

SIMONE GOMES FERREIRA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA MELATONINA SOBRE
DANOS AO DNA INDUZIDOS PELA CICLOFOSFAMIDA
EM RATOS WISTAR PINEALECTOMIZADOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências (Fisiologia Humana).

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

SÃO PAULO

2008

RESUMO

FERREIRA, S. G. **Estudo dos efeitos da melatonina sobre danos ao DNA induzidos pela ciclofosfamida em ratos Wistar pinealectomizados.** 103f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Este estudo investigou o efeito protetor da melatonina sobre os danos ao DNA induzidos pela ciclofosfamida (20 e 50mg/kg) sobre as aberrações cromossômicas, fragmentação do DNA, ciclo celular e os sítios sensíveis a Fpg pelo Ensaio Cometa. Os níveis de RNAm de MGMT, p53, p21, Bax, Bcl-2, Top1, CSB e XPF foram analisados por qPCR. Após a remoção cirúrgica da glândula pineal, os animais foram tratados com 1 mg/kg de MEL via oral durante 15 dias. Como resultados, demonstramos que a melatonina foi capaz de reverter completamente o quadro de aberrações cromossômicas induzidas pela ciclofosfamida, indicando uma possibilidade de uso terapêutico quando da necessidade de uso de medicação quimioterápica. Esse quadro repetiu-se e ficou mais evidente com o estudo específico das lesões oxidativas pelo uso da Fpg. De todos os genes estudados, aquele que teve de forma mais consistente, sua expressão aumentada, sempre, pela melatonina foi XPF. Dessa forma, os mecanismos envolvidos com o reparo do DNA mobilizados pela melatonina parecem, em parte, mobilizar a expressão do gene XPF.

Palavras-chave: Melatonina, Danos ao DNA, Glândula pineal, Reparo de DNA, Antioxidantes, Antineoplásicos.

ABSTRACT

FERREIRA, S. G. **Melatonin effects on the DNA damage induced by cyclophosphamide in pinealectomized rats.** 103 f. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

This study investigated the protective effect of melatonin over DNA damage-induced by cyclophosphamide (20 and 50mg/kg) characterizing chromosomal aberrations, DNA fragmentation, cell cycle and determination of Fpg-sensitives sites by Comet assay. The levels of MGMT, p53, p21, Bax, Bcl-2, Top1, CSB and XPF mRNA were examined by qPCR. After pineal gland surgical removal, animals were treated orally with 1 mg/kg of melatonin during 15 days. Results have shown that melatonin treatment was able to completely revert chromosomal aberrations cyclophosphamide-induced, possibly indicating a therapy use of melatonin in chemotherapeutic treatment. This effect was also demonstrated with the studies of oxidative lesions by Fpg-sensitives assay. From all studied genes, XPF showed the most increased expression. Thereby, DNA repair mechanisms triggered by melatonin, seems to mobilize XPF gene expression.

Key words: Melatonin, DNA damage, Pineal gland, DNA repair, Antioxidants, Antineoplastic.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O estudo da glândula pineal passou por diversos períodos na história da ciência, e, a cada momento uma de suas características funcionais foi destacada atribuindo-lhe importância de acordo com as visões filosóficas e científicas predominantes de cada época.

A glândula pineal ou epífise cerebral já é conhecida a mais de 2000 anos. O documento mais antigo e existente foi escrito por Galeno de Pergamon por volta de 130-200 anos AD, o qual a caracterizou como uma glândula em forma de pinha, originando o seu nome “pineal” (MACCHI e BRUCE, 2004; ARENDT, 1995).

A identificação da glândula pineal como um órgão cerebral distinto, foi descrito por Herófilo entre o III e o IV século DC. Ele atribuiu a pineal o papel de uma válvula que regulava o fluxo do pensamento no cérebro. A localização central e a singularidade da pineal como um órgão ímpar, bem como sua extensa vascularização, foram descritas por Andreas Vesalius Bruxellensis (1515-1564) que fundou a Fundação René Descartes conceituando durante este período da Renascença a pineal como a sede do espírito ou como o órgão que coordenava funções psicofisiológicas (MACCHI e BRUCE, 2004).

Desde a clássica atribuição de “sede da alma”, sendo, portanto centro da regulação de toda função sensorial, motora e cognitiva, até a mais recente de “órgão vestigial”, ou seja, sem a menor importância, a glândula pineal ressurge, na história científica contemporânea, a partir do livro de Kitay & Altschule de 1954, que através de uma revisão extensa da literatura recoloca a glândula pineal como objeto de estudo das Ciências Biológicas e das Ciências Médicas. O marco seguinte foi em 1958 e 1959, com o isolamento e caracterização da melatonina como um hormônio da glândula pineal. A partir daí surge uma série enorme de trabalhos, congressos e simpósios que procuraram estudar e esclarecer o papel funcional da pineal e de seus produtos de secreção, principalmente da melatonina.

Hoje, sabe-se que a glândula pineal, também denominada de órgão pineal, participa na organização temporal dos ritmos biológicos, atuando como mediadora entre o ciclo claro/escuro ambiental e os processos regulatórios fisiológicos, incluindo a regulação endócrina da reprodução, a regulação dos ciclos de atividade-reposo e sono / vigília assim como a regulação do sistema imunológico, entre outros (CIPOLLA NETO e AFECHÉ, 2007).

A glândula pineal é uma estrutura epitalâmica pequena e única, situada dorsalmente à região caudal do diencéfalo. Ela é derivada de células neuroectodérmicas e, à semelhança da retina, desenvolve-se a partir de uma evaginação do teto da parede do terceiro ventrículo (KAPPERS, 1960).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é o principal produto de secreção da glândula pineal, cuja produção hormonal é controlada, de forma direta ou indireta, pelo ciclo de iluminação ambiental característico do dia e da noite. Além disso, em todas as espécies estudadas de vertebrados, tanto de atividade noturna quanto diurna, a produção de melatonina é exclusivamente noturna, e a duração da sua secreção é dependente da duração do período de escuro do ritmo diário de iluminação ambiental. Com isso, a melatonina é crucial na regulação das mudanças sazonais, determinando em qual estação do ano um indivíduo está ambientado; e circadianas, que indicam ao organismo se é dia ou noite no ambiente externo. Desta forma, a melatonina modula aspectos importantes da fisiologia, tais como a regulação endócrina, em geral, e a metabólica e reprodutiva, em particular; regulação do ciclo atividade-reposo, do sono e da vigília; regulação do sistema imunológico, regulação cardiovascular, entre outras (CIPOLLA NETO e AFECHÉ 2007; REITER et al., 2002; TAN et al., 2007).

Entre as funções conferidas a melatonina no controle do sistema imune pode-se destacar a defesa antitumoral. A remoção da glândula pineal (pinealectomia) pode ajudar a estimular o desenvolvimento de alguns tumores, mas quando se repõe a melatonina, pode ocorrer uma redução na taxa de crescimento dos tumores. Além de efeitos sobre os linfócitos, a melatonina provoca a ativação de monócitos e macrófagos, induzindo nesses tipos de células, a produção de interleucinas e radicais livres e também a resposta de macrófagos, ativando o sistema imunológico (MARTINS JÚNIOR et al., 1998).

Recentemente, muitas publicações têm reportado o efeito antioxidante e neuroprotetor da melatonina. Dadas as suas características lipofílicas, a melatonina pode agir em qualquer compartimento do organismo e diversos estudos indicam que, além da capacidade antioxidante direta da sua molécula, a melatonina poderia agir através de modificações da expressão gênica, aumentando os níveis de RNAm de enzimas antioxidantes tais como a glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase (TAN et al., 2007; REITER et al., 2002) A melatonina age tanto centralmente como periféricamente sob numerosos sistemas alvos mediado ou não por receptores de membrana e/ou nucleares. Há ainda evidências de que as suas ações antioxidantes envolvem um efeito sobre os sistemas de reparo de DNA como

encontrou o grupo de Mahal et al., 1999 onde a melatonina reparou o radical guanosina (G·) induzido por oxidação.

Assim sendo, com o estabelecimento da ação antioxidante e anticarcinogênica da melatonina, há um crescente interesse em estudar os efeitos da melatonina sobre o DNA o qual está constantemente sendo alvo de agentes tóxicos e ambientais ou mesmo inerentes ao próprio metabolismo celular, que o danificam e que podem ocasionar mutações. Muitas destas mutações no material genético podem ainda contribuir para transformações celulares dando origem a modificações de bases do DNA e assim, resultando em muitas vezes, num câncer (ARENDE, 2007).

1.2 Glândula Pineal: Aspectos Gerais da Anatomia

Em todos os vertebrados, a glândula pineal, origina-se de uma evaginação dorsal do tecido do III ventrículo, entre a comissura posterior e habenular. Forma-se assim, um saco revestido de epêndima em comunicação com a cavidade ventricular. Nos peixes, anfíbios e alguns répteis, este saco permanece como tal e as células endimárias de sua parede diferenciam-se em fotorreceptores que se assemelham aos cones e bastonetes da retina. Tendo a pineal a mesma origem embriológica que os olhos, que derivam de quatro fontes ou tecidos: neuroectoderma do prosencéfalo, ectoderma da superfície da cabeça, mesoderma entre essas camadas, células da crista neural. Sendo que a retina e as camadas posteriores das íris e o nervo óptico, originam-se do neuroectoderma do prosencéfalo (MOORE, 1996).

Nos vertebrados não mamíferos, a pineal é um órgão sensorial que recebe os estímulos luminosos que atravessam a pele e o crânio. Já em mamíferos, as células endimárias que formam o divertículo embrionário multiplicam-se, obliterando a luz do divertículo. Estas células diferenciam-se nas células parenquimatosas do corpo pineal ou pinealócitos. Deste modo, durante a evolução, o corpo pineal passou de um órgão sensorial para um órgão parenquimatoso e secretor (MØLLER, 1992).

Durante o desenvolvimento embrionário, a glândula pineal é invadida por tecido conjuntivo derivado da pia-máter que forma a cápsula do órgão e penetra em seu interior formando septos. A estrutura da pineal é complexa devido à existência de elementos mesodérmicos derivados da pia-máter e elementos derivados do epêndima, ou seja, neurectodérmicos. Entre os primeiros, encontramos todas as células e fibras encontradas no tecido conjuntivo frouxo. Além desses elementos, a pineal é muito vascularizada e seu fluxo sanguíneo foi estimado em 4ml/min/g e é superado apenas pelo rim. A inervação da pineal se faz por fibras simpáticas pós-ganglionares, oriundas do gânglio cervical superior (MØLLER, 1992; MACCHI e BRUCE, 2004).

Em alguns vertebrados existe, além do corpo pineal, o órgão parapineal, situado próximo a pineal e muito variável. Em alguns lagartos ele constitui o chamado terceiro olho, ímpar e mediano, situado entre os dois olhos laterais com função fotosensorial (MOORE, 1996).

