

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DA  
MELATONINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*  
*melanogaster* IRRADIADAS COM RAIOS GAMA

Eloiza Peres Rodrigues Lopes

UBERLÂNDIA – MG

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SISBI/UFU



1000194415

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DA  
MELATONINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*  
*melanogaster* IRRADIADAS COM RAIOS GAMA

Eloiza Peres Rodrigues Lopes

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

UBERLÂNDIA – MG

JUNHO - 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

11011  
515  
L864a  
TES/MEM

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGENOTÓXICO DA  
MELATONINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*  
*melanogaster* IRRADIADAS COM RAIOS GAMA

Eloiza Peres Rodrigues Lopes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA – MG

## FICHA CATALOGRÁFICA

- L864a    Lopes, Eloiza Peres Rodrigues, 1975-  
Avaliação do potencial antígenotóxico da melatonina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* irradiadas com raios gama / Eloiza Peres Rodrigues Lopes. - Uberlândia, 2000.  
70f. : il.  
Orientador: Mário Antônio Spanó.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Bibliografia: f. 55 – 70.  
1. Genética - Teses. 2. SMART - Teses. 3. Raios gama - Teses. 4. Melatonina - Teses. 5. *Drosophila melanogaster* - Teses. I. Universidade Federal de Uberlândia, Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.

CDU: 575

*Dedico este trabalho à minha avó Nilda, por ter sido um exemplo de humildade e força, para mim e para muitos, pois mesmo na hora de sua partida, soube dar exemplos de vida. No meu coração a sua lembrança é muito viva, e nele ficará para sempre a saudade daquele tempo, em que pude conviver e desfrutar do seu amor, sua bondade, atenção e carinho.*

*Ofereço este trabalho ao meu esposo Mateus pelo seu amor, companheirismo, dedicação e atenção, e também, à Natália pela feliz espera da sua chegada.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela orientação, amizade e também, por ter me transmitido seus valiosos conhecimentos.

Ao Dr. Ulrich Graf do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes, fotografias, e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, por suas sugestões, e pelo apoio e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catarina Satie Takahashi do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pelas valiosas sugestões na elaboração final deste manuscrito.

## AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do Curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Antônio Ariza Gonçalves Júnior, do Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela atenção e irradiação das larvas de *Drosophila melanogaster*.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cristina Munerato, do Laboratório de Mutagênese do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela ajuda prestada na realização da análise estatística.

Ao Prof. David George Francis da Universidade Federal de Uberlândia, pela revisão gramatical do Abstract.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que durante a realização do Curso de Mestrado em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia me forneceu uma Bolsa de estudo.

À minha mãe Luíza Peres de Assis pelo apoio e incentivo demonstrados durante toda a minha vida, ao meu pai Jorge Rodrigues da Silva, pelas oportunidades oferecidas, e aos meus irmãos que sempre me apoiaram.

Ao meu esposo Mateus de Azevedo Lopes, pelo amor, carinho, compreensão e toda a dedicação prestada na realização deste trabalho.

A todos os meus familiares, com os quais, mesmo distantes, pude contar com o carinho e compreensão.

Ao Sr. Jorge Luis da Costa Zumpano, funcionário do Núcleo de Processamento de dados, pela impressão gráfica e atenção.

À Sr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Vilela Gomes, pela amizade, carinho e apoio.

Ao Prof. Edson José Fragiorge, pela sua companhia calma e serena, e a todos os demais amigos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia, que prestaram ajuda na realização deste trabalho.

Às amigas Letícia Borges Euqueres Partata; Lúcia Maria Evangelista e a todos os outros colegas do Curso que caminharam juntos na realização de mais uma etapa.

Às amigas Raquel Salomão de Castro Chagas e Cátia Abrão Rangel que ajudaram na busca da literatura utilizada; ao Fábio Tonissi Moroni, do Laboratório de Bioquímica, pelo empréstimo de material bibliográfico, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria de Oliveira Cunha e Veridiana Cunha pelos favores prestados.

À Valeriana Cunha, Flaviane Stroppa Moreira e Lucélia Nobre Carvalho que, mesmo à distância, me apoiaram.

Às amigas do Curso de Ciências Biológicas e aos amigos da Igreja Presbiteriana Central de Uberlândia, que de certa forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

E a todos aqueles que me cercam, e que me ajudaram a trilhar verdadeiramente o caminho Daquele a quem tudo devo agradecer, Deus.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) .....	3
1.2. Melatonina.....	9
1.3. Radiação gama .....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Agente químico .....	17
3.2. Agente físico .....	17
3.3. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) .....	18
3.3.1. Linhagens estoque.....	18
3.3.2. Cruzamentos.....	18
3.3.3. Procedimentos .....	19
3.3.4. Tratamentos .....	19
3.3.5. Montagem de lâminas.....	20
3.3.6. Análise das asas .....	21
3.3.7. Análise estatística .....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Cruzamento padrão (ST).....	23
4.1.1. Descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH).....	23
4.1.2. Descendentes balanceadores heterozigotos (BH).....	27
4.2. Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) .....	33
4.2.1. Descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH).....	33
4.2.2. Descendentes balanceadores heterozigotos (BH).....	37
5. DISCUSSÃO .....	44
6. CONCLUSÕES .....	51
7. RESUMO .....	52

8. ABSTRACT .....	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 .....	25
TABELA 2 .....	26
TABELA 3 .....	28
TABELA 4 .....	35
TABELA 5 .....	36
TABELA 6 .....	38

