. Observamos na figura 17 que o luzindol não reverteu o efeito inibitório da melatonina sobre o aumento de NO induzido por bradicinina.

Figura 17 - Efeito do luzindol (10 µM) sobre a inibição induzida por melatonina (1 nM) (MEL) na produção de óxido nítrico. A produção de NO foi estimulada por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de NO foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular DAF-FM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na ausência de luzindol+MEL). Os dados representam média ± EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 - 5 células.

4. Avaliação da $[Ca^{2+}]_i$ através de microscopia confocal

A bradicinina induz o aumento de NO pela liberação de cálcio de estoques intracelulares em células endoteliais. Para avaliarmos um possível efeito inibitório da melatonina sobre o aumento de cálcio que poderia resultar indiretamente na inibição da NOS, avaliamos o efeito da bradicinina no aumento de cálcio intracelular na ausência e presença de melatonina.

A melatonina (0,1 e 1 nM) foi pré-incubada por 1 minuto antes da adição cumulativa de bradicinina (1, 3, 10, 30 e 100 nM) com 60 segundos de intervalo entre cada concentração. Na figura 18 está demonstrado um registro típico obtido a partir de células endoteliais incubadas com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM, antes (Figura 18-B) e após (Figura 18-C) a adição da bradicinina de forma cumulativa. O aumento máximo foi observado na concentração de 100 nM de bradicinina, e a diferença entre os valores absolutos registrados com a adição de bradicinina 100 nM e o basal foi de aproximadamente 200 vezes.

O efeito da melatonina (0,1 e 1 nM) sobre o aumento da concentração de cálcio intracelular estimulado por bradicinina está demonstrado na figura 19.

Figura 18 - Células endoteliais incubadas com o indicador fluorescente de cálcio intracelular Fluo-3 AM (5 μ M / 50 min). Imagens obtidas no microscópio confocal todas de um mesmo campo. A) Imagem de contraste fase. B) Registro da fluorescência basal. C) Após a adição de concentrações cumulativas de bradicinina alcançando a concentração 100 nM.

Figura 19 - Efeito da melatonina (MEL) nas concentrações de 0,1 e 1 nM sobre o aumento da concentração intracelular de cálcio induzido por adição cumulativa de bradicinina (BK) em células endoteliais em cultura. A concentração de Ca^{2+} foi medida a partir da fluorescência emitida pelo indicador intracelular Fluo-3 AM. Os dados são apresentados como aumento percentual da fluorescência emitida na ausência de bradicinina normalizada pela resposta máxima do controle (curva de bradicinina na

ausência de melatonina). Os dados representam média $\pm$ EPM de 3 culturas, onde foram medidas de 3 – 5 células.

A melatonina nas concentrações de 0,1 e 1 nM não o alterou o efeito máximo nem o pD_2 da bradicinina (tabela 5).

Tabela 5 – Efeito da melatonina sobre o aumento de cálcio induzido por bradicinina em células endoteliais em cultura .

Condição	pD_2	E_{max}	N
Controle	$7,86 \pm 0,06$	$118,2 \pm 4,4$	3
MEL 0,1 nM	$7,86 \pm 0,06$	$116,3 \pm 4,06$	3
MEL 1 nM	$7,95 \pm 0,06$	$117,2 \pm 4,2$	3

MEL - melatonina

V - DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos o efeito da melatonina sobre o aumento de óxido nítrico e cálcio intracelular induzido por bradicinina em células endoteliais. A bradicinina é um nonapeptídeo produzido a partir de um precursor plasmático com relevância na regulação fisiológica e fisiopatológica de células endoteliais. Sua principal via de transdução é a formação de NO por ativação da isoforma constitutiva, eNOS (Mombouli & Vanhoutte, 1999).

O NO produzido a partir da enzima eNOS está relacionado principalmente a funções fisiológicas do organismo, mais especificamente, sobre a modulação do sistema vascular. Como exemplo, o NO modula o fluxo sangüíneo e a agregação plaquetária (Gardiner *et al.*, 1990). Em condições fisiopatológicas, as células endoteliais produzem NO através da ativação da iNOS (enzima induzida), provocando vasodilatação e hiperemia. Além disso, o NO está relacionado com a eliminação dos microorganismos invasores, com a indução de apoptose e danos ao DNA (para revisão, Guzik *et al.*, 2003).

A utilização de células endoteliais em cultura permite a visualização da resposta de diversos agentes de maneira direta, sem a interferência de outros tipos celulares. A caracterização destas células pode ser realizada através da expressão de PECAM-1 (CD 31) (Dong *et al.*, 1997) que é uma molécula de adesão característica e constitutivamente expressa em células endoteliais. As células usadas no presente trabalho foram caracterizadas como células endoteliais.

A produção de NO induzida por bradicinina em células endoteliais isoladas têm sido determinada utilizando diferentes concentrações do agonista, que variam de 10 pM até 10 μ M (Prabhakar *et al.*, 1998), sendo as mais utilizadas de 100 nM e 1 μ M (Prabhakar *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 1999; Marrero *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 2002; Sun & Liao, 2002). Estes estudos utilizaram diferentes técnicas para aferir a produção de NO, tais como, utilização de marcadores fluorescentes de NO e visualização em microscópio de fluorescência (Kojima *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 2002); translocação da enzima eNOS da membrana para o citoplasma (Prabhakar *et al.*, 1998); produção de GMPc (Marrero *et al.*, 1999); e conversão de L-[3 H] arginina para L-[3 H] citrulina (Sun & Liao, 2002).