A glândula pineal de mamíferos ocupa uma posição central, localizada entre os dois hemisférios cerebrais, a frente do cerebelo, na porção pósterodorsal do diencéfalo, associada ao terceiro ventrículo e consiste de dois tipos de células principais, os pinealócitos (Figura 1) e os astrócitos imaturos (ARENDDT, 1995).

Estudos histológicos revelam um tipo celular predominante e específico na glândula pineal, o pinealócito. Células de origem glial e neurônios que são encontrados no parênquima pineal que está separado da camada de tecido conectivo e dos capilares sanguíneos por uma lâmina basal. Os pinealócitos podem ser classificados em três tipos básicos (Figura 1): fotorreceptor pineal verdadeiro encontrado em lampreias, peixes teleósteos, sapos e alguns répteis; fotorreceptor pineal modificado encontrados em ofídios e aves e pinealócito senso estrito nos mamíferos (KORF e STEHLE, 1998).

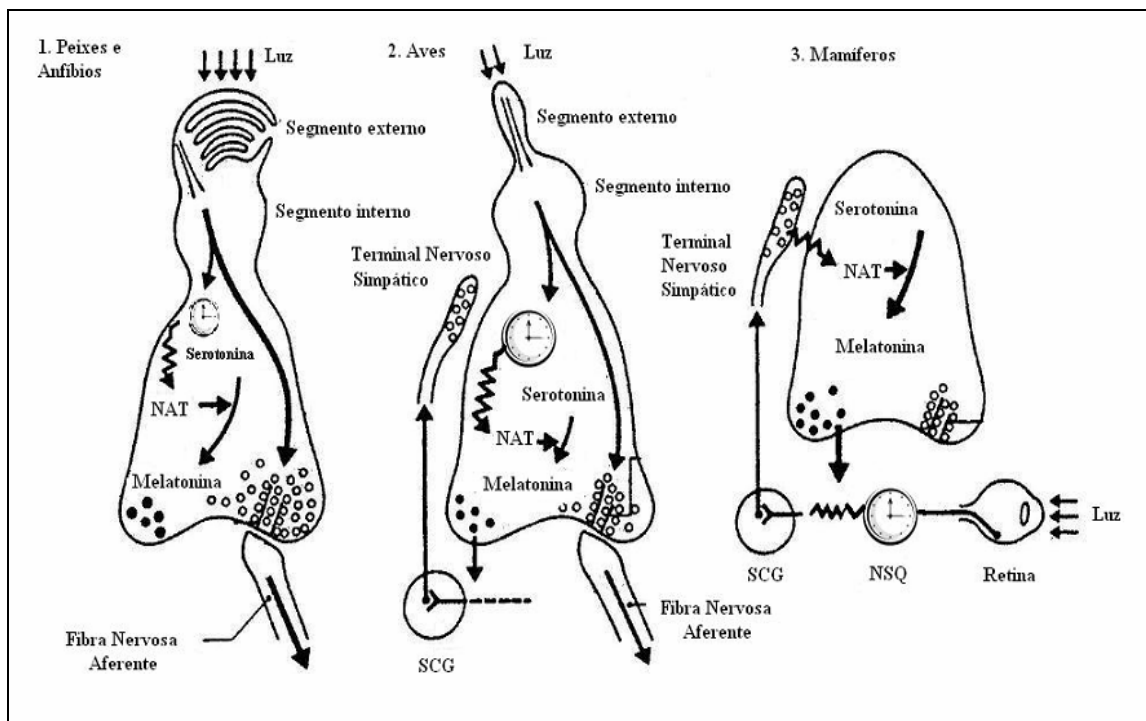


Figura 1 - Representação esquemática dos tipos de pinealócitos de vertebrados: 1 – fotoreceptor pineal verdadeiro, 2 – fotoreceptor pineal modificado, 3 – pinealócito senso estrito. Modificado de KORF e STEHLE, 1998.

A vascularização está assegurada por pequenos ramos de arteríolas que se originam da ramificação das duas carótidas posteriores que, por sua vez, são ramos da artéria cerebral posterior. A drenagem é feita por vênulas que partem da glândula pineal para desembocar na confluência venosa posterior (*confluens sinuum*) que circunda a glândula (QUAY, 1974; HODDE, 1979). Situada fora da barreira hemato-encefálica, os produtos de secreção da glândula passam pelo seio venoso antes de serem liberados na circulação sistêmica (QUAY, 1973).

1.3 Síntese de melatonina

Originalmente, acreditava-se que a melatonina era sintetizada exclusivamente na glândula pineal. Porém, estudos vêm demonstrando que diversos tecidos extrapineais têm a capacidade de sintetizar a melatonina, entre eles incluem a retina, glândula de Harderian, timo, placenta, medula óssea, testículos, linfócitos, intestino, ovários, epitélio respiratório e pele. Embora essa produção local, não influêncie o ritmo circadiano na circulação sanguínea e

também não funciona como um sinal químico de luz/escuro, a importância pode estar relacionada a um mecanismo protetor de cada tecido ao estresse oxidativo (TAN et al., 2007).

A produção e secreção da melatonina pela glândula pineal, apresenta um perfil circadiano. Em ratos, a glândula pineal se localiza dorsalmente ao mesencéfalo a frente dos colículos superiores e a via neural envolvida na síntese de melatonina incluem os Núcleos Supraquiasmáticos Hipotalâmicos (NSQ) que são conhecidos como o relógio biológico. Estes por sua vez, estão sobre o controle de iluminação proveniente do ambiente detectado pelos fotoreceptores da retina de onde saem projeções para a via retino-hipotalâmica (RHP) (Figura 2). As conexões entre essas áreas envolvem o Núcleo paraventricular hipotalâmico (PV), a coluna intermédial lateral da medula torácica alta (IML), consequentemente os neurônios pré-ganglionares do Sistema Nervoso Autônomo Simpático se projetam para os gânglios cervicais superiores (GCS) que através de ramos carotídeos internos e nervos conários (RCI e NC) projetam-se para a glândula pineal.

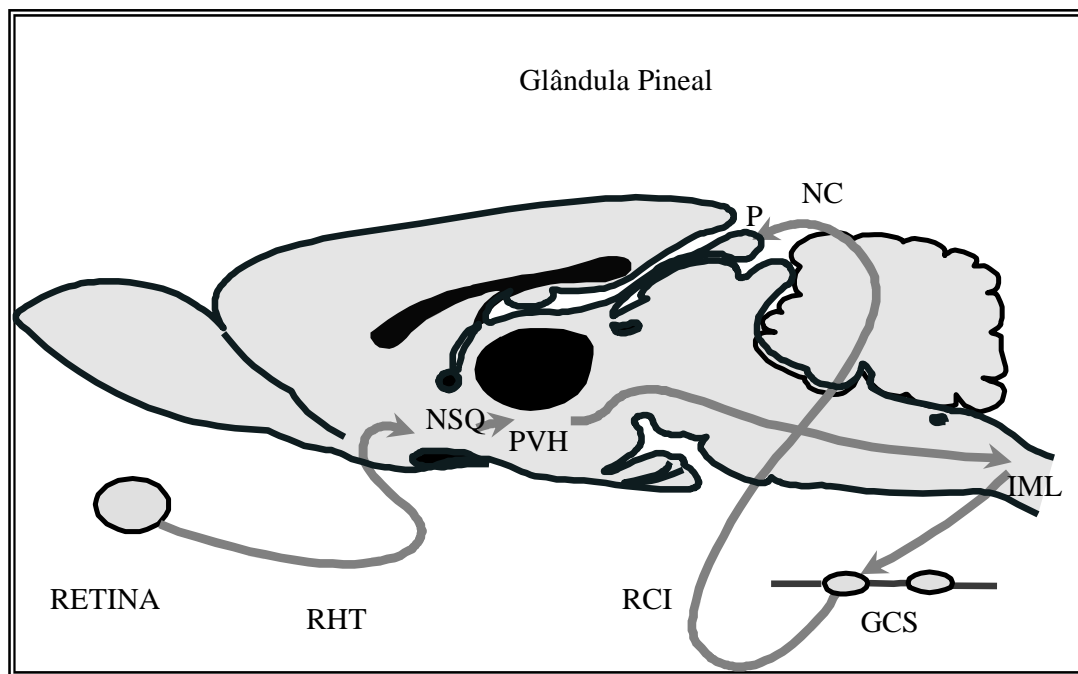


Figura 2 – Esquema de corte sagital do cérebro de um rato mostrando a via neural envolvida no controle da síntese de melatonina na glândula pineal. RHT – trato retino hipotalâmico; NSQ – núcleos supraquiasmático; PVH – núcleo paraventricular hipotalâmico; IML – coluna intermédio lateral da medula espinal; GCS – glânglios cervicais superiores; RCI – ramos carotídeos internos; NC – nervos conários; P – glândula pineal.

A precisão e a confiabilidade da transdução fotoneuroendócrina que regula o sistema de produção da melatonina, é determinado por mecanismos que operam em diversos níveis. A

interface molecular entre a regulação e a síntese de melatonina, é de responsabilidade da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT ou NAT). A atividade da AANAT e a produção de melatonina são ativadas por uma regulação adrenérgica (REITER, 2003).

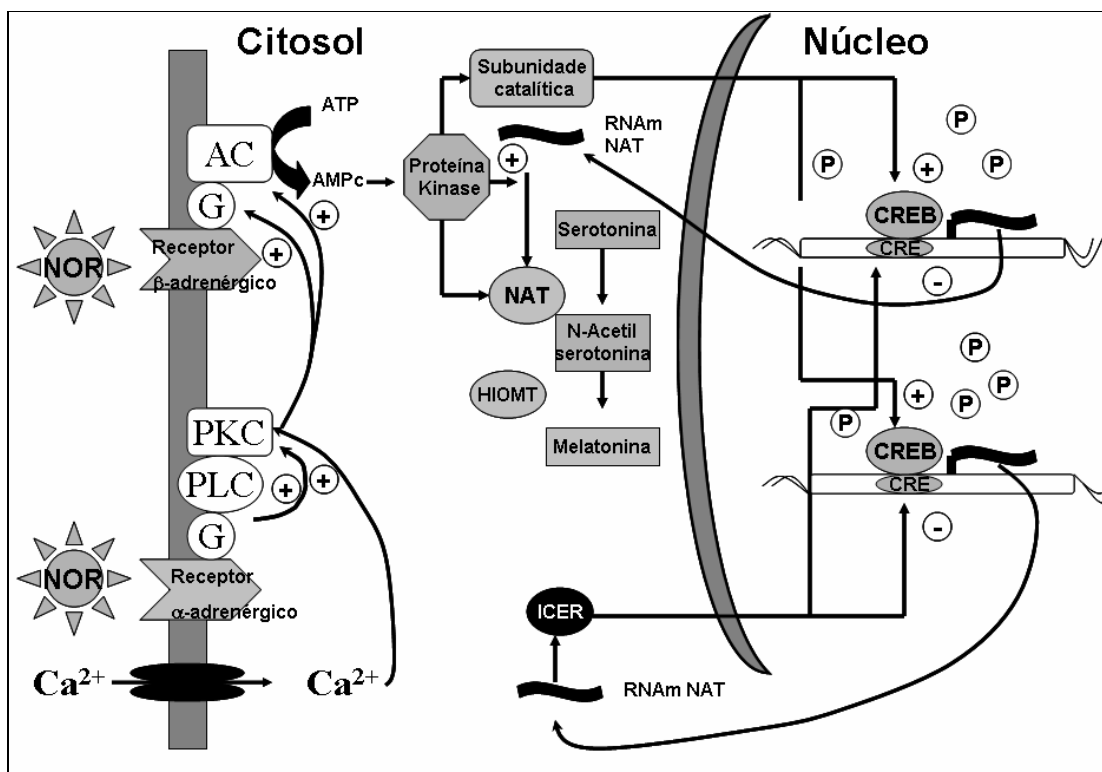


Figura 3 - Via intracelular de biossíntese de melatonina estimulada pela noradrenalina (NOR), que promove a síntese de melatonina na glândula pineal.