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 .....	05
FIGURA 2 .....	06
FIGURA 3 .....	07
FIGURA 4 .....	09
FIGURA 5 .....	17
FIGURA 6 .....	20
FIGURA 7 .....	29
FIGURA 8 .....	30
FIGURA 9 .....	31
FIGURA 10 .....	32
FIGURA 11. ....	39
FIGURA 12.....	40
FIGURA 13.....	41
FIGURA 14.....	42
FIGURA 15.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido dextrribonucleico.....	DNA
Balanceadores heterozigotos.....	BH
Flare <sup>3</sup> .....	flr <sup>3</sup>
High bioactivation cross.....	HB
Marcadores trans-heterozigotos.....	MH
Melatonina.....	Mel
Multiple wing hairs.....	mwh
Oregon R.....	ORR
Sex Linked Recessive Lethal Test.....	SLRLT
Somatic Mutation And Recombination Test.....	SMART
Standard cross.....	ST

## 1. INTRODUÇÃO

A Genética Toxicológica vem se destacando, nos últimos anos, como uma área de pesquisa de grande importância, pois com o aumento crescente da exposição do homem a agentes químicos, físicos ou biológicos, tornou-se imprescindível estabelecer métodos avaliativos, que possibilitem identificar tanto as substâncias que comprometem o material genético, bem como revelar as que apresentam efeitos protetores.

Alterações na molécula de DNA podem levar à perda da heterozigose e, assim, manifestar doenças herdadas e induzir neoplasias (Guzmán-Rincón e Graf, 1995). O desenvolvimento de uma neoplasia freqüentemente depende do controle desordenado da diferenciação celular. A maioria das neoplasias parece originar-se de uma única célula que sofreu uma mutação somática. Entretanto, a progênie destas células deve sofrer outras mudanças, provavelmente várias mutações adicionais, antes de se tornarem neoplásicas (Alberts *et al.*, 1994).

As etapas do desenvolvimento de uma neoplasia são: iniciação, promoção e proliferação (Weinberg, 1996). Um tumor pode entrar em metástase pelo processo que envolve as proteínas *E-caderinas*, que são moléculas de adesão intercelular; *integrinas*, moléculas de superfície celular que ligam a matriz celular; *metaloproteínas*, que dissolvem as membranas basais e outras matrizes celulares (Ruoslahti, 1996). As células neoplásicas geralmente apresentam variabilidade no tamanho, na forma do seu núcleo, no número e estrutura de seus cromossomos. Possuem um cariótipo instável, onde genes são amplificados ou suprimidos e os cromossomos são perdidos, duplicados ou translocados, fazendo com que as células possuam uma falha na maquinaria hereditária (Alberts *et al.*, 1994).

As células possuem mecanismos intrínsecos que reparam o DNA danificado antes do início da fase-S do ciclo celular. Algumas doenças genéticas resultam de um mecanismo de reparo deficiente. Assim sendo, defeitos no sistema de reparo de DNA podem, portanto, influenciar na estabilidade genética, que pode se manifestar por meio do aumento da taxa de mutações pontuais, rearranjos cromossômicos e atraso da morte reprodutiva (Murnane, 1996).

Mesmo que o organismo apresente um aparato de mecanismos de reparo, faz-se necessário o uso de agentes antioxidantes. Estudos realizados em roedores (Konopacka *et al.*, 1998; Antunes e Takahashi, 1998; Antunes *et al.*, 2000) e em bactérias (Edenharder *et al.*, 1999) demonstraram o efeito de vitaminas que protegem ou previnem a molécula de DNA contra danos causados por agentes genotóxicos.

O termo antimutágeno é utilizado para definir um agente que reduz o número de mutações espontâneas ou induzidas, geradas em circunstâncias particulares. Os agentes antimutagênicos podem ser classificados como desmutágenos ou bioantimutágenos. Os desmutágenos são aqueles que inativam os agentes mutagênicos, ou seus precursores, pela inibição da atividade de enzimas metabólicas, ou previnem a interação dos mutágenos com o DNA. Os bioantimutágenos são aqueles que reduzem os efeitos genotóxicos por meio da modulação de mudanças celulares, envolvidas no reparo do DNA danificado (Kada *et al.*, 1982).

Ensaio experimentais que utilizam diferentes organismos, tais como bactérias, insetos e mamíferos, são rotineiramente empregados para a avaliação de substâncias genotóxicas e antigenotóxicas.

A *Drosophila melanogaster* é um organismo eucarioto amplamente utilizado na detecção de agentes químicos com atividade genotóxica, por possuir pequeno número de cromossomos, tempo curto de geração, características morfológicas controladas geneticamente, grande número de mutantes, linhagens muito bem caracterizadas geneticamente, sistema

enzimático capaz de detectar pró-mutágenos e pró-carcinógenos *in vivo*, produzir grande número de descendentes, além do fato de os sistemas testes que utilizam a *Drosophila* serem rápidos, confiáveis e de baixo custo (Graf e Singer, 1992).

### 1.1. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART)

---

Nas últimas duas décadas foram desenvolvidos alguns testes somáticos de curta duração que utilizam, como organismo teste, a *Drosophila melanogaster* e que foram denominados de Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) (Graf *et al.*, 1984; Vogel, 1987).

Os SMARTs têm sido considerados os substitutos promissores do conceituado teste do recessivo letal ligado ao sexo (Sex Linked Recessive Lethal Test – SLRLT) e possuem como vantagem o fato de serem rápidos, baratos e mais sensíveis do que o SLRLT (Vogel, 1987), sendo que os mais utilizados têm sido os SMARTs de olho e de asa (Vogel, 1992).