Para que pudéssemos trabalhar com concentrações efetivas e não concentração supramáxima de bradicinina, inicialmente realizamos ensaios de padronização utilizando uma grande faixa de concentração (5 nM, 50 nM e 1 μ M). O tempo de exposição ao agonista utilizado neste primeiro ensaio foi de 800 segundos, seguindo os protocolos experimentais realizados em células endoteliais de aorta bovina (Kojima *et al.*, 1999, Ndiaye *et al.*, 2005). Em células endoteliais de ratos o efeito máximo foi observado após 100 seg. com as concentrações de 50 nM e 1 μ M, enquanto que em aorta de bovinos o efeito máximo foi observado após 800 segundos. Por outro lado, Prabhakar *et al.* (1998) observando a translocação da enzima eNOS da membrana para o citoplasma de células endoteliais de aorta de bovinos determinaram um efeito máximo na concentração de 50 nM e com 100 segundos de exposição do

agonista. Da mesma forma que o observado neste trabalho, o efeito máximo era mantido com a concentração de 1 μ M.

Em seguida testamos o tempo de exposição à bradicinina na curva cumulativa. Nestas condições foram adicionadas concentrações crescentes para que fossem atingidas as concentrações finais de 100, 200, 400 e 800 nM. O intervalo entre as concentrações foi de 40 ou 60 segundos. Vale mencionar que durante a execução da curva concentração-resposta não é possível visualizar o resultado. Com o intervalo de 40 segundos, a concentração de 100 nM apresentou uma resposta muito abaixo da resposta máxima e que apenas a concentração de 200 nM permitiu atingir este efeito. Contudo, ao aumentarmos o tempo de contato para 60 segundos, a concentração de 100 nM já apresentava a resposta máxima, e, portanto tínhamos atingido condição de equilíbrio entre a interação agonista-receptor.

Tendo determinado o efeito máximo e o tempo de equilíbrio, construímos curvas concentração-resposta no intervalo de 0,5 unidades logarítmicas (1, 3, 10, 30 e 100 nM), que é característico para a interação de agonistas com receptores acoplados à proteína G (Giraldo *et al.*, 2002). Confirmando dados da literatura obtidos em outros modelos celulares (Prabhakar *et al.*, 1998; Marrero *et al.*, 1999), em células endoteliais de ratos a diferença entre o valor absoluto basal e máximo (100 nM bradicinina) de NO é de aproximadamente 20 vezes. Este diferencial permite termos uma boa resolução para avaliar a interação de drogas. Em resumo, esta padronização permitiu caracterizar uma condição ótima de obtenção de curvas concentração-

resposta de bradicinina quanto à produção de NO em células endoteliais de ratos.

A melatonina é um hormônio lipofílico de ação pleiotrópica que atua por diferentes mecanismos de ação. A ação deste hormônio em células endoteliais inibe a interação neutrófilo-endotélio (Lotufo, 2003) e modula o tônus vascular (ver Introdução). Considerando a enzima NOS constitutiva, a melatonina inibe a produção de NO em cerebelo (Pozo *et al.*, 1997), hipotálamo (Bettahi *et al.*, 1996) e cérebro de ratos (León *et al.*, 2000) e também em retinas de hamster (Sáenz *et al.*, 2002). A produção de NO, via NOS induzida, também é inibida por melatonina em macrófagos de camundongo (Gilad *et al.*, 1998) e ratos (Cuzzocrea *et al.*, 1998). Os mecanismos de ação propostos para inibição das enzimas constitutivas e da induzida são diferentes. No primeiro caso há sugestão de inibição da calmodulina (Pozo *et al.*, 1997) e no segundo do fator de transcrição NFκB (Gilad *et al.*, 1998).

Neste trabalho, demonstramos uma ação direta da melatonina sobre a produção de óxido nítrico induzido por bradicinina em células endoteliais em cultura. O efeito máximo da melatonina (10 nM) já é observado a partir de 30 segundos de incubação e se mantém até 30 minutos. Nos ensaios em que é medida a acumulação de citrulina, a melatonina tem sido em geral incubada por 15-30 minutos (Pozo *et al.*, 1997; Gilad *et al.*, 1998; León *et al.*, 2000; Sáenz *et al.*, 2002), enquanto os ensaios funcionais nos quais são registradas as contrações de músculos lisos, a melatonina é adicionada juntamente e/ou em

um tempo menor com o agonista que deve induzir o relaxamento da preparação (Doolen *et al.*, 1998; Okatani *et al.*, 2000).

Nossos ensaios seguintes foram realizados com o tempo de incubação de 1 minuto, devido à facilidade experimental (adição da droga).

Após estes ensaios de padronização, verificamos o efeito da melatonina nas concentrações de 0,1 e 1 nM, sobre a produção de NO induzido por bradicinina. A concentração de 0,1 nM ficou abaixo do limiar, enquanto a concentração de 1 nM inibiu totalmente a produção de NO induzida por bradicinina. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em retina de hamster (Sáenz *et al.*, 2002) e hipotálamo (Bettahi *et al.*, 1996), cerebelo (Pozo *et al.*, 1997) e cérebro de ratos (León *et al.*, 2000), onde foi avaliada a capacidade da melatonina em inibir a produção de NO catalisada por enzima constitutiva. Considerando que a faixa de concentração nanomolar da melatonina pode ser encontrada em ratos e humanos durante o pico noturno de melatonina (Vakkuri *et al.*, 1984; Claustrat *et al.*, 1986), este efeito inibitório da concentração de 1 nM pode ter relevância fisiológica.