Em ratos, a ativação do sistema neural, resulta na liberação de noradrenalina (NOR), durante a noite, de terminais simpáticos que terminam na pineal (Figura 3). A NOR é liberada no espaço intersticial de onde se difunde até a membrana do pinealócito onde se liga ativando receptores do tipo α_1 e β_1 adrenérgicos. A ativação do receptor β_1 resulta na estimulação da adenilato ciclase (AC) mediado pela proteína G estimulatória. A ativação do receptor α_1 não possui nenhum efeito sozinho, porém, é capaz de potencializar o efeito do receptor β_1 aumentando os níveis de AMPc, pois provoca um aumento intracelular de Ca^{2++} que causa um aumento da atividade da PKC e o diacilglicerol (DAG) que leva a ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC estimula a AC através de um mecanismo pós-receptor causando um rápido aumento na produção intracelular de AMPc. O AMPc, por sua vez, ativa a PKA (proteína quinase A), e sua subunidade catalítica transloca-se para o núcleo fosforilando a

CREB (proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc). Este evento comanda a expressão do gene da AANAT (RNAm da AANAT), enzima chave na síntese de melatonina e também de diferentes classes de repressores da síntese como o ICER (repressor de AMPc) (SIMONNEAUX e RIBELAYA, 2003).

Em roedores, a abundância de RNAm da AANAT é regulada pelo AMPc. A elevação do AMPc causa um aumento durante a noite no RNAm da AANAT em 150 vezes que é comandado pela fosforilação do fator de transcrição (CREB) pela proteína quinase A (PKA). Entretanto em alguns mamíferos, incluindo ungulados e o macaco *rhesus*, o RNAm da AANAT é mantido em níveis elevados de dia (KORF e STEHLE, 1998).

Um mecanismo de regulação inibitória que acontece na segunda metade da noite deve-se a desfosforilação da CREB (Figura 4). Este processo ocorre juntamente com um mecanismo inibitório direto que envolve a síntese de uma proteína (ICER- inducible cAMP early repressor), a qual inibe a transcrição do gene da NAT, havendo uma queda na atividade da AANAT. Estes dois fatores contribuem para a queda circadiana da atividade da AANAT que ocorre no fim da noite (KLEIN, 1970; KORF e STEHLE, 1998).

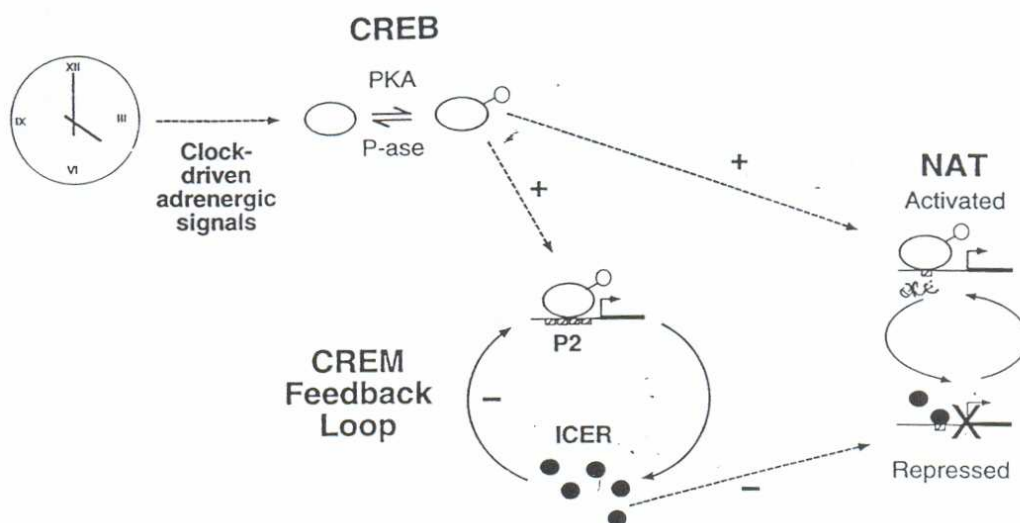


Figura 4 - Representação esquemática da via de regulação pela geração rítmica da síntese de melatonina. CREB fosforilada ativa a transcrição do gene da AANAT, e na segunda metade da noite ocorre a ativação da região promotora P2 do gene CREM induzindo a síntese do ICER. Modificado de: (FOULKES et al., 1997).

A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 min. É transportada pelo plasma, ligada a proteínas, em especial a albumina, e sua metabolização se dá principalmente no fígado e no rim. A melatonina é convertida em 6-hidroximelatonina e, então, pode ser conjugada a sulfato formando 6-sulfatoximelatonina e eliminada na urina. A presença de 6-sulfatoximelatonina na urina tem sido utilizada como um índice de medida do funcionamento da glândula pineal. No cérebro, a melatonina pode ser convertida em N-acetil-5-metoxiquenuremina, devido a presença da enzima 2,3-indolamina dioxigenase (CIPOLLA NETO e AFECHE, 2007).

1.4 Mecanismos de ação da melatonina

A ação biológica da melatonina pode ser atribuída tanto à sua interação com receptores específicos quanto à sua capacidade de quelar radicais hidroxila (REITER 2002; TAN et al., 2007).

A melatonina, devido ao seu caráter anfifílico, dado pela presença dos grupamentos metoxi no carbono 5 (que confere lipossolubilidade), e do grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina (que confere hidrossolubilidade) (Figura 6), pode atravessar facilmente as membranas celulares por difusão passiva. Em consequência, ela não é armazenada no interior do pinealócito (células da glândula pineal onde se dá sua síntese) sendo imediatamente liberada para dentro dos capilares sanguíneos que irrigam a glândula pineal. Assim, a secreção de melatonina reflete, diretamente, sua síntese (Figura 5), que é catalizada por quatro enzimas distintas: triptofano hidroxilase (TPH), descarboxilase inespecífica de L-aminoácidos aromáticos (AAAD), arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) e hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (VIJAYALAXMI et al., 2002).

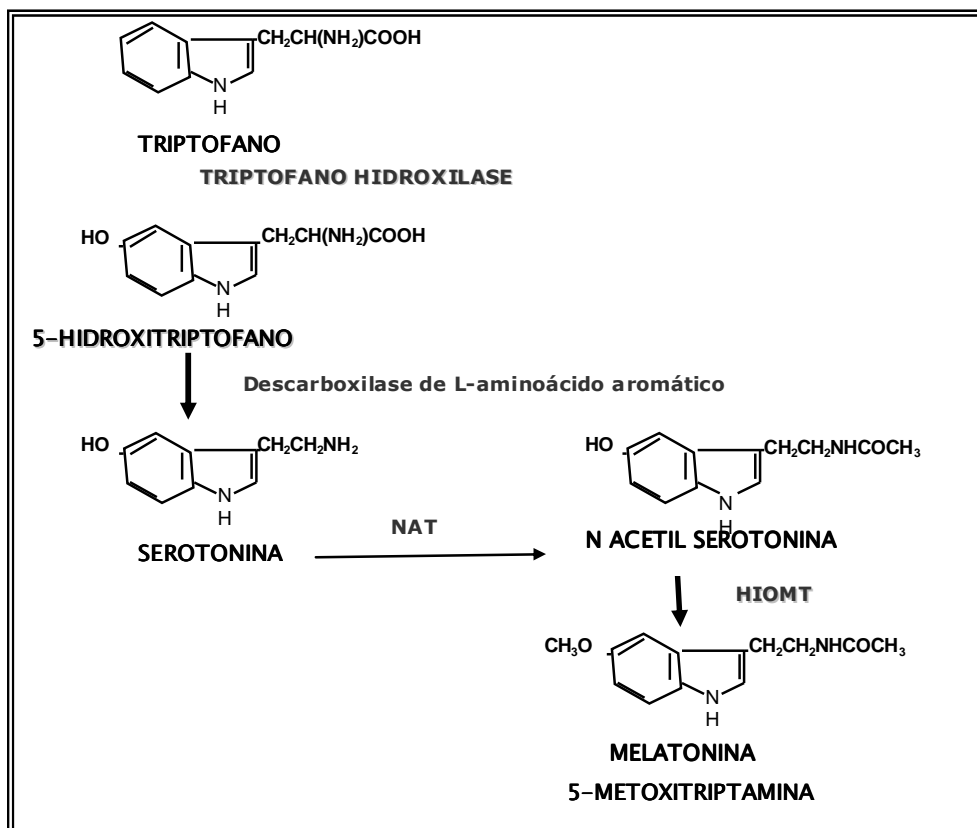


Figura 5 - Via da Biossíntese de Melatonina. AANAT – arilalquilamina N-acetil transferase; HIOMT, hidroxi-indol-O-metiltransferase.

Desde 1993, quando a melatonina foi identificada pela primeira vez como um poderoso agente antioxidante, inúmeros artigos têm sido publicados sobre a sua capacidade de proteger o DNA de danos provocados pelos radicais livres. Segundo as características químicas da molécula da melatonina, como pode ser observado na Figura 6, os carbonos ligados na posição 3 e 2 do anel pirrólico (circulados em verde), conferem a melatonina uma alta afinidade ao oxigênio resultando num alto poder redutor. Assim, a melatonina pode agir diretamente como um eliminador de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio, aumentando indiretamente a atividade do sistema de defesa antioxidante, bem como sendo mais efetiva que o ácido ascórbico e α -tocoferol (ANISIMOV et al., 2006).