Os SMARTs permitem detectar um amplo espectro de eventos genotóxicos, tais como mutações pontuais, aberrações cromossômicas (deleções), bem como recombinações e conversões gênicas (Anexo 1).

O SMART de asa foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984) para detecção de agentes genotóxicos e, atualmente, tem demonstrado ser útil na detecção de agentes antigenotóxicos (Graf *et al.*, 1998).

As linhagens utilizadas no teste para detecção de mutações e recombinações somáticas em asas de *Drosophila melanogaster* são:

- *mwh/mwh* (*mwh* - multiple wing hairs)

- *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>s</sup> (flr<sup>3</sup> - flare<sup>3</sup>)*
- *ORR; flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>s</sup> (Oregon R; flare<sup>3</sup>)*

Os indivíduos da linhagem mhw possuem o gene marcador *mwh* no cromossomo 3 (3-0,3). Por ser uma mutação viável, a linhagem é mantida em homozigose. O marcador é caracterizado por expressar três ou mais pêlos por célula (Figuras 1 e 3).

Os indivíduos da linhagem flare<sup>3</sup> possuem o gene marcador *flr<sup>3</sup>* localizado no braço esquerdo no cromossomo 3, numa posição mais proximal (3-38,8). A mutação desta linhagem se manifesta por um pêlo modificado na célula, a qual se assemelha a uma chama (Figuras 2 e 3). O gene marcador *flr<sup>3</sup>* em homozigose é letal, ou seja, zigotos homozigotos para o gene *flr<sup>3</sup>* não conseguem se desenvolver até a fase adulta (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995). Por isto, foi desenvolvido um cromossomo balanceador TM3, BdS (Third Multiple 3, beaded-serrate) que mantém a heterozigose da linhagem. É característico deste balanceador, impedir a recombinação, ou seja, a troca de genes entre os cromossomos homólogos (Lindsley e Zimm, 1992).

A linhagem Oregon R; flare<sup>3</sup> também apresenta o gene marcador *flr<sup>3</sup>* na constituição genotípica, mas esta difere da linhagem flare<sup>3</sup> por apresentar os cromossomos 1 e 2, provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT, construída por Frölich e Würigler (1989), que conferem à linhagem uma alta atividade das enzimas citocromo P-450 (Hällström e Blanck, 1985), as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de pró-mutágenos e pró-carcinógenos (Dapkus e Merrel, 1977).

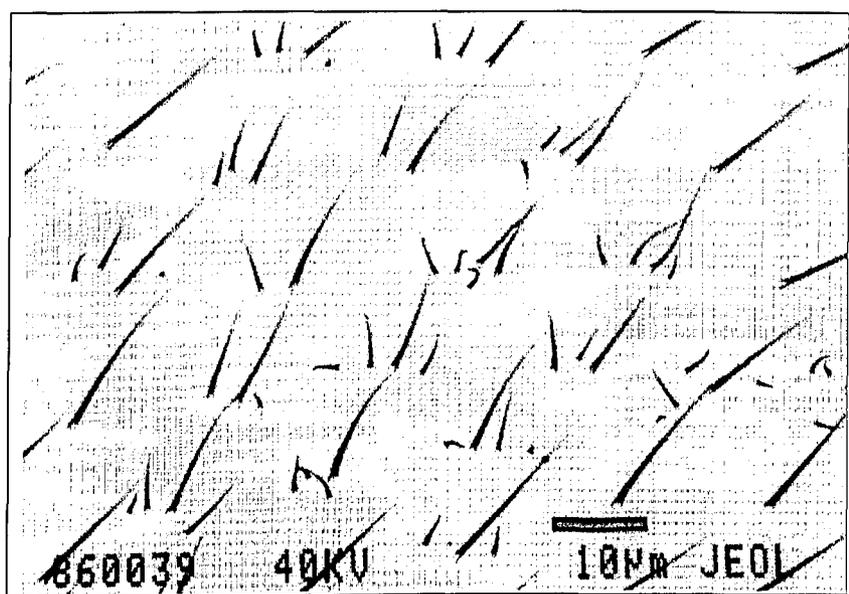


Figura 1. Fotomicrografia de uma mancha simples mwh (Cortesia do Dr. Ulrich Graf – Instituto de Toxicologia – Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça).

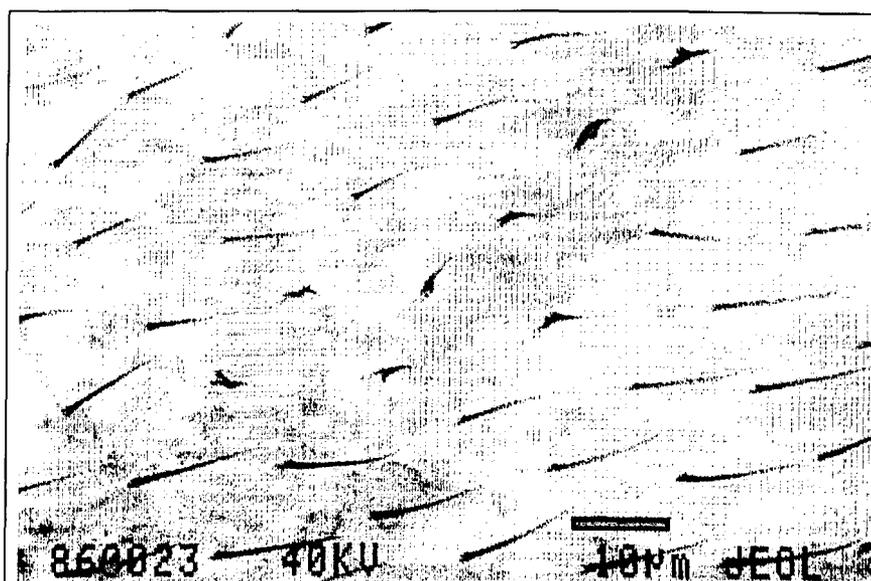


Figura 2. Fotomicrografia de uma mancha simples flr<sup>3</sup> (Cortesia do Dr. Ulrich Graf – Instituto de Toxicologia – Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça).