A produção de NO induzida por bradicinina em células endoteliais depende de liberação de cálcio de estoques intracelulares que é induzida pela ativação da fosfolipase C (Lambert *et al.*, 1986). A ação da melatonina sobre esta via de transdução é controversa, tendo sido descrita tanto uma ativação em células de linhagem embrionária de rim humano (HEK 293) (Brydon *et al.*, 1999), quanto uma inibição em células da hipófise de ratos (Zemkova & Vanecek, 2000). Em ambos os casos, a mediação da fosfolipase C é

demonstrada, sendo que no primeiro, a melatonina ativa a fosfolipase C, e no segundo, ocorre a inibição desta enzima. No presente trabalho, verificamos que a adição de melatonina (0,1 e 1 nM), não induz nenhuma alteração nos níveis de cálcio e também não provoca nenhuma alteração no aumento de cálcio intracelular após a estimulação com bradicinina. Portanto, a inibição da produção de NO induzida por melatonina não depende de um bloqueio do aumento da concentração de cálcio intracelular induzida por bradicinina.

Um outro importante mecanismo envolvido na produção de óxido nítrico por bradicinina, após o aumento de cálcio intracelular, é a formação de um complexo cálcio-calmodulina que promove a ativação direta da sintase do óxido nítrico, mais especificamente, da enzima eNOS (Koyama *et al.*, 2002). A bradicinina foi adicionada de forma cumulativa em células endoteliais pré-incubadas com calmidazolium, um bloqueador de calmodulina, e observamos que este bloqueador inibe totalmente o efeito da bradicinina no aumento de NO. Desta forma pode ser excluída qualquer possibilidade da bradicinina aumentar os níveis celulares de NO de maneira independente do complexo cálcio-calmodulina, como o aumento da atividade da NOS induzida (Schini & Vanhoutte, 1992; Heba *et al.*, 2001), além do que neste modelo a expressão da iNOS não seria esperada uma vez que as células foram mantidas em condições assépticas e em presença do antibiótico gentamicina.

O precursor da melatonina, a N-acetilserotonina, também inibe a produção de óxido nítrico induzido por bradicinina, mostrando-se mais eficaz que a melatonina nesta inibição, inibe tanto na mesma concentração utilizada

de melatonina (1 nM), como também em uma concentração 10 vezes menor (0,1 nM). A N-acetilserotonina possui uma afinidade muito maior para receptores MT_3 do que a melatonina (Masana & Dubocovich, 2001). No entanto, a utilização do análogo seletivo para receptores MT_3 , 5-MCA-NAT nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 nM, não apresentou nenhuma alteração no aumento de NO induzido por bradicinina. Portanto, foi excluída a participação de receptores MT_3 nos efeitos mediados por melatonina e N-acetilserotonina.

Uma possível atuação da melatonina via receptor MT_2 , também foi excluída. O análogo de receptores MT_2 , 4P-PDOT, foi utilizado como possível agonista parcial, como verificado em outros modelos experimentais (Lotufo *et al.*, 2001; Almeida-Paula *et al.*, 2005), mas, mesmo na concentração de 100 nM não provocou nenhuma alteração no aumento de NO induzido por bradicinina. Finalmente, luzindol, em concentração (10 μ M) capaz de inibir receptores MT_1 e MT_2 Dubocovich *et al.* (1998), não reverteu o efeito inibitório da melatonina sobre produção de óxido nítrico induzido por bradicinina. Desta forma, os efeitos inibitórios da melatonina e da N-acetilserotonina não podem ser atribuídos a uma ação via receptores MT_1 e MT_2 .

Os resultados obtidos durante este estudo, nos levam à conclusão que os mecanismos envolvidos na inibição da melatonina no aumento da produção de óxido nítrico induzido por bradicinina em células endoteliais, não envolvem uma inibição do aumento de cálcio intracelular, nem a ativação dos receptores MT_1 , MT_2 e/ou MT_3 de melatonina.

Um dos mecanismos que poderia estar envolvido na inibição da produção de óxido nítrico induzido por bradicinina é a ligação da melatonina à calmodulina (Benítez-King e Antón Tay, 1993), promovendo uma inibição da formação do complexo cálcio-calmodulina e da atividade da NOS, como observado na atividade *in vitro* da NOS de hipotálamo de ratos, onde o efeito inibitório da melatonina é revertido após a adição de calmodulina (Bettahi *et al.*, 1996). Inibição da atividade da NOS constitutiva por melatonina, através do bloqueio da calmodulina também foi proposto em cerebelo (Pozo *et al.*, 1997) e cérebro (León *et al.*, 2000) de ratos.

Apesar de ser esta uma proposta interessante, temos que considerar que nas células endoteliais houve o bloqueio da NOS tanto por melatonina quanto pelo seu precursor, N-acetilserotonina. Existem relatos de que a N-acetilserotonina inibe a formação de nitrito em linhagens celulares de macrófagos de camundongo (RAW 264) induzidas por LPS (Sakai *et al.*, 1993) e age como antioxidante após a formação de NO (Oxenkrug, 2005). No entanto, não há evidências que possa ligar-se à calmodulina, inibindo efeitos mediados por esta proteína ligadora de cálcio, como ocorre com a melatonina. Ao contrário, existe uma evidência de que a N-acetilserotonina não liga-se à calmodulina, uma vez que N-acetilserotonina, ao contrário da melatonina, não inibe a atividade da calmodulina quinase II que é uma enzima dependente de calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1996). Apesar deste dado controverso, é importante salientar que demonstramos que o efeito da melatonina em células endoteliais não é mediado por receptores de membrana, e não modifica a

disponibilidade de cálcio, altamente relevante para a ativação da enzima constitutiva. Portanto, quanto ao mecanismo de ação, o efeito da melatonina ocorre entre o aumento intracelular de cálcio e a ativação da enzima.