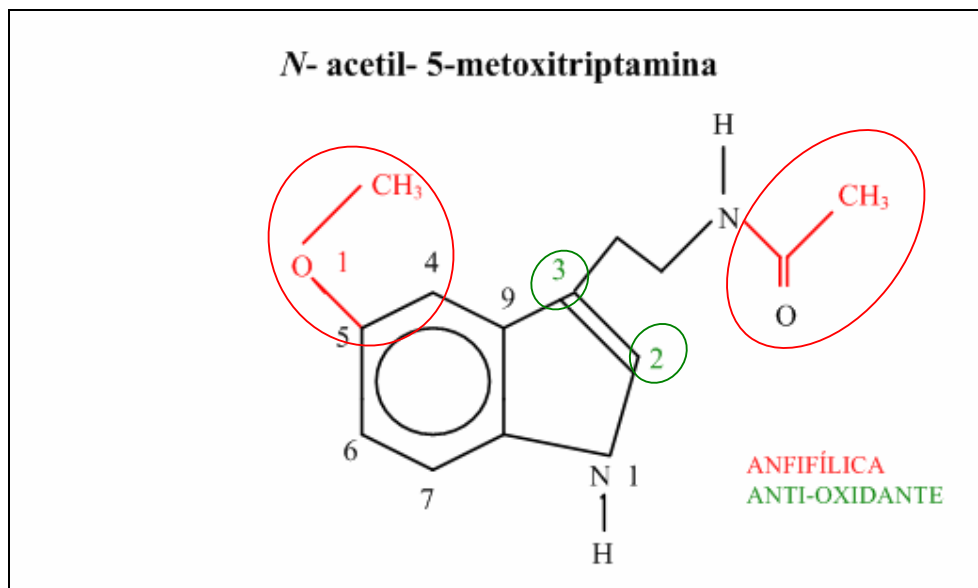


Figura 6 - Molécula da melatonina e os grupamentos que promovem a característica anfifílica (em vermelho) e antioxidante (em verde).

Os organismos podem responder, de forma auto-protetora, aos estresses aumentando seus níveis de melatonina por meio da estimulação de sua biossíntese. Esta observação foi feita em casos de restrição alimentar em animais, de roedores a primatas. A restrição alimentar é definida como um estressor de baixa intensidade e é amplamente aceito que é benéfico para a sobrevivência do organismo. Assim sendo, vários estressores são capazes de aumentar os níveis plasmáticos de melatonina devido ao aumento da expressão gênica da AANAT. Parece que estes fenômenos são universais, e ocorrem em todos os organismos unicelulares, plantas e animais, incluindo o homem como um mecanismo protetor contra danos celulares provocados por radicais livres. Os mecanismos moleculares para estes eventos ainda são desconhecidos. É provável o envolvimento da via AP-1¹ que é um fator de transcrição regulado por estresse oxidativo em muitos tipos celulares. Em mamíferos, o estresse estimula a produção de glicocorticóides nos organismos aumentando a expressão gênica de enzimas ligadas à síntese de melatonina, pois o promotor da HIOMT possui um sítio de ligação para a AP-1 (TAN et al., 2007).

Se o estresse oxidativo é intenso e se o consumo de melatonina é maior do que a quantidade que foi produzida, há uma rápida diminuição nos níveis de melatonina. Neste caso

¹ Proteína ativadora que se liga a seqüências de DNA na região promotora de vários genes os quais estão envolvidos na regulação da proliferação celular.

isso se dá ao fato de que a melatonina serviria como um mecanismo de defesa de primeira linha contra danos oxidativos. Fenômenos similares também foram observados em ratos expostos a agentes químicos. Assim, o estado oxidativo dos organismos pode modificar o metabolismo da melatonina, e quanto mais alto este estado estiver, mais AFMK é produzido (N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina), que é um metabólito da melatonina com mais poder antioxidante do que a melatonina). Esta é a razão pela qual a AFMK, e outro metabólito da melatonina, a 3-hidroxi-melatonina cíclica, podem ser utilizadas como um indicador do nível de estresse oxidativo nos organismos (TAN et al., 2007).

1.5 Origem dos danos ao DNA

A constituição físico-química dos nossos genes não é estável e está sujeita a formação constante de lesões, que são alterações na estrutura química da molécula de DNA original. Como o DNA é o maior alvo de agentes genotóxicos, estas alterações podem resultar em disfunções celulares, como instabilidade genética, mutagênese ou morte celular (apoptose ou necrose). Estas lesões podem surgir de três causas principais:

- *Espontâneas,*
- *Por produtos do metabolismo celular e...*
- *Ambiental.*

As lesões *espontâneas* ocorrem devido à instabilidade inerente das ligações químicas específicas dos nucleotídeos em certas condições de temperatura e pH. Os *produtos do metabolismo celular* constituem uma ameaça à integridade da DNA e, dentre eles, incluem-se as espécies reativas de oxigênio, derivadas do processo de respiração celular. Já as lesões *ambientais*, são resultantes de interações da molécula do DNA com diferentes agentes físicos e compostos químicos, presentes no meio ambiente. A frequência com que as lesões espontâneas ocorrem no DNA é relativamente alta: 25000 bases por dia em uma célula humana contendo o seu genoma total (3×10^9 pares de bases) (COSTA et al., 2003; HOEIJMAKERS, 2001; FRIEDBERG et al., 2001).

Segundo Friedberg, (2001), [...] o resultado dos danos ao DNA é diverso e geralmente adverso [...]. Os termos que são utilizados para definir mutação podem ser confusos e às vezes utilizados erroneamente. Lesões no DNA podem ser definidas para o genoma como

mutações, que correspondem a modificações do código genético. Estas mutações podem, portanto, ser transmitidas à descendência celular e levar à formação de tumores. Efeitos agudos provenientes de distúrbios no metabolismo promovem um atraso no ciclo celular ou mesmo a morte celular. Efeitos em longo prazo podem resultar em mutações irreversíveis que contribuem para a oncogênese.

A associação entre alterações genéticas e câncer humano foi observada há algumas décadas. Diversos estudos citogenéticos revelaram que anormalidades cromossômicas estão ligadas ao desenvolvimento de certos cânceres. Por exemplo, uma translocação de um cromossomo, chamado de cromossomo Philadelphia, é frequentemente encontrado em células sanguíneas brancas de pacientes com leucemia. Outro dado importante é que células tumorais exibem extensiva instabilidade genética resultando em aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, como a aneuploidia (SNUSTAD-SIMMONS, 2001).

Outro dado importante que deve ser considerado é que a apoptose é um processo fisiológico, e que contribui para manter constante o número de células em tecidos e órgãos e ajuda a remover células desnecessárias e danificadas. Se a apoptose é suprimida, pode resultar no desenvolvimento de câncer e tumores. Um exemplo é a super-expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2, que pode levar ao desenvolvimento de linfomas e de hiperplasia linfóide. Mas, ao contrário do que foi observado, a apoptose é essencial para a terapia de neoplasmas e doenças autoimunes. Durante a apoptose, as células sofrem mudanças morfológicas e moleculares, como a formação de “*blebs*²” na membrana celular, fragmentação do DNA em fragmentos de 180 pares de bases, condensação da cromatina ou externalização de fosfoditilserina no lado extracelular da membrana citoplasmática (ROSER et al., 2001).

Quebras na fita de DNA, como descrito no processo apoptótico, também ocorrem como resultado de agentes genotóxicos, os quais causam dano ao DNA. O vínculo entre agentes químicos e a molécula de DNA se dá pela formação de ligações covalentes denominadas “*adutos*”. Alguns adutos de base resultantes podem provocar lesões promutagênicas, que afetam profundamente os processos de replicação e reparo do DNA. O ataque direto ao esqueleto de açúcar de ribose pode resultar em quebras de fita ou sítios álcililáveis, os quais são rapidamente suscetíveis a quebras. Roser, et al., 2001 observou que a substância Staurosporina (inibidor da proteína quinase C) induziu apoptose, mas não produziu danos ao DNA. Outra droga avaliada foi MNNG (indutor de quebras na fita do DNA), a qual

² Bolhas ou protuberâncias na membrana da célula em apoptose.

não foi capaz de provocar apoptose, evidenciando assim que o dano ao DNA não se correlaciona necessariamente com apoptose induzida por substâncias genotóxicas.

1.6 Mecanismos de Reparo do DNA

Segundo Costa et al., 2004:

[...] durante a evolução foram selecionadas diversas estratégias a fim de minimizar os efeitos deletérios das lesões induzidas no DNA. As células dos organismos vivos são equipadas com um grande número de enzimas envolvidas em impedir ou reparar erros de cópia, quebras espontâneas e outros tipos de alterações que ocorrem na estrutura do DNA. Estas enzimas estão organizadas em redes metabólicas complexas que regulam e asseguram tanto a estabilidade do DNA quanto sua fidelidade na duplicação. Os sistemas de reparo de DNA devem ter surgido muito cedo na evolução, pois as vias de reparo conhecidas são altamente conservadas em diferentes organismos, de procariontes a eucariontes [...].

Existem mecanismos de reparo específicos para cada tipo de lesão. Um exemplo são as lesões que causam distorções na dupla fita e que são reconhecidas e removidas pelo reparo por excisão de nucleotídeos (NER). É o caso dos dímeros de pirimidina (CPD) e fotoprodutos 6-4, induzidos por luz UV, e de algumas bases contendo adutos químicos. As lesões mais sutis, como as pequenas modificações de base induzidas por agentes oxidativos são removidas pelo reparo por excisão de bases (BER). As quebras nas duplas fitas de DNA (quebras duplas), são lesões altamente tóxicas e são reparadas por vias dependentes de recombinação homóloga ou junção de extremidades. No entanto, em alguns casos observa-se sobreposição de atuação das diferentes vias de reparo na remoção das lesões (AGNEZ et al., 2003; COSTA et al., 2004).

O Reparo por excisão é uma via eficiente, porém limitada devido a sua especificidade enzima/substrato. Este mecanismo é mais geral e remove as bases lesadas do genoma e as substituem por seqüências de nucleotídeos não alteradas. Esta via é classificada em duas modalidades:

a) Reparo por excisão de bases (BER) é o principal guardião contra as lesões induzidas pelo metabolismo celular, incluindo aquelas resultantes das espécies reativas de oxigênio, metilação e desaminação. Estas lesões afetam apenas uma única fita do DNA, impedem a transcrição e duplicação e em uma reação do tipo corte-cola, são removidas do genoma. A lacuna resultante é preenchida utilizando a fita complementar como molde. Não foi identificada nenhuma desordem humana causada por deficiência em BER.

b) Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é o mais versátil em termos de reconhecimento da lesão. O NER atua em lesões que distorcem a dupla hélice, as quais interferem no emparelhamento de bases e obstruem a transcrição e duplicação. Os exemplos mais comuns de lesões reparadas pelo NER são os fotoprodutos produzidos por UV, adutos químicos e certos tipos de ligações cruzadas entre as duas cadeias de DNA.