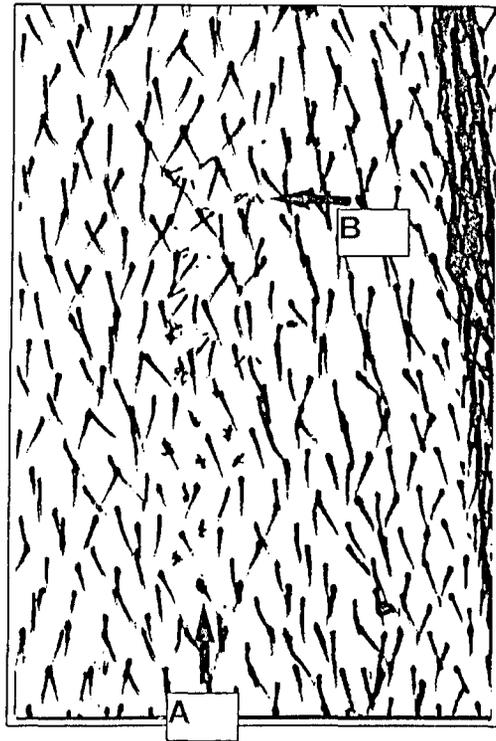


Figura 3. Fotografia de uma mancha gêmea  $mwh/flr^3$  vista ao microscópio de luz (400X). Seta A – pêlo flare; seta B – pêlos múltiplos (Cortesia do Dr. Ulrich Graf – Instituto de Toxicologia – Universidade de Zurich, Schwerzenbach, Suíça).

A partir dessas linhagens, foram efetuados dois diferentes cruzamentos: padrão (Standard cross – ST) e de alta capacidade de bioativação (High bioactivation cross – HB) cuja progênie será:

50 %  $\Rightarrow$  Marcadores Trans-heterozigotos (MH  $\Rightarrow mwh +/+ flr^3$ )

50 %  $\Rightarrow$  Balanceadores Heterozigotos (BH  $\Rightarrow mwh + /TM3, Bd^s$ )

Os adultos podem ser diferenciados fenotipicamente, pois o marcador  $Bd^s$  determina o aparecimento de um recorte na borda das asas, deixando-as com o aspecto serrilhado, enquanto que os adultos trans-heterozigotos apresentam a borda das asas normal (Graf *et al.*, 1984).

A análise é realizada inicialmente em indivíduos MH, pois estes podem expressar, em suas asas, pêlos mutantes originados de eventos genotóxicos ocorridos nos *loci* gênicos dos dois marcadores *mwh* e *flr<sup>3</sup>*. Ou seja, é possível detectar a ocorrência de eventos mutagênicos e recombinogênicos, enquanto que os descendentes BH têm como característica a presença do cromossomo balanceador TM3,  $Bd^s$  que impede a recombinação. Para que se tenha uma quantificação exata da taxa de mutação e recombinação, é necessário a análise dos descendentes BH.

Os pêlos mutantes são classificados em manchas e estas em *simples*, quando expressam somente um dos marcadores genéticos (*mwh* ou *flr<sup>3</sup>*), originadas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou recombinação distal (recombinação entre o *locus flr<sup>3</sup>* e *locus mwh*); e *gêmeas*, quando expressam os dois marcadores (*mwh* e *flr<sup>3</sup>*) na mesma mancha, originadas exclusivamente por recombinação proximal (recombinação entre o centrômero e o *locus flr<sup>3</sup>*) (Graf *et al.*, 1984).

As manchas ainda são classificadas quanto ao tamanho podendo ser *simples pequenas* (quando possui um ou dois pêlos mutantes) ou *simples grandes* (quando possui mais de dois pêlos mutantes). Durante a análise registra-se, também, a posição da mancha, de acordo com o setor da asa, determinada por regiões A, B, C', C, D, D' e E (Figura 4).

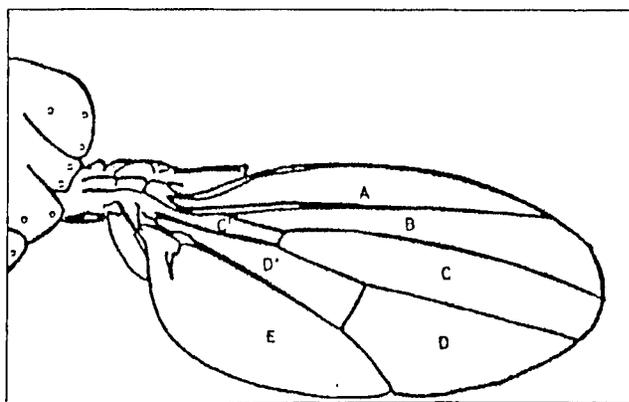


Figura 4. Desenho esquemático de asa de *Drosophila melanogaster* dividida em regiões A, B, C', C, D, D' e E.