Um outro aspecto importante a considerar é a relevância fisiológica e fisiopatológica deste achado. A vasodilatação, primeira função atribuída ao óxido nítrico, independe da presença do endotélio em aortas de coelho (Furchgott & Zawadzki, 1980). A ausência de óxido nítrico liberado pelas células endoteliais, pode causar uma potencialização da vasoconstrição, como observado em aorta canina isolada, tratada com o inibidor da enzima NOS (Muramatsu *et al.*, 1992). Portanto, a potenciação da vasoconstrição de artérias mamárias internas de humanos induzida por melatonina 1 nM (Müller-Schweinitzer *et al.*, 2004) pode ser explicada através do bloqueio da atividade da NOS endotelial, já que no período de escuro os níveis plasmáticos de melatonina em humanos, podem atingir concentrações nanomolares (Claustrat *et al.*, 1986).

Durante o processo inflamatório, a melatonina, atuando sobre as células endoteliais, modula a interação neutrófilo-endotélio (Lotufo *et al.*, 2001, Lotufo, 2003). No entanto, este efeito não parece ser decorrente do mecanismo descrito neste trabalho, isto é, uma inibição da atividade da NOS constitutiva. Em primeiro lugar, como descrito anteriormente, estes efeitos são mediados por receptores MT₂ (rolamento) e MT₃ (adesão). Além disso, o inibidor não seletivo da NOS (N ω -nitro-L-arginina metil éster, L-NAME) que é um inibidor de todas as isoformas de NOS, induz um aumento no rolamento e adesão de leucócitos

em vênulas pós-capilares de mesentério de ratos (Davenpeck *et al.*, 1994) e em artérias coronárias isoladas de coelhos (Lefer & Ma, 1993). Colaborando com a conclusão que estes efeitos não seriam mediados por uma ação direta da melatonina sobre a produção de NO, foi descrito que bradicinina 10 nM inibe o aumento do rolamento e adesão de neutrófilos induzido por isquemia e reperfusão em mesentério de rato e a adição de L-NAME reverte este efeito (Shigematsu *et al.*, 1999). Dessa forma, bradicinina, através do aumento de NO promove o mesmo efeito da melatonina, isto é, inibição do rolamento e adesão de leucócitos em leitos pós-vasculares. Portanto, a redução da produção de NO induzida pela melatonina não seria um fator importante para a inibição do rolamento e adesão de leucócitos.

No entanto, é preciso ressaltar que estes são fenômenos complexos, multimediados, e que seu entendimento vai depender de um cotejamento dos diferentes fatos disponíveis. Assim sendo, vale discutir dados obtidos por Farsky *et al.*, (2004) que estudaram a indução de rolamento e adesão de leucócitos em endotélio venular de ratos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararaca*. Neste caso, o aumento no rolamento e na adesão de leucócitos ao endotélio foi inibido por L-NAME, segundo estes autores também inibe os níveis basais de rolamento. Dessa forma, a melatonina poderia também inibir estes fenômenos, visto que inibe a produção de NO. Tendo o cuidado de lembrar que dados obtidos em cultura estão sendo extrapolados e comparados com dados obtidos em animais anestesiados, podemos concluir que em algumas condições experimentais a inibição da NOS constitutiva promovida

pela melatonina poderia interferir na interação leucócito-endotélio, mas que este não é um fato generalizado.

Em resumo, nesta tese demonstramos pela primeira vez, que a melatonina em concentrações próximas das encontradas no plasma noturno de humanos e ratos, inibe a produção de óxido nítrico em células endoteliais em cultura. Além disso, este efeito também é observado com a utilização do precursor da melatonina, N-acetilserotonina. O paralelismo que existe entre o controle do tônus vascular exercido por melatonina atuando sobre a camada endotelial e a produção de NO sugere que este fenômeno possa ter relevância fisiológica.

VI - CONCLUSÃO

1. Melatonina inibe a produção de óxido nítrico induzida por bradicinina em células endoteliais em cultura.
2. Esta inibição não é dependente de uma ação da melatonina sobre o aumento de cálcio induzido por bradicinina.
3. O precursor da melatonina, N-acetilserotonina, também inibe a produção de óxido nítrico, sendo mais eficaz que a melatonina nesta ação.
4. O efeito da melatonina e da N-acetilserotonina, não podem ser explicados por uma atuação via receptores, já que os análogos para receptores MT_2 (4P-PDOT) e MT_3 (5-MCA-NAT) não modificaram o aumento de óxido nítrico induzido por bradicinina, e o antagonista de receptores MT_1 e MT_2 (luzindol) não preveniu o efeito da melatonina.
5. A capacidade da melatonina em inibir a produção de óxido nítrico pode ter relevância fisiológica na regulação do tônus vascular e também ter alguma ligação, com a capacidade da melatonina em inibir a interação neutrófilo-endotélio durante o processo inflamatório.