Existem duas subvias do NER: o GG-NER (NER do genoma global), que é responsável pela remoção das lesões no DNA nuclear como um todo e o reparo acoplado à transcrição (TCR) que remove as lesões bloqueadoras da transcrição.

Um defeito em qualquer componente do NER resulta em sérias conseqüências para os organismos. Em humanos, deficiência na atividade do NER resulta em três síndromes raras e recessivas: Xeroderma Pigmentosum, Síndrome de Cockayne e Tricotodistrofia (DE LATT et al., 1999.).

Um esquema geral do mecanismo de NER em células de mamíferos é apresentado na Figura 7 . Basicamente na primeira etapa (em GG-NER), há o reconhecimento das lesões que provocam distorções no DNA através do complexo XPC-hHR23B. Este complexo promove uma abertura parcial da dupla hélice do DNA. Em TCR, a lesão bloqueia a RNA polimerase II que é deslocada para permitir o acesso a dois fatores de reparo: CSA e CSB que parecem estar envolvidos no remodelamento da cromatina. Os estágios subsequentes das duas subvias, parecem ser idênticas. Duas proteínas XPB e XPD, que tem atividade DNA helicase, abrem a fita de DNA em cerca de 30 pares de bases ao redor da lesão. XPA confirma a presença da lesão e a enzima RPA (Replication Protein A) estabiliza o complexo enzimático. Por fim, duas endonucleases específicas cortam ao redor da lesão: XPG (incisão 3') e XPF (incisão 5') e após a incisão e remoção, há a síntese de um novo fragmento de empregando como molde a fita não lesada (HOEIJMAKERS, 2001; COSTA et al., 2004).

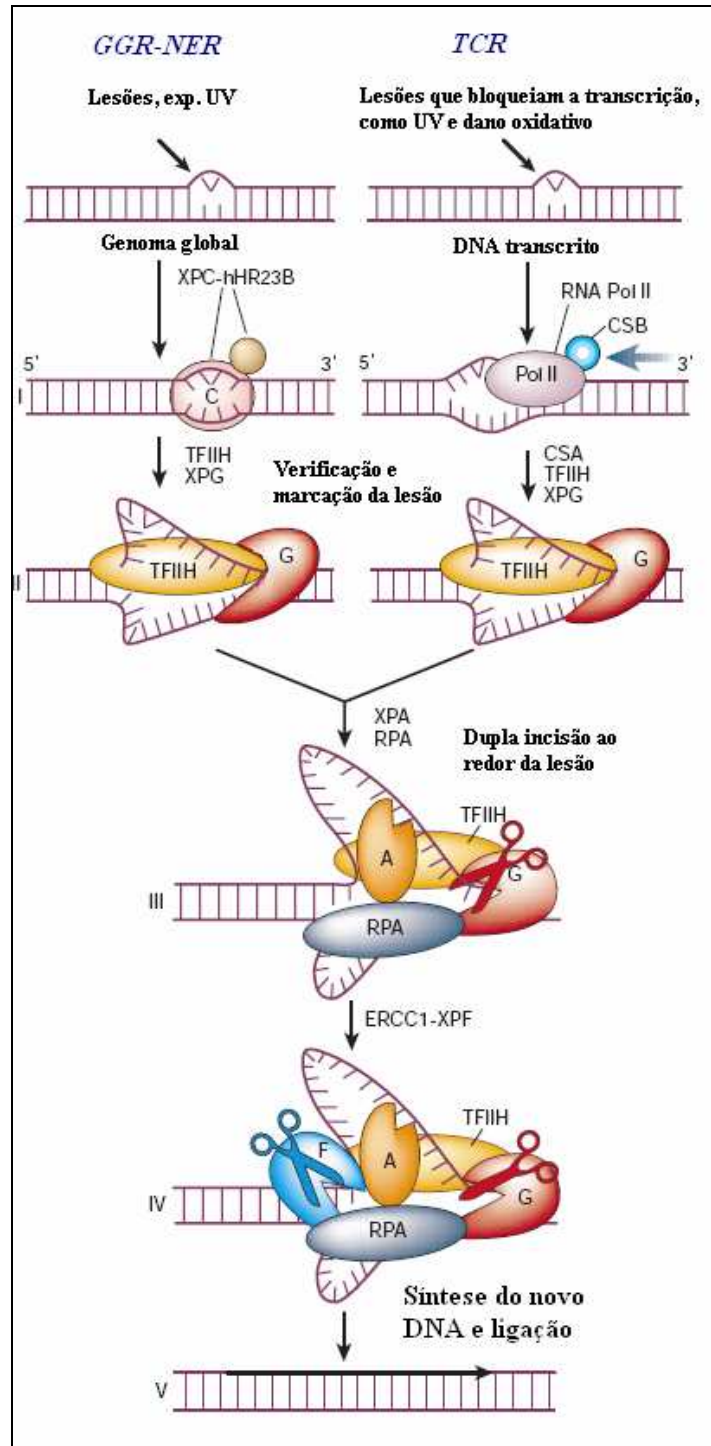


Figura 7 - Modelo de Reparo global do genoma e Reparo acoplado a transcrição. Baseado em HOIJMARKERS, 2001.

1.7 Ciclofosfamida (CPA) e os danos ao DNA

Os mecanismos pelos quais agentes químicos e seus metabólitos cancerígenos causam mutações genéticas tem sido intensamente investigado nas duas últimas décadas. O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as células normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Particularmente, agentes quimioterápicos lesam as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Este fato implica na maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior as infecções.

A ciclofosfamida (CPA) é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados na prática clínica. Porém, é uma das drogas genotóxicas mais potentes. Estudos sobre seus mecanismos de ação celular são bem complexos, pois a CPA requer ativação por enzimas hepáticas induzindo efeitos genotóxicos em uma variedade de sistemas biológicos (Hengstler *et al.*, 1997). Em testes *in vivo* com mamíferos, seu efeito mutagênico não foi encontrado apenas em células somáticas, mas também em células germinativas de animais experimentais. A exposição à CPA em hospitais e na indústria, além do uso terapêutico comum, também pode causar efeitos genotóxicos (HARTMANN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1995).

A CPA (Figura 8) é um pó fino, branco, sem odor, cristalino, com peso molecular de 279.1 ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$). É um derivado cíclico do agente alquilante mostarda nitrogenada. É solúvel a 20°C em 25 partes de água destilada para 1 parte de etanol ou em solução salina. A solução aquosa retém a atividade por poucas horas a temperatura ambiente, mas a hidrólise ocorre a temperaturas abaixo de 30°C. A administração de CPA é por via intravenosa, e sua meia-vida no organismo é de aproximadamente 4 horas. No entanto, a droga e/ou seus metabólitos podem ser detectados no plasma por até 72 horas. A CPA não apresenta grande afinidade pelas proteínas plasmáticas. A droga inalterada e seus metabólitos cruzam a barreira hemato-encefálica. (ANDERSON *et al.*, 1995).

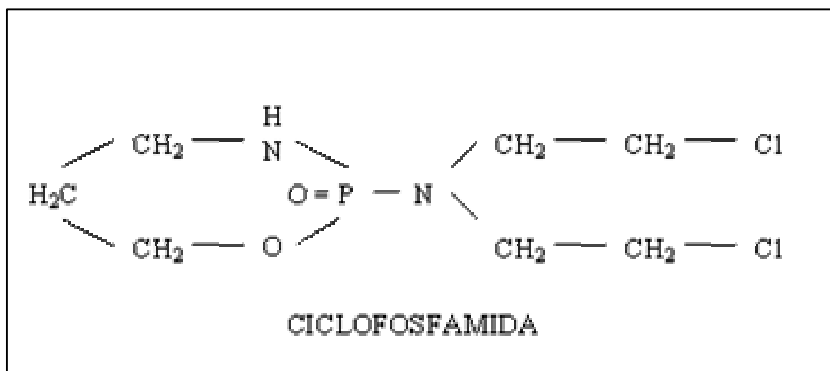


Figura 8 – Estrutura Molecular da Ciclofosfamida (CPA)

A transformação metabólica da CPA gera espécies alquilantes ativas. Ocorre, principalmente, no fígado, por meio de um sistema enzimático de oxidação realizado pelo retículo endoplasmático liso. Esse sistema envolve algumas enzimas do complexo Citocromo P450: CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C e CYP3A4 que hidroxilam a CPA. Essas enzimas são responsáveis pela reação de ativação inicial de hidroxilação da CPA, a qual produz a 4-hidroxíciclofosfamida (4-OHCP), que existe em equilíbrio com a aldofosfamida (Figura 9). É oxidado pela ligação do NAD aldeído desidrogenase produzindo o 4-cetociclofosfamida (4-keto-CP) e a carboxifosfamida. A carboxifosfamida não é tóxica, mas em pH baixo, pode transformar-se em mostarda nitrogenada, que é um potente agente alquilante. A aldofosfamida sofre β -eliminação espontânea para produzir acroleína e mostarda fosforamida (PAM), que é a maior espécie citotóxica do metabolismo da CPA, responsável pela sua atividade antineoplásica. Sua meia vida celular é de 40 minutos, e sofre hidrólise espontânea para a forma reativa intermediária aziridium, a qual alquila o DNA. Há ainda outros produtos citotóxicos que incluem o cloroacetaldeído, formado pela N-oxidação, e a mostarda nitrogenada, formada pela clivagem enzimática do resíduo de fosfamida da carboxifosfamida. A aldofosfamida é quebrada por beta eliminação espontânea liberando assim a fosforamida mostarda (MATALON et al., 2004).

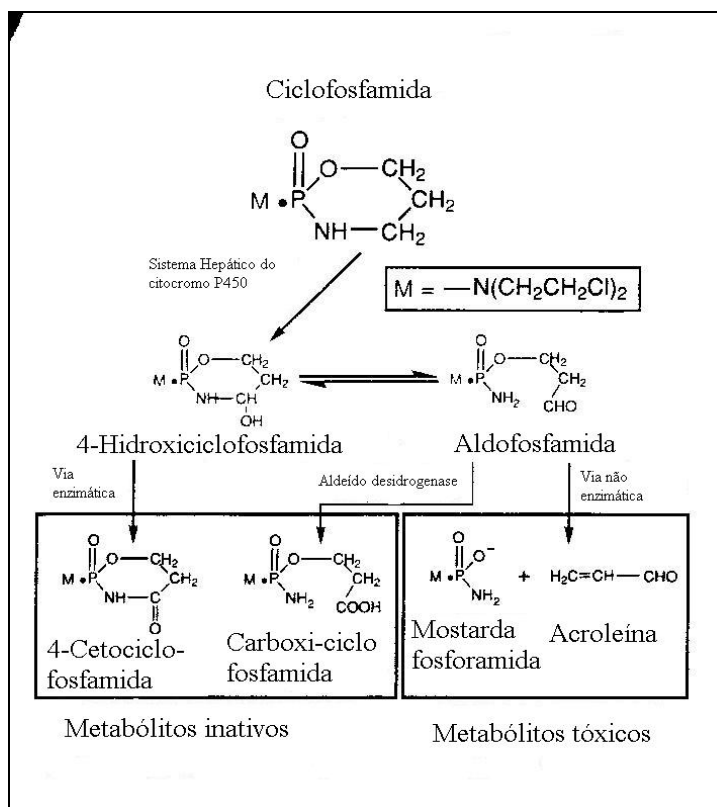


Figura 9 - Metabolismo da ciclofosfamida (Baseado em ALBERTS, 2004).