## 1.2. Melatonina

---

A glândula pineal é um pequeno órgão endócrino localizado no cérebro. Foi, por décadas, considerada como vestigial, depois como controladora da reprodução sazonal e, recentemente, tem se atribuído a ela várias funções corporais (Reiter, 1973). O hormônio chefe mediador da glândula pineal é a melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Arendt, 1988). A melatonina é sintetizada a partir do triptofano (TRP) (Sudgen, 1979) que é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e, pela ação da enzima triptofano hidroxilase (TH), cataliza a produção de serotonina (5-HT) (Deguchi, 1977). A conversão de serotonina para melatonina é realizada em dois passos: 1º) N-acetilada pela enzima N-acetiltransferase (NAT) para produzir N-acetilserotonina (NAS); 2º) O-metilada pela hidroxiindole-O-metiltransferase (HIOMT) para a formação do hormônio pineal (Voisin *et al.*, 1984).

Sua produção dentro da glândula é controlada por um ritmo circadiano (Arendt, 1988), por meio de uma informação neural que chega aos pinealócitos

via neurônios pós-ganglionares simpáticos (Pangerl *et al.*, 1990), na qual durante a fase escura do ciclo, alcança uma concentração plasmática dez vezes maior que os valores encontrados durante a fase clara (Lincoln *et al.*, 1985). As fibras retinohipotalâmicas são responsáveis pela sincronização da atividade do sistema nervoso central (SNC), para que o ciclo seja, precisamente, de 24 h (Reiter, 1991a). Sob luz contínua, nenhum ritmo de melatonina é observado, enquanto que sob condições de escuro total, como em animais ou humanos cegos, ritmos de NAT e melatonina correm livre com um período ligeiramente maior do que 24 h (Axelrod, 1974).

Os estímulos para o aumento noturno da síntese de melatonina é fornecido pela atividade elétrica originada no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (Klein e Moore, 1979; Reiter, 1985). Sua formação é primariamente um resultado da liberação de norepinefrinas (NE) de neurônios intrapineais que, durante o dia, é inibida pelo SNC e, contrariamente, durante a noite a mensagem inibitória é interrompida. Uma vez liberada, a NE interage com receptores  $\beta$ - e  $\alpha$ - adrenérgicos nas membranas dos pinealócitos (Pangerl *et al.*, 1990). Aproximadamente 85% da formação noturna é conseqüência da interação de NE com  $\beta$ -adrenoreceptores (Reiter, 1991b) que por meio da ativação da enzima ligada à membrana, adenilato ciclase (Weiss, 1969; Strada e Weiss, 1974), via uma proteína guanina nucleotídeo estimulatória (Gs) (Spiegel, 1989), conduz a um rápido aumento na concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Mikuni *et al.*, 1981), o qual é o segundo mensageiro intracelular, que regula o aumento da enzima NAT (Chik e Ho, 1989).

Uma vez sintetizada, a indolamina é rapidamente liberada no sangue, para circular juntamente com a albumina (Cardinali *et al.*, 1972). Sua lipossolubilidade permite uma rápida passagem para outros fluidos corporais (Costa *et al.*, 1995). A meia vida da melatonina é curta, variando de 10 a 40 minutos. Aproximadamente 75% do hormônio que passa pelas células hepáticas, é convertido para 6-hidroxitriptamina e, subseqüentemente, é

conjugado com qualquer sulfato (70%) (Kopin *et al.*, 1961). Todos os metabólitos são excretados na urina (Sizak *et al.*, 1979).

O desenvolvimento da glândula pineal em humanos começa a partir dos 3-4 meses e, depois, desenvolve-se rapidamente até um ano de idade (Gupta, 1988). Na idade avançada, o ritmo de produção da melatonina diminui (Reiter *et al.*, 1992). Iguchi *et al.* (1982) demonstraram um decréscimo nos níveis de melatonina no sangue de indivíduos com idade avançada, não havendo diferença entre homens e mulheres. Os mesmos resultados foram obtidos em um estudo em ratos Sprague-Dawley machos, realizado por Pang *et al.* (1984) que demonstrou uma correlação negativa nos níveis de melatonina e NAS na glândula pineal, e níveis de melatonina no sangue, com relação à idade. Esta atenuação do ciclo, com o avanço da idade, parece ser um processo gradual, associado com o declínio generalizado na capacidade funcional de muitos órgãos (Reiter *et al.*, 1990).

Os estudos realizados para investigar a relação entre a melatonina e o sistema reprodutor, mostraram que o hormônio pineal possui uma grande influência em humanos. As observações feitas por Brezezinski *et al.* (1987) indicam que folículos pré-ovulatórios contêm quantias substanciais de melatonina, que podem afetar a esteroidogênese ovariana, por meio da síntese de esteróides nas células granulosas foliculares ou pela supressão da proliferação folicular. No entanto, uma deficiência na secreção do hormônio pode estar relacionada à patologia neuroendócrina denominada de amenorréia hipotalâmica (Brezezinski *et al.*, 1988). Verificou-se, também, que o sistema reprodutor é influenciado por mudanças sazonais (Testart *et al.*, 1982).

De acordo com Voordouw *et al.* (1992) a melatonina surge como uma nova alternativa para o controle da fertilidade em humanos, na forma de pílula contraceptiva, combinando melatonina com progestina noretisterona, o que poderia eliminar, portanto, os efeitos colaterais associados ao estrogênio.

A melatonina possui também uma atuação no sistema imune. Os resultados obtidos em estudos realizados em camundongos C57BL/6 fêmeas,

indicaram que o hormônio promove uma reconstituição do timo, provocado por uma lesão na área hipotalâmica anterior, por meio da proliferação de linfócitos (Lesnikov *et al.*, 1992).