VII - RESUMO

O hormônio melatonina produzido pela glândula pineal no período de escuro, participa na regulação circadiana de processos, fisiológicos e fisiopatológicos envolvendo vasos sanguíneos. Alguns destes estudos sugerem que as células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos são alvo para a melatonina circulante e medeiam a regulação do tônus vascular, em condições fisiológicas, e da interação neutrófilo-endotélio, em resposta a um estímulo injuriante. O óxido nítrico produzido pelas células endoteliais é um dos responsáveis por grande parte dos eventos vasculares, e a melatonina inibe a produção de óxido nítrico em diversos modelos. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da melatonina na produção de óxido nítrico induzido por bradicinina em células endoteliais em cultura. Para tanto, utilizamos uma técnica de cultura primária de células endoteliais de rato e através de um marcador fluorescente de óxido nítrico intracelular, mensuramos a fluorescência em microscópio confocal. Foi verificado que a melatonina e seu precursor N-acetilserotonina inibem a produção de óxido nítrico induzido por bradicinina e este efeito não ocorre pela inibição do aumento de cálcio que induz a produção de óxido nítrico. O análogo de receptores MT_2 (4P-PDOT) e MT_3 (5-MCA-NAT) não provocaram qualquer alteração sobre o aumento de óxido nítrico induzido por bradicinina, e a utilização do antagonista de receptores MT_1 e MT_2 (luzindol) não reverteu o efeito inibitório da melatonina. Portanto, nossos dados indicam que o efeito da melatonina sobre a atividade da NOS constitutiva não é mediado por receptores de membrana. Considerando que a melatonina é capaz de ligar-se à calmodulina, inibindo desta maneira a atividade da NOS endotelial constitutiva, poderíamos sugerir que este seria o mecanismo de ação. No entanto, é preciso ressaltar que tal atividade não é comprovada para a N-acetilserotonina, assim, apesar de ser este um possível mecanismo de ação, há a necessidade de demonstrar que a N-acetilserotonina está se ligando a calmodulina extraída de células endoteliais. Em resumo, neste trabalho mostramos que a melatonina em concentrações compatíveis com o pico noturno encontrado na circulação, pode modular eventos vasculares no organismo, através da inibição da produção de óxido nítrico em células endoteliais induzida por bradicinina.

VIII - ABSTRACT

Melatonin, the hormone synthesized by the pineal gland at night, signalizes darkness and modulates, in a circadian basis, blood vessels activity. Previous studies suggest that endothelial cells are the target for circulating melatonin and mediate changes in vascular tone and leukocyte-endothelial adherence properties. Melatonin effects can be mediated by several pathways, such as G protein-coupled receptors (MT_1 and MT_2 receptors), a putative membrane receptor, most probably an enzyme-binding site (MT_3 receptor), and several intracellular mechanisms, including calmodulin binding and inhibition of constitutive and induced nitric oxide synthase. The aim of the present study was to characterize melatonin effect on the production of nitric oxide by bradykinin-stimulated endothelial cells in culture. Nitric oxide production was measured in real time at cellular level by detecting fluorescent stimulation of the probe DAF by confocal microscopy. After determining the ideal conditions for recording cumulative dose-response curves for bradykinin (1 – 100 nM) the effect of pre-incubated (1 min) melatonin and analogs was evaluated. Melatonin and its precursor, N-acetylserotonin, but not the selective ligands for receptors MT_2 (4P-PDOT) and MT_3 (5-MCA-NAT) receptors inhibited bradykinin-stimulated nitric oxide production. This effect was not blocked by the classical antagonist of MT_1 and MT_2 receptors, luzindol; excluding therefore the participation of membrane receptors. Taking into account that melatonin inhibits calmodulin activation of several enzymes, including constitutive nitric oxide synthase in brain and cerebellum, it could be suggested a similar mechanism for endothelial cells. However, this hypothesis is discussed taking into account that N-acetylserotonin was shown to do not bind neural cells calmodulin. In addition, here we discuss the relevance of the present finding according to physiological and physiopathological roles of endothelial nitridergic system. This analysis point melatonin modulation of constitutive nitric oxide synthase activity as a putative mechanism for explaining melatonin control of vascular tone.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRAN, M.T., LOPEZ-BURILLO, S., PABLOS, M.I., REITER, R.J. & AGAPITO, M.T. (2001). Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *J. Pineal Res.*, 30: 227-233.
- ALMEIDA-PAULA, L.D., COSTA-LOTUFO, L.V., FERREIRA, Z.S., MONTEIRO, A.E.G., ISOLDI, M.C., GODINHO, R.O. & MARKUS, R.P. (2005). Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. *Eur. J. Pharmacol.*, 525: 24-31.
- BARLOW-WALDEN, L.R., REITER, R.J., ABE, M., PABLOS, M., MENENDEZ-PELAEZ, A., CHEN, L.D. & POEGGELER, B. (1995). Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.*, 26(5): 497-502.
- BECKER-ANDRE, M., WIESENBERG, I., SCHAEREN-WIEMERS, N., ANDRE, E., MISSBACH, M., SAURAT, J.H. & CARLBERG, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, 269: 28531-28534.
- BECKER-ANDRE, M., WIESENBERG, I., SCHAEREN-WIEMERS, N., ANDRÉ, E., MISSBACH, M., SAURAT, J.H. & CARLBERG, C. (1997). Additions and corrections. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, 272: 16707.
- BENÍTEZ-KING, G. & ANTÓN-TAY, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49: 635-641.

- BENÍTEZ-KING, G., HUERTO-DELGADILLO, L. & ANTÓN-TAY, F. (1991). Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain. Res.*, 557: 289-292.
- BENÍTEZ-KING, G., HUERTO-DELGADILLO, L. & ANTÓN-TAY, F. (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.*, 53: 201-207.
- BENÍTEZ-KING, G., RÍOS, A., MARTÍNEZ, A. & ANTÓN-TAY, F. (1996). In vitro inhibition of Ca^{2+} / calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1290: 191-196.
- BETTAHI, I., POZO, D., OSUNA, C., REITER, R.J., ACUNA-CASTROVIEJO, D. & GUERRERO, J.M. (1996). Melatonin reduces nitric oxide activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.*, 20(4): 205-210.
- BILICI, D., AKPINAR, E. & KIZILTUNC, A. (2002). Protective effect of melatonin in carrageenan – induced acute local inflammation. *Pharmacol. Res.*, 46(2): 133-139.
- BISHOP, A. & ANDERSON, J.E. (2005). NO signalling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*, 208: 193-205.
- BRYDON, L.; ROKA, F.; PETIT, L.; COPPET, P.; TISSOT, M.; BARRETT, P.; MORGAN, P.J.; NANOFF, C.; STROSBERG, A.D. & JOCKERS, R. (1999). Dual signaling on human Mel 1a melatonin receptors via G_{i2} , G_{i3} and G_{q11} proteins. *Mol. Endocr.*, 13: 2025-2038.

- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J. & CAMPOS, M.M. (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain*, 87: 1-5.
- CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., RICCI, N.D., PESQUERO, J.L., TEIXEIRA, M.M. & CALIXTO, J.B. (2002). The role of migrating leukocytes in IL-1 β -induced up-regulation of kinin B1 receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 135: 1107-1114.
- CARRILLO-VICO, A., CALVO, J.R., ABREU, P., LARDONE, P.J., GARCIA-MAURIÑO, S., REITER, R.J. & GUERRERO, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.*, 18(3): 537-539.
- CHEN, S.F.; FEL, X. & LI S.H. (1995). A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc. Res.*, 50(1): 119-28.
- CLAUSTRAT, B., BRUN, J., GARREY, P. ROUSSEL, B. & SASSOLAS, G. (1986). A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recordings in six normal young men. *J. Pineal Res.*, 3: 301-310.
- COOK-MILLS, J.M. & DEEM, T.L. (2005). Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leuk. Biol.*, 77: 487-495.
- COUET, J., LI, S., OKAMOTO, T., SCHERER, P.E. & LISANTI, M.P. (1997). Molecular and cellular biology of caveolae: paradoxes and plasticities. *Trends Cardiovasc. Med.*, 7: 103-110.

- CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., COSTANTINO, G. & CAPUTI, A.P. (1998). Protective effect of melatonin in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *J. Pineal Res.*, 25: 24-33.
- CUZZOCREA, S., TAN, D.X., COSTANTINO, G., MAZZON, E., CAPUTI, A.P. & REITER, R.J. (1999). The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *FASEB J.*, 13: 1930-1938.
- DAVENPECK, K.L., GAUTHIER, T.W. & LEFER, A.M. (1994). Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroent.*, 107(4): 1050-1058.
- DENNINGER, J.W. & MARLETTA, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1411: 334-350.
- DONG, Q.G., BERNASCONI, S., LOSTAGLIO, S., DE CALMANOVICI, R.W., MARTIN-PADURA, I., BREVIARIO, F., GARLANDA, C., RAMPONI, S., MANTOVANI, A. & VECCHI, A. (1997). A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17(8): 1599-1604.
- DOOLEN, S., KRAUSE, D.N., DUBOCOVICH, M.L. & DUCKLESS, S.P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 345(1): 67-69.
- DUBOCOVICH, M.L., CARDINALI, D.P., DELAGRANGE, P., KRAUSE, A.D., STROSBERG, A.D., SUDGEN, D. & YOCCA, F.D. (2000). *In: The IUPHAR*

compendium of receptor characterization and classification. 2. edição. Ed. IUPHAR Media, Londres, pp187-193.

DUBOCOVICH, M.L., MASANA, M.I., IACOB, S. & SAURI, D.M. (1997).

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. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 355: 365-75.

DUBOCOVICH, M.L., YUN, K., AL-GHOUL, W.M., BENLOCIF, S. &

MASANA, M.I. (1998). Selective MT₂ melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.*, 12: 1211-1220.

ERSAHIN, C., MASANA, M.I. & DUBOCOVICH, M.L. (2002). Constitutively

active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, 439(1-3): 171-172.

FARSKY, S.H.P., BORELLI, P., FOCK, R.A., PROTO, S.Z., FERREIRA Jr, J.M.C.

& MELLO, S.B.V. (2004). Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm. Res.*, 53: 442-452.

FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of

endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.

GARCIA-MAURIÑO, S., GONZALEZ-HABA, M.G., CALVO, J.R., GOBERNA,

R. & GUERRERO, J.M. (1998). Involvement of nuclear binding sites for

- melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J. Neuroimmunol.*, 92: 76-84.
- GARDINER, S.M., COMPTON, A.M., BENNETT, T., PALMER, R.M.J. & MONCADA, S. (1990). Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*, 15(5): 486-492.
- GILAD, E., WONG, H.R., ZINGARELLI, B., VIRAG, L., O'CONNOR, M., SALZMAN, A.L. & SZABO, C. (1998). Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J.*, 12: 685-693.
- GIRALDO, J., VIVAS, N.M, VILA, E. & BADIA, A. (2002). Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol. Therap.*, 95: 21-45.
- GOVERS, R. & RABELINK, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280(2): F193-F206.
- GRAHAM, R.C., EBERT, R.H., RATNOFF, O.D. & MOSES, J.M. (1965). Pathogenesis of inflammation: II. *In vivo* observation of the inflammatory effects of activated Hageman factor and bradykinin. *J. Exp. Med.*, 121: 807-823.
- GUZIK, T.J., KORBUT, R. & ADAMEK-GUZIK, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.*, 54(4): 469-487.
- HARDELAND, R. & POEGGELER, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.*, 34: 233-241.

- HEBA, G., KRZEMINSKI, T., PORC, M. GRZYB, J. & DEMBINSKA-KIEC, A. (2001). Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, 52: 39-52.
- HU, T.H., BEI, L., QIAN, Z.M. & SHEN, X. (2000). W-7 primes or inhibits the fMLP-stimulated respiratory burst in human neutrophil by concentration-dependent dual expression of the formyl peptide receptors on cell surface. *Biochim. Biophys. Acta*, 1496: 243-251.
- HUNT, A.E., AL-GHOUL, W.M., GILLETTE, M.U. & DUBOCOVICH, M.L. (2001). Activation of MT₂ melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Cell Physiol.*, 280: C110-C118.
- JU, H., VENEMA, V.J., MARRERO, M.B. & VENEMA, R.C. (1998). Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptors with endothelial nitric-oxide synthase *J. Biol. Chem.*, 273(37): 24025-24029.
- KOJIMA, H., URANO, Y., KIKUCHI, K., HIGUSHI, T., HIRATA, Y. & NANGANO, T. (1999). Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38(21): 3209-3212.
- KORTVELY, E. & GULYA, K. (2004). Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sci.*, 74: 1065-1070.
- KOYAMA, T., KIMURA, C., PARK, S.J., OIKE, M. & ITO, Y. (2002) Functional implications of Ca²⁺ mobilizing properties for nitric oxide production in aortic endothelium. *Life Sci.*, 72: 511-520.