A acroleína é um aldeído insaturado, e em baixas doses, pode inibir a proliferação celular, aumentando a apoptose. É possível que a acroleína module a expressão de um ou mais genes relacionados com crescimento e stress celular ou com fatores de transcrição secundários como a redução da glutathiona (GSH) o qual é rapidamente reduzida com o tratamento com acroleína. A ativação de fatores transcripcionais nucleares (NF-κ B) e da proteína ativadora 1 (AP-1) também podem ser inibidas pela acroleína (MATALON et al., 2004).

A seletividade da CPA por células cancerosas parece estar relacionada à estabilidade da 4-OHCP a níveis de pH fisiológico, a qual pode ser utilizada como uma molécula transportadora para mostarda fosforamida reativa e em baixos níveis da atividade de aldeído desidrogenase em células cancerosas (comparada a células normais) resultando em lenta oxidação da 4-OHCP para o 4-keto-CP que não é tóxica (ANDERSON et al., 1995).

A CPA é mutagênico químico que transfere grupos alquil ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{CH}_2$) para as bases do DNA. O principal mecanismo de mutagênese por agentes alquilantes envolve a transferência de grupos metil ou etil para as bases do DNA, resultando em potenciais

pareamentos de bases alteradas. Os agentes alquilantes, particularmente os disfuncionais (aqueles com 2 grupos alquil reativos), atravessam os filamentos ou as moléculas de DNA e induzem quebras cromossômicas, resultando em vários tipos de anomalias cromossômicas. Os agentes alquilantes induzem todos os tipos de mutações, inclusive transições, tranversões e mudanças de matriz de leitura, e mesmo anomalias, com frequência relativa que depende da reatividade do agente envolvido. Outros produtos de alquilação ativam processos de reparo de DNA livres de erro (SNUSTAD-SIMMONS, 2001).

Um dos estudos mais recentes sobre agentes alquilantes foi realizado por Franke, 2005 mostrando que a CPA pode induzir processos neoplásicos, pois é uma agente que alquila macromoléculas orgânicas, incluindo o DNA e o RNA. A CPA induz depuração e despirimidização, bem como a formação de monoadutos e crosslinks (ligações covalentes entre as fitas complementares do DNA que bloqueiam a replicação e a transcrição). Além destes efeitos, pode induzir mutações gênicas (em procariontes, fungos, insetos, plantas e células de mamíferos), efeitos cromossômicos (plantas, insetos, células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*), síntese não programada do DNA e trocas entre cromátides irmãs (células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*).

Algumas mutações provocadas pela ciclofosfamida podem causar a perda do controle do ciclo celular. A p21^{WAF1/CIP1} é conhecida por ser um inibidor de ciclina dependente de quinase. Em consequência, as células estacionam em G₁ e G₂ até que o DNA danificado seja reparado e os níveis de p21 caiam. A p21 é um alvo transcricional de outra proteína envolvida no controle do ciclo celular, a p53. Assim, atrasos em G₁, por exemplo, permitem tempo para que a célula repare o DNA danificado. (LODISH et al., 2002).

Os agentes alquilantes, em geral, causam mutações na posição O⁶-guanina do DNA, resultando na formação da base pró-mutagênica O⁶-metilguanina. Essas mutações causam alterações na forma do DNA (adutos), que são removidos pela O⁶-metilguanina-DNA metil transferase (MGMT) que está presente em todos os tecidos normais, porém, ausente em processos tumorigênicos. A MGMT repara lesões genotóxicas induzidas no DNA por agentes alquilantes quimioterápicos como a ciclofosfamida. A expressão normal da MGMT em humanos pode ser o resultado da ativação de oncogenes ou da inativação de genes supressores de tumor. Estudos *in vitro* mostram que o tipo selvagem da p53 age como inibidor da expressão da MGMT (OSANAI et al., 2005).

1.8 Melatonina e a Defesa contra danos ao DNA

Existem diversas evidências sobre as propriedades anti-carcinogênicas e oncostáticas da melatonina. Esta característica é atribuída, entre outras coisas, a sua poderosa ação antioxidante (SLIWINSKI et al., 2007). Este indol é capaz de detoxicar uma variedade de radicais livres e intermediários de espécies reativas de oxigênio. A melatonina previne a peroxidação de lipídeos de membrana e da apoptose e protege o DNA de danos induzidos por radicais livres (ELMEGEED et al., 2007).

Há um estudo sobre o efeito da melatonina contra estresse oxidativo induzido pela CPA em tecidos de camundongos e este efeito seria devido a uma ação profilática. Este estudo *in vivo*, foi realizado por Manda et al. (2003), o qual o autor se refere à CPA como um potente agente alquilante que produz o íon carbonium ativo, o qual reage com ácidos nucléicos e proteínas. O estresse oxidativo leva a peroxidação, oxidação de proteínas e carboidratos e desordens metabólicas. Os resultados obtidos com este estudo indicam que a melatonina age aumentando os níveis de glutathione e diminuindo os níveis de glutathione peroxidase na corrente sanguínea de camundongos. Vale ressaltar que, após a administração de CPA, há um aumento na atividade da fosfatase ácida plasmática localizada nos lisossomos. Um aumento na atividade do complexo de Golgi e peroxidação das membranas dos lisossomos, provocado pela CPA, possivelmente resulta no influxo de enzimas causando um aumento nos níveis de fosfatase ácida. Em contrapartida, o tratamento com a melatonina pode diminuir os níveis de fosfatase ácida e peroxidação lipídica. Adicionalmente, a CPA diminui a atividade da fosfatase alcalina, que tem um papel importante na manutenção da permeabilidade celular e age sobre monofosfoesteres. Assim, os danos causados pela CPA na membrana celular pode ser a razão do declínio da atividade da fosfatase ácida.

A melatonina também protege diretamente as células de mutações espontâneas e inerentes ao próprio metabolismo, como o acúmulo de mutações em células somáticas e germinativas, devido ao processo de envelhecimento e induzidas por uma série de drogas ou substâncias químicas tóxicas ao organismo (ANISIMOV et al., 2006).

Diversos estudos demonstram que a melatonina inibe a apoptose, e muitos deles relatam essa inibição em células cerebrais induzidas por espécies reativas de oxigênio (ROS), cainato, peptídeo β amielóide. Baydas et al., 2005, investigou os mecanismos pelos quais a melatonina reduz a apoptose induzida por homocisteína. Consistente com suas propriedades antioxidantes, a melatonina reduziu a peroxidação lipídica em hipocampo de ratos com

hipercisteinemia. Adicionalmente, o tratamento com melatonina diminuiu a liberação do citocromo C da mitocôndria, e reduziu a ativação da caspase 3 e 9 induzida por homocisteinemia. Vale ressaltar que a homocisteinemia crônica leva à clivagem da polimerase e, conseqüentemente, a fragmentação do DNA, e a melatonina inibiu essa clivagem, reduzindo danos ao DNA (BAYDAS et al., 2005).

Além disto, foi visto que baixas doses de melatonina – entre 10^{-7} e 10^{-9} M (concentrações fisiológicas) – inibem a apoptose em cultura de timócitos de camundongos tratados com dexametasona. A administração de melatonina (15mg/l) na água de beber desses animais, por 40 dias, atenuou a proliferação de tumor de cólon e de células em apoptose (ANISIMOV et al., 2006).

Em uma revisão de Reiter, 2002, foi descrito que a CPA após ativação metabólica por enzimas do citocromo P450 do sistema hepático, induz danos ao DNA em células de ovário de Hamster Chinês e, quando se adicionou melatonina ao meio de cultura, esses danos foram reduzidos. Neste caso, a mutagenicidade da CPA como um agente alquilante foi relacionada à formação do metabólito citotóxico mostarda fosforamida que, por fim, induziu *crosslinks*³ e lesões na fita de DNA. Este mesmo autor comenta que a melatonina, neste modelo, pode modificar a indução de aberrações cromossômicas e quebras entre cromátides irmãs, alterando o metabolismo da CPA por meio de sua ação antioxidante.

A CPA como uma agente quimeoterápico, porém clastogênico induz uma série de mutações, aberrações cromossômicas, micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs e inclusive a produção de radicais livres já estudados em diversos modelos animais como em ratos, camundongos, hamsters e em diversas espécies de peixes. Os metabólitos da CPA podem alquilar sítios nucleofílicos no DNA, RNA e proteínas gerando radicais livres de oxigênio e nitrogênio causando toxicidade a medula óssea, gônadas e bexiga. A melatonina mostra uma forte inibição da atividade clastogênica da CPA e reduz os danos causados na bexiga, diminuindo o stress oxidativo e inibindo a produção de iNos (ELMEGEED et al., 2007; ZHANG et al., 2007).

Embora a maioria dos estudos com melatonina e o seu papel anti-apoptótico tem sido realizado com células normais, há evidências de que em células tumorais a melatonina pode exercer um papel importante no controle do crescimento e desenvolvimento tumoral, promovendo a apoptose. Rubio et al. (2007) demonstrou que a melatonina reduz o

³ Ligações covalentes entre as fitas complementares do DNA que bloqueiam a replicação e a transcrição.

crescimento de células tumorais de pacientes com leucemia mielóide e inibiu a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S, aumentando a morte celular por apoptose. Foi observado, neste mesmo estudo, que o tratamento com melatonina elevou a liberação do citocromo C da mitocôndria, aumentando a atividade das caspases 3 e 9 e também uma “*upregulation*”⁴ da Bax e uma “*downregulation*”⁵ da Bcl-2.

Em 1998, Musatov e colaboradores publicaram um dos primeiros artigos sobre o efeito da melatonina na inibição de danos induzidos pela ciclofosfamida através do Teste Cometa. Este estudo mostrou que a proteção da melatonina é devido ao aumento nos níveis de glutathione e no fígado e da estimulação da atividade da glutathione peroxidase. Estes estudos hipotetizam a idéia de que a melatonina aumenta a redução metabólica de drogas como a ciclofosfamida.