Dados obtidos por Lieberman *et al.* (1984) e Dollins *et al.* (1994) em humanos, indicam que a melatonina altera o estado de ânimo de maneira similar à drogas com propriedades sedativas. Pode induzir sonolência, fadiga e também atuar como um potente agente hipnótico, quando administrada de forma exógena.

Os níveis de melatonina no sangue podem ser precisamente regulados pela intensidade de luz, ou seja, a supressão de altos níveis circulantes, em humanos, pode ser clinicamente vantajosa (Terman *et al.*, 1988). Portanto, o uso da técnica de fototerapia e a conseqüente redução do hormônio pode fornecer um tratamento benéfico para doenças depressivas (Cummings *et al.*, 1989).

A melatonina pode também apresentar outras aplicações clínicas. De acordo com Chen *et al.* (1994), o hormônio pineal modula o estado funcional de canais de cálcio no coração, canais esses que podem ter implicações na fisiologia cardíaca normal. Portanto, a melatonina pode ser manipulada farmacologicamente e, assim, oferecer uma proteção aos ataques cardíacos.

O recente e amplo interesse em se investigar as funções deste hormônio se deve principalmente às suas propriedades antioxidativas. Investigações iniciais deduziram que a melatonina pode alterar o estado redutor das células. Foi observado que em animais pinealectomizados ocorre uma queda da atividade da bomba de  $Ca^{+2}$ , enquanto que nas membranas dos cardiomiócitos incubados com melatonina ocorreu um aumento da atividade ATPase (Chen *et al.*, 1993). A observação de que a queda da atividade da bomba de  $Ca^{+2}$  gera radicais livres, sugere que esta indolamina altera o estado das células pela neutralização tóxica de radicais livres e, portanto, conduz a um aumento passivo da atividade da bomba (Kaneko *et al.*, 1989). Estes achados foram confirmados por Morishima *et al.* (1998), que demonstraram os

efeitos protetores da melatonina em ratos Sprague-Dawley contra cardiomiopatias induzidas pela adriamicina devidas a peroxidação lipídica.

Diante destes resultados, foram realizados alguns estudos com o objetivo de verificar a capacidade da melatonina em seqüestrar radicais livres, principalmente com relação à sua interação com o radical mais tóxico, hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ). Os resultados mostraram que a melatonina é significativamente mais eficiente do que a glutathione (GSH) ou manitol, que são considerados importantes agentes antioxidantes (Reiter *et al.*, 1995). Em outros estudos, concluíram que a melatonina é duas vezes mais eficiente do que a vitamina E, em seqüestrar o radical peroxil ( $\text{ROO}\bullet$ ), que é um radical resultante da peroxidação lipídica (Packer, 1994).

Existem, também, várias enzimas importantes no sistema de defesa antioxidativo que são influenciadas pela melatonina. Ou seja, ao lado de sua capacidade direta como seqüestrador de radicais livres, a melatonina estimula a mais importante enzima antioxidativa no cérebro, que é a glutathione peroxidase (GSH-Px), fornecendo um ataque indireto contra os radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1989). A melatonina controla também a quantidade de óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), por meio da inibição da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Pozo *et al.*, 1994).

Outras enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidativo são as enzimas citocromo P-450 (Kothari e Subramanian, 1992a, 1992b) que, freqüentemente, se encontram envolvidas no metabolismo de xenobióticos, que resultam na produção de radicais livres (Gram *et al.*, 1986; Conn *et al.*, 1992).

Por apresentar este potencial antioxidativo, a melatonina vem sendo também testada em pacientes com tumores para verificar sua capacidade antiproliferativa. Os resultados obtidos por Marabini *et al.* (1992) mostraram, em pacientes, que altas concentrações de melatonina reduzem a proliferação de células do grupo controle, assim como de culturas de células leucêmicas, enquanto que baixas concentrações não apresentaram tais efeitos. A

melatonina administrada sozinha ou em conjunto com outros agentes antineoplásicos, ou imunoterápicos, parece desempenhar um importante papel na regulação de reações biológicas contra o câncer (Lissoni *et al.*, 1987; 1990). De acordo com Morishima *et al.* (1998) a melatonina pode ser utilizada, também, combinada com a adriamicina em tratamentos de tumores, em ratos Sprague-Dawley machos, embora a melatonina, por si só, possa ser considerada um hormônio antitumoral, pois possui atividades antimitóticas e imunomodulatórias. Foi verificado, também, que a secreção de melatonina é anormalmente alta em pacientes afetados com câncer (Lissoni *et al.*, 1987; 1990).

Recentemente, vários estudos envolvendo bactérias (Musatov, 1998), ratos (Severynek *et al.*, 1996; Lai e Singh, 1997) e humanos (Vijayalaxmi *et al.*, 1995a; 1995b; 1996; 1998) demonstraram efeitos protetores da melatonina contra agentes genotóxicos.

### 1.3. Radiação gama

---

A radiação gama é um tipo de emissão de energia de onda curta que não utiliza substrato material. Considerada uma radiação "natural", ou seja, ocorre como sendo uma das propriedades de elementos existentes na natureza, é considerada a mais penetrante, quando comparada com as radiações alfa e beta.

Os raios gama são classificados como ionizantes, pois provocam ionizações, isto é, ao atravessar uma matéria, têm o efeito de arrancar elétrons da camada periférica do átomo (Freire-Maia, 1972).

As radiações ionizantes induzem a produção de radicais livres, os quais são responsáveis por múltiplos tipos de lesões na molécula de DNA (Goodhead, 1994).