- LAMBERT, T.L., KENT, R.S. & WHORTON, A.R. (1986). Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 261(32): 15288-15293.
- LEFER, A.M. & MA, X.L. (1993). Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler. Thromb.*, 13(6): 771-776.
- LEÓN, J., MACIAS, M., ESCAMES, G., CAMACHO, E., KHALDY, H., MARTIN, M., ESPINOSA, A., GALLO, M.A. & ACUNA-CASTROVIEJO, D. (2000). Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol.*, 58: 967-975.
- LERNER, A.B., TAKAHASHI, Y., LEE, T.H. & MORI, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 2587.
- LIU, F. & NG, T.B. (2000). Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochem. Cell Biol.*, 78: 447-453.
- LOTUFO, C.M.C. (2003). Efeito da melatonina sobre as alterações vasculares que caracterizam a inflamação aguda. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutora em ciências na área de fisiologia.

- LOTUFO, C.M.C., LOPES, C., DUBOCOVICH, M.L., FARSKY, S.H.P. & MARKUS, R.P. (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.*, 430: 351-357.
- MARRERO, M.B., VENEMA, V.J., JU, H., LIANG, H., CALDWELL, R.B. & VENEMA, R.C. (1999). Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.*, 343: 335-340.
- MASANA, M.I. & DUBOCOVICH, M.L. (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE*, 2001, PE39.
- MASANA, M.I., DOOLEN, S., ERSAHIN, C., AL-GHOUL, W.M., DUCKLES, S.P., DUBOCOVICH, M.L. & KRAUSE, D.N. (2002). MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther.*, 302: 1295-302.
- MICHEL, J.B., FERON, O., SACKS, D. & MICHEL, T. (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.*, 272(25): 15583-15586.
- MICHIELS, C. (2003). Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.*, 196: 430-443.
- MOLINARI, E.J., NORTH, P.C. & DUBOCOVICH, M.L. (1996). 2-[¹²⁵I]Iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML₂ binding sites. *Eur. J. Pharmacol.*, 301: 159-168.

- MOMBOULI, J.V. & VANHOUTTE, P.M. (1999). Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 31: 61-74.
- MÜLLER-SCHWEINITZER, E., GILLES, H., GRAPOW, M., KERN, T., REINEKE, D. & ZEKOWSKI, H.R. (2004). Attenuation of lipopolysaccharide-induced hyperreactivity of human internal mammary arteries by melatonin. *J. Pineal Res.*, 37: 92-97.
- MURAMATSU, M., IWAMA, Y., SHIMIZU, K., ASANO, H., TOKI, Y., MIYAZAKI, Y., OKUMURA, K., HASHIMOTO, H. & ITO, T. (1992). Hypoxia-elicited contraction of aorta and coronary artery via removal of endothelium-derived nitric oxide. *Am. J. Physiol.*, 263: H1339-H1347.
- NDIAYE, M., CHATAIGNEAU, M., LOBYSHEVA, I., CHATAIGNEAU, T. & SCHINI-KERTH, V.B. (2005). Red wine polyphenols-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J.*, 19(3): 455-457.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGE, F., BEAUVERGER, P., HENLIN, J.M., LEFOULON, F., FAUCHERE, J.L., DELAGRANGE, P., CANET, E. & BOUTIN, J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT₃ as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.*, 275: 31311-31317.
- OHISHI, K., SUZUKI, T. & UCHIDA, M.K. (1985). Relation between inhibition of calmodulin and mediator release from rat mast cells. *Gen. Pharmacol.*, 16: 335-339.
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A. & KANEDA, C. (2000). Melatonin increases

- activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J. Pineal Res.*, 28: 89-96.
- OKATANI, Y., WAKATSUKI, A., WATANABE, K., TANIGUSHI, K. & FUKAYA, T. (2001). Weak vasoconstrictor activity of melatonin in human umbilical artery: relation to nitric oxide-scavenging action. *Eur. J. Pharmacol.*, 417: 125-129.
- OXENKRUG, G. (2005). Antioxidant effects of N-acetylserotonin. Possible mechanisms and clinical implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1053: 334-347.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
- PARTON, R.G. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8: 542-548.
- PETIT, L., LACROIX, I., COPPET, P., STROSBERG, A.D. & JOCKERS, R. (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 58: 633-639.
- PITTNER, J., LIU, R., BROWN, R., WOLGAST, M. & PERSSON, A.E.G. (2003). Visualization of nitric oxide production and intracellular calcium in juxtamedullary afferent arteriolar endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.*, 179: 309-317.
- POEGGELER, B., THUERMANN, S., DORE, A., SCHOENKE, M., BURKHARDT, S. & HARDELAND, R. (2002). Melatonin's unique radical

scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.*, 33: 20-30.

PONTES, G.N., CARDOSO, E.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S., FERREIRA, Z.S. & MARKUS, R.P. (2005). Avaliação da ritmicidade de secreção de melatonina em colostro de mães, clinicamente sadias e com mastite. Anais da XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, Águas de Lindóia, São Paulo, pp. 78.