Há ainda poucos estudos na literatura sobre melatonina e mecanismos de reparo do DNA. Sun et al., 2002 observou que a melatonina foi capaz de reduzir danos ao DNA do tipo “*DNA single strand breaks*”⁶ e “*double strand breaks*”⁷ em neurônios após derrame cerebral induzido, além de concluir que isto se dá pelo aumento da viabilidade celular dos neurônios e por aumento da expressão gênica de RNAm de um membro do complexo de reparo por excisão de nucleotídeos chamado ERCC6.

⁴ Regulação positiva

⁵ Regulação negativa

⁶ Dano em uma fita do DNA

⁷ Dano nas duas fitas do DNA

3 CONCLUSÕES

Neste trabalho, ficou demonstrado, de forma conclusiva, que a melatonina tem a capacidade de impedir a formação de aberrações cromossômicas. Essa demonstração veio do fato de animais pinealectomizados apresentarem uma taxa de aberração espontânea muito maior que os animais controles, somado ao fato de que a reposição de melatonina, nestes animais, reverteu completamente o quadro acima descrito.

Além disso, a melatonina foi capaz de reverter completamente o quadro de aberrações cromossômicas induzidas pela ciclofosfamida, indicando uma possibilidade de uso terapêutico quando da necessidade de uso de medicação quimioterápica.

Esse quadro repetiu-se e ficou mais evidente quando do estudo específico das lesões oxidativas pelo uso da Fpg embora a melatonina, assim como sua ausência (PINX) não interferiram com o processo de fragmentação do DNA.

Frente a esse quadro absolutamente evidente, indicativo que a melatonina, além da sua sabida ação antioxidante, pudesse estar mobilizando mecanismos de reparo do DNA, investigamos qual o mecanismo utilizado nesta ação, através do estudo da expressão de diversos genes envolvidos nesse processo.

De todos os genes estudados, aquele que teve de forma mais consistente, sua expressão aumentada, sempre, pela melatonina foi o gene XPF.

Os outros genes, sejam os envolvidos com mecanismos de reparo (MGMT, TOP1, CSB) ou com ciclo celular e sinalização de toxicidade (p53, p21) ou apoptose (Bcl-2, Bax) não apresentara uma resposta consistente á ausência ou presença de melatonina. Sua expressão sempre pareceu multideterminada.

Dessa forma, os mecanismos envolvidos com o reparo do DNA mobilizados pela melatonina parecem, em parte, mas consistentemente, mobilizar a expressão do gene XPF.

Outros genes poderiam estar envolvidos tais como PARP1, XPV, XPC, Rad 51. Pretende-se investigar no futuro pelo uso da técnica de microarray.

Com todos estes dados observados, podemos concluir que:

- ❖ Melatonina é anti-mutagênica;
- ❖ A melatonina por si só induziu a expressão do gene XPF de reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

- ❖ Assim como a melatonina reposta no animal PINX e administrada nos animais que receberam a CPA, induziram um aumento na expressão de Top1.
- ❖ A melatonina foi capaz de facilitar e acelerar o processo de reparo dos danos induzidos pela CPA avaliados pelo Ensaio Cometa.
- ❖ A Pinealectomia induz lesões oxidativas e a reposição com melatonina é capaz reverter este quadro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGNEZ, L. F.; MEDEIROS, S.; MARQUES, R.; PINHEIRO, M.; MENCK C.F. Processos de reparo de DNA: garantindo a estabilidade do material genético. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 49-79.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. RS: Editora Artes Médicas, 2004.

ANDERSON, D. ; BISHOP, J. B. ; GARNER, R. C. ; OSTROSKY-WEGMAN, P. ; SELBY, P. B. Cyclophosphamide: Review of this mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutat. Res.**, v.330, p. 115-181, 1995.

ANISIMOV, V. N. ; POPOVICH, I. G. ; ZABEZHINSKI, M. A. ; ANISIMOV, S.V.; VESNUSHKIN, G. M. ; VINOGRADOVA, I. A. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1757, p. 573-589, 2006.

ANWAR, M. M.; MAHFOUZ, H.A. AND ARAFAT, S.S. Potential protective effects of melatonin on bone marrow of rats exposed to cytotoxic drugs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119A, n. 2, p. 493-501, 1998.

ARENDRT, J. 2007. Aron Lerner, who discovered melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 43, p 106-107.

ARENDRT, J. **Melatonin and Mammalian Pineal Gland**. Cambridge: Published by Chapman & Hall, University Press, 1995.

ATES, O.; CAYLI, S.; GURSES, I.; YUCEL, N.; ALTINOZ, E.; IRAZ, M.; KOCAK, A.; YOLOGLU, S. Effect of pinealectomy and melatonin replacement on morphological and biochemical recovery after traumatic brain injury. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.24, p. 357-363, 2006.

ATES, O.; CAYLI, S.; GURSES, I.; YUCEL, N.; ALTINOZ, E.; IRAZ, M.; KOCAK, A.; YOLOGLU, S. Does pinealectomy affect the recovery rate after spinal cord injury? **Neurol. Res.**, v.29, n. 6, p.533-539, 2007.

BADR, E. K.; EL HABIT F.M.; HARRAZ, M.M. Radioprotective effect of melatonin assessed by measuring chromosomal damage in mitotic and meiotic cells. **Mutat. Res.**, v. 444, p. 367-372, 1999.

BAYDAS, G.; KOS, T.S.; TUZCU, M.; ETEN, E.; NEDZVESTSKY, V.S. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. **J. Pineal Res.**, v. 43, p.225-231, 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAYDAS, G.; REITER, R.J.; AKBULUT, M.; TUZCU, M. AND TAMER, S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. **Neuroscience**, v. 135, p.879-886, 2005.

CALONGE, T. M.; O'CONNELL, M. J. Turning off the G₂ DNA damage checkpoint. **DNA Repair**, v. 7, p.36-140, 2008.

CHETSAWANG, B.; PUTTHAPRASART, C.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; GOVITRAPONG, P. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. **J. Pineal Res.**, v. 41, p. 116-123, 2006.

CIPOLLA NETO, J.; AFECHE, S.C. Glândula pineal. *In*: AIRES, M. M. 3. ed. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara-Koogan, 2007. cap. 64, p. 805.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutat. Res.**, 2008. In press.

COSTA, R. M. A.; CHIGANÇAS, V.; GALHARDO, R. S.; CARVALHO, H.; MENCK, C. F. M. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, p. 1083-1099, 2003.

COSTA, R. M.A.; MENCK C.F. Genes de reparo de DNA. *In*: Carlos G. Ferreira; José Claudio C. Rocha. (Org.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 1, p. 43-55.

CUI, P.; LUO, Z.; ZHANG, H.; SU, Y.; LI, A.; LI, H.; ZHANG, J.; YANG, Z.; XIU, R. Effect and mechanism of melatonin's action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. **J. Pineal Res.**, v. 41, n. 4, p. 358-62, 2006.

DE LAAT, W.L.; JASPERS, N.G.; HOEIJMAKERS, J.H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes Dev.**, v. 13, n. 7, p.768-85, 1999.

EL-DEIRY, W. S. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncogene**, v. 22, p. 7486-7495, 2003.

ELMEGEED, G.A.; KHALIL, W.K.; RAOUF, A.A.; ABDELHALIM, M.M. Synthesis and in vivo anti-mutagenic activity of novel melatonin derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 5, 2007.

FORD, C.E.; HAMERTON, J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. **Stain Technol.**, v. 31, p. 247-251, 1956.

FOULKES, N.S.; BORJINGIN, J.; SNYDER, S.H.; SASSONI-CORSI, P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **TINS**, v. 20, p. 487-92, 1997.

FRANKE, S.I.R.; PRÁ, D.; ERDTMAN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. Influence of orange juice over genotoxicity induced by alkylating agents: an *in vivo* analysis. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 279-283, 2005.

- FRIEDBERG, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nat. Rev.**, v. 1, p. 22-33, 2001.
- FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C. AND SIEDE, W. **DNA repair and mutagenesis**. Washington, D.C.: Ed. Am. Soc. Microbiol. , 1995. 698 p.
- GESING, A.; JAGIELA J; LEWINSKI, A. Melatonin does not affect p21 expression in rat thyroid follicular cells. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 24, n. 5, p.310-3, 2003.
- GUEST, L.; UETRECHT, J. Drugs toxic to the bone marrow that target stromal cells. **Immunopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 103-112, 2000.
- HARTMANN, A.; HERKOMMER, K.; GLÜCK, M.; SPEIT, G. DNA-Damaging effect of cyclophosphamide on humana blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the Single-cell gel test (Comet Assay). **Env. Mol. Mut.**, v. 25, p. 180-187, 1995.
- HENGSTLER, J.G.; HENGST, A.; FUCHS, J.; TANNER, B.; POHL, J.; OESCH, F. Induction of DNA crosslinks and DNA strand lesions by cyclophosphamide after activation by cytochrome P450 2B1. **Mutat. Res.**, v. 373, p. 215-223, 1997.
- HODDE, K. C. The vascularization of the rat pineal organ. *In*: KAPPERS, J.A.; PÉVET, P. (Ed.). **Progress in brain research. The pineal gland of vertebrate including man**. North-Holland: Elsevier, 1979. cap. 52, p. 39-44.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature** v. 411, p. 366-374, 2001.
- HUPP, T.T & WALKINSHAW, M. Multienzyme assembly of a p53 transcription complex. **Nature Structural & Molecular Biology** v. 14, p.10, 2007.
- I.A.E.A. **Biological dosimetry chromosomal aberrations analysis for dose assesment**. International Atomic Energy Agency. Technical Reports Series n° 260, Vienna, 63, 1986.
- JO VANDESOMPELE, KATLEEN DE PRETER, FILIP PATTYN, BRUCE POPPE, NADINE VAN ROY, ANNE DE PAEPE AND FRANK SPELEMAN. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7, 2002.
- JOU MJ, PENG TI, REITER RJ et al. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. **J Pineal Res.**, v. 37, p.55–70, 2004.
- JUARISTI, J. A.; AGUIRRE, M., V.; TODARO, J. S.; ALVAREZ, M. A.; BRANDAN, N. C. EPO receptor, Bax and Bcl-xL expressions in murine erythropoiesis after cyclophosphamide treatment. **Toxicology**, v. 231, p.188–199, 2007.
- KAPPERS, J. A.; The development, topographic relations and innervation of the epiphysis cerebral in the albino rat. **Zietch Zellforsh**, v. 52, p. 163, 1960.
- KLEIN, M D.C. & WELLER, J.L. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. **Science**, v. 169, p. 1093-95, 1970.

KORATKAR, R.; VASUDH, A.; RAMESH, G.; PADMA, M.; DAS, U.N. Effect of melatonin on cis-platinum induced genetic damage to the bone marrow cells of mice. **Med. Sci. Res.**, v. 20, p.179-180, 1992.