A transformação de átomos em íons provoca repercursões de ordem química que, por sua vez, acarretam efeitos biológicos que originam mutações gênicas e cromossômicas, tais como quebras cromossômicas e cromatídicas, as quais podem levar ao aparecimento de rearranjos do tipo inversões paracêntricas ou pericêntricas, transposições, anéis, duplicações e translocações simples ou recíproca; além de também causar efeitos “fisiológicos” nos cromossomos, como alterações na viscosidade, que são capazes de ocasionar aglutinações cromatídicas que, durante a anáfase, conduzem às chamadas pseudo-pontes que dificultam o movimento dos cromossomos em direção aos pólos, ocasionando, assim, a ocorrência de quebras. Portanto, estes efeitos biológicos causados pelos raios gama, criam condições para o aumento da taxa natural de mutabilidade dos seres vivos (Freire-Maia, 1972).

O tratamento de células com raios ionizantes altera a expressão dos genes, seja por meio do DNA danificado ou por mudanças na membrana celular, embora, o mecanismo pelo qual a radiação ionizante compromete o material genético permaneça ainda em especulação. Mas, como mencionado anteriormente, o câncer e outras doenças genéticas estão fortemente relacionados à instabilidade genômica da célula (Murnane, 1996).

## 2. OBJETIVOS

Larvas de *Drosophila melanogaster* de  $70 \pm 4$  h (início do 3º estágio) provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) foram pré-tratadas ou não por 02 h com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml de água destilada estéril). Larvas de  $72 \pm 4$  h pré-tratadas ou não com melatonina foram irradiadas com 10 Gy de raios- $\gamma$ . Utilizando o teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) este trabalho teve como objetivos:

- verificar se a melatonina possui efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos.
  
- verificar se a melatonina possui efeitos antimutagênicos e/ou anti-recombinogênicos quando associada aos raios- $\gamma$ .

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Agente químico

---

##### Melatonina

Melatonina (mel), N-acetil-5-metoxitriptamina, fabricada pelo Laboratório Horizon Natural Products (P.O. Box 1806, Santa Cruz, CA 95061, USA), conhecida comercialmente como Melatonin (orange flavored sublingual), dissolvida em água destilada estéril imediatamente antes do uso e ao abrigo da luz (Figura 5).

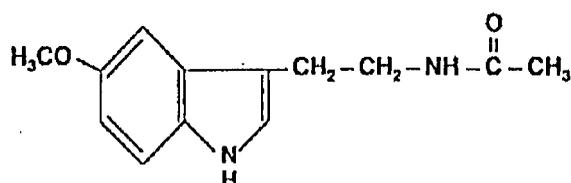


Figura 5. Fórmula estrutural da melatonina

#### 3.2. Agente físico

---

##### Raios gama

Larvas de  $72 \pm 4$  h provenientes dos cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação metabólica foram irradiadas com 10 Gy de raios- $\gamma$

(2,55 Gy / min.) emitidos por uma bomba de cobalto 60 (Theratron Phenix, Canadá),  $\epsilon$ . máx. = 1,25 MeV.

A irradiação foi realizada no Setor de Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão técnica do Prof. Dr. Antônio Ariza Gonçalves Júnior.

### 3.3. Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART)

---

#### 3.3.1. Linhagens estoque

As linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* foram fornecidas pelo Dr. Ulrich Graf do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurique, Schwerzenbach, Suíça.

Os estoques de *D. melanogaster* foram mantidos à temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e à umidade relativa do ar de 67%, em frascos de  $\frac{1}{4}$  de litro contendo meio de cultura [820 ml de água, 11 g de ágar, 156 g de banana, 25 g de fermento fresco (*Sacharomyces cerevisiae*) e 1 g de nipagin], suplementados com fermento biológico fresco (*Sacharomyces cerevisiae*).

#### 3.3.2. Cruzamentos

- Cruzamento padrão (Standard cross - ST): fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

- Cruzamento de alta capacidade de bioativação (High bioactivation cross - HB): fêmeas virgens *ORR; flr<sup>3</sup>/ln(3LR)TM3, ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>* foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf e van Schaick, 1992).

### 3.3.3. Procedimentos

A ovoposição foi realizada 48 horas após o início dos cruzamentos, por um período total de 8 horas, utilizando frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura próprio para a ovoposição. O meio contém uma base de ágar (10 g de ágar / 250 ml de água), sobre a qual é colocado meio de fermento [250 g de fermento biológico fresco (*Sacharomyces cerevisiae*) e, aproximadamente, duas colheres de chá de açúcar].

### 3.3.4. Tratamentos

Larvas de  $70 \pm 4$ h, provenientes de ambos cruzamentos, foram coletadas por flotação em água corrente. Parte das larvas foi colocada em diferentes placas de Petri e pré-tratadas por 02 h (tratamento agudo) com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg de melatonina / ml de água destilada estéril), acrescido 0,5 mg de celulose em pó. As larvas restantes, não pré-tratadas com melatonina, foram transferidas para placas de Petri contendo 5 ml de água destilada estéril mais 0,5 mg de celulose em pó. Em seguida, parte das larvas pré-tratadas com melatonina e das larvas não pré-tratadas, foram irradiadas com 10 Gy de raios- $\gamma$ , de acordo com o protocolo apresentado na figura 6. Posteriormente, as larvas foram transferidas para frascos de 100 ml contendo 1,0 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Knorr ®) / 5 ml água destilada).

Os adultos emergentes foram coletados e preservados em etanol 70%.