POPOVA, J.S. & DUBOCOVICH, M.L. (1995). Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J. Neurochem.*, 64: 130-138.

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

PRABHAKAR, P., THATTE, H.S., GOETZS, R.M., CHO, M.R., GOLAN, D.E. & MICHEL, T. (1998). Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 273(42): 27383-27388.

REGOLI, D., ALLOGHO, S.N., RIZZI, A. & GOBEIL, F.J. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 348: 1-10.

REITER, R. J., CALVO, J.R., KARBOWNIK, M., QI, W. & TAN, D.X. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 917: 376-386.

- REITER, R. J., TAN, D.X., SAINZ, R.M., MAYO, J.C. & LOPEZ-BURILLO, S. (2002) Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J. Pharm. and Pharmacol.*, 54: 1299-1321.
- REPPERT, S.M.; GODSON, C.; MAHLE, C.D.; WEAVER, D.R.; SLAUGENHAUPT, S.A. & GUSELLA, J.F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 8734-8738.
- REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R. & EBISAWA, T. (1994). Cloning and characterization of mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.*, 13(5): 1177-1185.
- RODRIGUEZ, C., MAYO, J.C., SAINZ, R.M., ANTOLÍN, I., HERRERA, F., MARTÍN, V. & REITER, R.J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.*, 36: 1-9.
- ROKA, F.; BRYDON, L.; WALDHOER, M.; STROSBERG, A.D.; FREISSMUTH, M.; JOCKERS, R. & NANOFF, C. (1999). Tight association of the human Mel_{1a} – Melatonin receptor and G_i: Precoupling and constitutive activity. *Mol. Pharmacol.*, 56: 1014-1024.
- ROSEBOOM, P.H., COON, S.L., BALER, R., MCCUNE, S.K., WELLER, J.L. & KLEIN, D.C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 137: 3033-3045.

- RUBANYI, G.M. & BOTELHO, L.H.P. (1991). Endothelins. *FASEB J.*, 5(12): 2713-2720.
- SÁENZ, D.A., TURJANSKI, A.G., SACCA, G.B., MARTI, M., DOCTOROVICH, F., SARMIENTO, M.I.K., ESTRIN, D.A. & ROSENSTEIN, R.E. (2002). Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina. *J. Pineal Res.*, 33: 31-36.
- SAKAI, N., KAUFMAN, S. & MILSTEIN, S. (1993). Tetrahydrobiopterin is required for cytokine-induced nitric oxide production in a murine macrophage cell line. *Mol. Pharmacol.*, 43(1): 6-10.
- SANTOS, D.R., CALIXTO, J.B. & SOUZA, G.E.P. (2003). Effect of kinin B₂ receptor antagonist on LPS - and cytokine-induced neutrophil migration in rats. *Brit. J. Pharmacol.*, 139: 271-278.
- SCHINI, V.B. & VANHOUTTE, P.M. (1992). Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261(2):553-559.
- SCHOMERUS, C., KORF, H.W., LAEDTKE, E., WELLER, J.L. & KLEIN, D.C. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteosomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J. Neurochem.*, 75(5): 2123-2132.
- SHAUL, P.W., SMART, E.J., ROBINSON, L.J., GERMAN, Z., YUHANNA, I.S., YING, Y., ANDERSON, R.G.W. & MICHEL, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.*, 271(11): 6518-6522.

- SHIGEMATSU, S., ISHIDA, S., GUTE, D.C. & KORTHUIS, R.J. (1999). Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment, venular hemodynamics, and nitric oxide production in rat mesentery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 272: H152-H160.
- SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.*, 55: 325-395.
- SINGH, R.A. & SODHI, A. (1999). Expression and activation of RAS and mitogen-activated protein kinases in macrophages treated in vitro with cisplatin: regulation by kinases, phosphatases and Ca²⁺/calmodulin. *Immunol. Cell Biol.*, 77: 356-363.
- SUN, J. & LIAO, J.K. (2002). Functional interaction of endothelial nitric oxide synthase with a voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(20): 13108-13113.
- TAN, D.X. MANCHESTER, L.C., REITER, R.J., PLUMMER, B.F., HARDIES, L.J., WEINTRAUB-VIJAYALAXMI, S.T. & SHEPHERD, A.M.M. (1998). A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *In vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253: 614-620.
- TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; REITER, R.J.; QI, W.B.; ZHANG, M.; WEINTRAUB, S.T.; CABRERA, J.; SAINZ, R.M. & MAYO, J.C. (1999).

Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1472: 206-214.

TOSINI, G. & FUKUHARA, C. (2003). Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J Neuroendocrinol.*, 15: 364-369.

VAKKURI, O., LEPPALUOTO, J. & VUOLTEENAHO, O. (1984). Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as a tracer. *Acta Endocrinol.* 106: 152-157.

YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y. YAZAKI, Y., GOTO, K. & MASAKI, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163): 411-415.

YANG, Q., SCALBERT, E., DELAGRANGE, P., VANHOUTTE, P.M. & O'ROURKE, S.T. (2001). Melatonin potentiates contractile responses to serotonin in isolated porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280(1): H76-H82.

YI, F.X., ZHANG, A.Y., CAMPBELL, W.B., ZOU, A.P., BREEMEN, C.V. & LI, P.L. (2002). Simultaneous in situ monitoring of intracellular Ca²⁺ and NO in endothelium of coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283: H2725-H2732.

ZEMKOVA, H. & VANECEK, J. (2000). Differences in gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signalling between melatonin-sensitive and melatonin-insensitive neonatal rat gonadotrophs. *Endocrinol.*, 141(3): 1017-1026.

ZHANG, S., LI, W., GAO, Q. & WEI, T. (2004). Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 501: 25-30.