KORF, H.W. & STEHLE, J.H. The pineal organ, its hormone melatonin and the photoneuroendocrine system. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol**, v. 146, p. 1-100, 1998.

KOSTER, D. A.; PALLE, K.; BOT, E. S. M.; BJORNSTI, MARY-ANN & DEKKER, N. H.. Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. **Nature Letters** v. 448, p.213-217, 2007.

LEPPARD, J. B.; CHAMPOUX, J. J. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. **Chromosoma** v.114, p. 75–85, 2005.

LI, G.; HO, V.C. p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high-and-low-dose ultraviolet radiation. **British J. Dermatology**, v. 139, p.3-10, 1998.

LIMA, F. B.; MACHADO, U. F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES S. M. F.; HELL, N. S.; OKAMOTO, M. N. O.; SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R. O. & CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275 (Endocrinol. Metab. 38): E934-E941, 1998.

LISSONI, P.; PITTALIS, S.; BRIVIO, F.; TISI, E.; ROVELLI, F.; ARDIZZOIA, A.; BARNI, S.; TANCINI, G.; GIUDICI, G. BIONDI, A. In vitro modulatory effects of interleukin-3 on macrophage activation induced by interleukin-2. **Cancer** v. 71, n. 6, p.2076-2081, 1998.

LIU, K.; KARL-ANTON KREUZER; LASS, U. AND SCHMIDT, C.A.. Assessment of chemosensitivity by monitoring bcl-2 transcript kinetics in acute myeloid leukemias. **Hematol Oncol**, v.23, p. 68–72, 2005.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods**, v. 25, p.402-8, 2001.

LODISH, H. **Biologia Celular e Molecular**. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2002.

LOTITO, L.; RUSSO, A.; CHILLEMI, G.; BUENO, S.; CAVALIERI, D.; CAPRANICO, G. Global transcription regulation by DNA topoisomerase I in exponentially-growing *S. cerevisiae* cells: activation of telomere-proximal genes by TOP1 deletion. **Journal of Molecular Biology**, 2008, In Press.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 25, p. 177–195, 2004.

MAESTRONI, G.; CONTI, A. Melatonin in relation to the immune system. In: Yu, H.S.; Reiter, R.J. (eds). **Melatonin Biosynthesis, Physiological effects and clinical applications**, Chapter 11. New York: CRC. Press, p. 289-309, 1993.

MAHAL, H.S.; SHARNA, H.S.; MUKHERJEE, T. 1999. Antioxidant Properties of Melatonin: A Pulse Radiolysis Study. **Free Radic. Biol. Med**, v. 26, p. 557-565.

- MANDA, K.; BHATIA, A.L. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. **Cell biology and toxicology**, v. 19, p.367-372, 2003.
- MARTINS, JÚNIOR. E.; FERNANDES, L.C.; BARTOL, I.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L.F.B.O. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumor-bearing rats. **J. Neuroimmunology**, v. 82, p. 81-89, 1998.
- MATALON, S.T.; ORNOY, A.; LISHNER, M. Review of potential effects of the commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs, (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta). **Reproductive Toxicology**, v. 18, p. 219-230, 2004.
- MATTER, B.; SCHIMID, W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. **Mut. Res.**, v. 12, n. 14, p.417-25, 1971.
- MIRKES, P.E.; LITTLE, S.A.. Cytochrome c Release from Mitochondria of Early Postimplantation Murine Embryos Exposed to 4-Hydroperoxycyclophosphamide, Heat Shock, and Staurosporine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 162, p. 197-206, 2002.
- MØLLER, M. Fine structure of pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **J. Micros. Res. Technol.**, v. 21, p. 188-204, 1992.
- MOORE, R.Y. Neural control of the pineal gland. **Behav. Brain Res.**, v. 73, p. 125-30, 1996.
- MUSATOV, S.A.; ANISIMOV, V.N.; ANDRÉ, V.; VIGREUX, C.; GODARD, T.; GAUDUCHON, P.; SICHEL, F. Modulatory effects of melatonin on genotoxic response of reference mutagens in the Ames test and the comet assay. **Mutat Res.**, v. 417, p. 75-84, 1998.
- NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F. AND RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunological Methods**, v. 139, p.271-279, 1991.
- OSANAI, T.; TAKAGI, Y.; TORIYA, Y.; NAKAGAWA, T.; ARUGA, T.; ILIDA, S.; UETAKE, H.; SUGIHARA, K. Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer. **Jpn J Clin Oncol**, v. 35, n. 3, p.121-125, 2005.
- PEDREAÑEZ, A.; RINCÓN, J.; ROMERO, M.; VIERA, N. AND MOSQUERA, J. Melatonin decrease apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, p. 1098-1105, 2004.
- PICINATO MC, HABER EP, CIPOLLA-NETO J, CURI R, CARVALHO CRD, CARPINELLI AR. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. **J. Pineal Res.**, p.156-160, 2002.
- POMMIER. Y.; REDON, C; ASHUTOSH R.V.; SEILER, J. A.; SORDET O.; TAKEMURA H.; ANTONY S.; LINGHUA MENG, ZHIYONG LIAO; KOHLHAGEN G.; HONGLIANG ZHANG, KOHN K. W. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. **Mut. Res.**, v. 532, p. 173-203, 2003.

PRABHAVATHI, P.A.; FATIMA, S.K.; RAO, M.S.; REDDY, P.P. Analysis of chromosomal aberration frequencies in the peripheral blood lymphocytes of smokers exposed to uranyl compounds. **Mutat Res.**, v.3: 466, n.1, p.37-41, 2000.

QUAY, W. B. **Pineal chemistry in cellular and physiology mechanisms**. KUGELMANS, I.C. (ed) Springfield: Thomas C.C., 1974.

QUAY, W. B. Retrograde perfusions of the pineal region and the question of pineal vascular routes to brain and choroid plexus. **A. J. Ant.**, v.137, p.387-402, 1973.

RAMALHO, A.T. **Subsídios à técnica de dosimetria citogenética gerados a partir da análise de resultados obtidos como acidente radiológico de Goiânia**. 131 f. Tese (Doutor em Biofísica) – I.B.C.C.F Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1993.

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

REITER, R.J. Melatonin: clinical relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 273-285, 2003.

REITER, R.J.; TAN, DUN-XIAN.; SAIZ, R.M.; MAYO, J.C. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. **J. Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p.1299-1321, 2002.

REITER, R.J.; TAN, DUN-XIAN; KIM, S. J.; MANCHESTER, L. C .; QI ,W.; GARCIA, J. J.; CABRERA, J. C; EL-SOKKARY, G.; AND ROUVIER-GARAY, V. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 110, n. 3, p.157-173, 1999.

ROSER, S. A.; BEATRICE-L. POOL-ZOBEL B, GERHARD RECHKEMMERA. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. **Mut. Res.**, v. 497, p.169-175, 2001.

RUBIO, S.; ESTEVEZ, F.; CABRERA, J.; REITER, R.J.; LORO, R.; QUINTANA, J. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. **J. Pineal Res.**, v. 42, p.131-138, 2007.

SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; KOHEN, R.; ALLEGRA, M. and HARDELAND, R. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum antioxidant and Free Radical Scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 181-197, 2002.

SAVAGE, J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. **J. Med. Genetics**, v.12, p.103-122, 1975.

SCHMID W. The micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 31, n. 1, p.9-15, 1975.

SEEBERG, E.; EIDE, L.; BJORAS, M. The base excision repair pathway. **Trends in Biochem Sci.**, v. 20, p. 391-397, 1995.

SHIBATA, T.; GLYNN, N.; MCMURRY, T. B. H.; MCELHINNEY, R. S.; MARGISON, G. P.; WILLIAMS, D. M. Novel synthesis of O6-alkylguanine containing

oligodeoxyribonucleotides as substrates for the human DNA repair protein, O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT). **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 6, p. 1884-1891, 2006.

SHU, K.X.; LI, B.; WU, L.X. The p53 network: p53 and its downstream genes. **Colloids Surf B: Biointerfaces.**, v. 55, n. 1, p. 10-18, 2007.

SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 325-95, 2003.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SLIWINSKI, T.; ROZEJ, W.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; REITER, R.; BLASIAK, J. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage—Chemical inactivation versus base-excision repair. **Mutation Res.**, v. 634, n. 1-2, p.220-7, 2007.

SNUSTAD-SIMMONS. Mutaç o, Reparo do DNA e Recombinaç o In: SNUSTAD-SIMMONS (Ed). **Fundamentos de Gen tica**. S o Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2001. Cap 14 .

SOURDEVAL, M.;LEMAIRE, C.;DENIAUD, A.;TAYSSE, L.;DAULON, S.;BRETON, P.;BRENNER, C.;BOISVIEUX-ULRICH, E.;MARANO, F. Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. **Apoptosis** v. 1, n. 9, p.1545-59, 2006.

SUN, F.Y.; LIN, X.; MAO, L.Z.; GE, W.H.; ZHANG, L.M.; HUANG, Y.L.; GU, J. Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia. **J Pineal Res.**, v. 33, n. 1, p.48-56, 2002.

TAN DUN-XIAN; LUCIEN C.; MANCHESTER, MARIA P. TERRON; LUIS J. FLORES AND RUSSEL J. REITER. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J. Pineal Res.**, v. 42, p. 28–42, 2007.

TAN DUN-XIAN; REITER, R.J ; MANCHESTER, L.C.; YAN, MEI-TING; EL-SAWI, M. TOSHIO OHTANIA; TOMOYUKI NAKAMURA; KEN-ICHI TODAB; FUKUMI FURUKAWAA. Cyclophosphamide enhances TNF-a-induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. **FEBS Letters** v. 580, p. 1597–1600, 2006.

VIJAYALAXMI, K.K; CHARLES, R. THOMAS JR. REITER, J.R., AND HERMAN, T.S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. **J of Clinical Oncology**, v. 20, n. 10, p. 2575-2601, 2002.

VOUSDEN, K.H AND LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nat. Rev., Molecular Cell Biology** v. 8, p.275, 2007.

WIJNHOFEN, S.W.P.; HOOGERVORST, E. M.; WAARD, H.; VAN DER HORST, G. T.J.; STEEG, H. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. **Mut. Res.**, v. 614, p. 77–94, 2007.

ZHANG, Q. H.; WU, C.F.; DUAM, L.; YANG, J.Y. Protective effects of ginsenoside Rg3 against cyclophosphamide-induced DNA damage and cell apoptosis in mice. **Arch Toxicol** v. 82, n. 2, p. 117-123, 2008.

ZHOU, J.; AHN, J.; WILSON, S.H.; PRIVES, C. A role for p53 in base excision repair. **EMBO J.**, v. 20, p. 914-923, 2001.