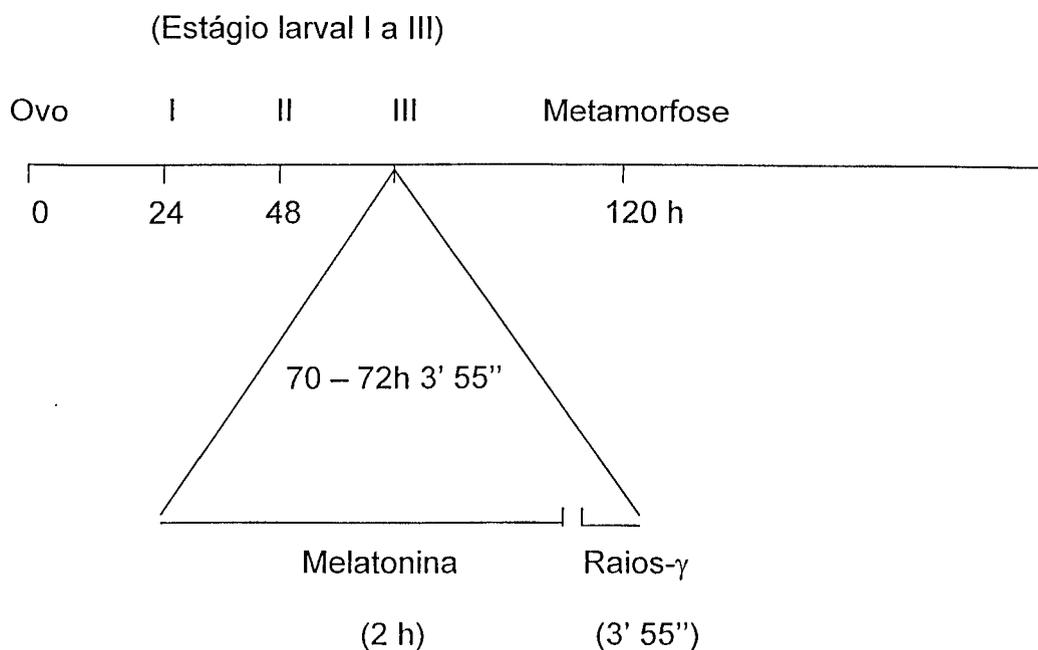


Figura 6. Protocolo de tratamento combinado de larvas de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml de água) por 2 h, seguido de tratamento com 10 Gy de raios gama por 3' 55" (2,55 Gy / min.)

### 3.3.5. Montagem de lâminas

As moscas foram transferidas do etanol 70% para recipientes contendo água destilada. As asas foram destacadas do corpo da mosca e estendidas, aos pares, em lâminas codificadas. Para fixar as asas, foi utilizado a solução de Faure (30g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato de cloral e 50 ml de água). Deixou-se secar por 24 horas em placa aquecida (40° C). As lâminas foram montadas com lamínulas e solução de Faure. Para que as asas ficassem com a superfície bastante plana, foram colocados, sobre a laminula, pesos de metal de aproximadamente 400 g e deixadas secar por mais 48 horas em placa aquecida (40° C).

### 3.3.6. Análise das asas

A análise das asas mutantes foi realizada em microscópio óptico de luz com aumento de 400X.

### 3.3.7. Análise estatística

Para a realização da análise estatística empregou-se o programa de computador SMART – Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Zordan, não publicado).

Para avaliar os efeitos genotóxicos da melatonina utilizou-se o teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) para proporções. Foi empregado o processo de múltipla decisão, que se baseia em duas hipóteses (Frei e Würigler, 1988):

(i) a freqüência de mutação (induzida mais espontânea) na série tratada não é maior do que a freqüência de mutação no controle apropriado;

(ii) a freqüência de mutação induzida na série tratada não é menor do que m vezes a maior freqüência de mutação espontânea observada no controle.

Este processo foi utilizado para decidir se o resultado foi:

- (i) positivo: rejeita-se a primeira hipótese e aceita-se a segunda;
- (ii) fraco positivo: rejeita-se ambas hipóteses;
- (iii) inconclusivo: aceita-se ambas hipóteses;

(iv) negativo: aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda.

Devido à alta frequência espontânea de manchas simples pequenas e do total de manchas, o valor de  $m$  foi fixado em 2 (testando-se o dobro da frequência espontânea para definir um resultado negativo), enquanto que, para manchas simples grandes e manchas gêmeas, que apresentam uma baixa frequência espontânea, o valor de  $m$  foi, então, fixado em 5.

Para ambas hipóteses testadas utilizou-se um nível de significância de 5%.

Para a avaliação dos efeitos antigenotóxicos da melatonina, as frequências de manchas totais por asa foram comparadas aos pares (i.e. controle versus melatonina; raios gama versus raios gama associado à melatonina) utilizando o Teste-U, não paramétrico, de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cruzamento padrão (ST)

---

#### 4.1.1. Descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH)

As freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH provenientes do cruzamento ST, pré-tratados ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados ou não com raios- $\gamma$  (10 Gy), são mostradas nas Tabelas 1 e 2.

A melatonina não induziu aumento estatisticamente significativo nas freqüências totais de manchas por asa quando comparado com o controle negativo (Figura 7).

Os raios- $\gamma$  induziram aumento estatisticamente significativo na freqüência total de manchas por asa, quando comparado com o controle negativo.

Larvas pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$  apresentaram um resultado fraco positivo na redução das freqüências totais de manchas por mosca, quando comparado com o controle positivo (raios- $\gamma$ ). A Figura 8 mostra as freqüências totais de manchas mutantes por asa.

Larvas pré-tratadas com 1,0 e 5,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram uma redução estatisticamente significativa nas freqüências de manchas simples pequenas por mosca, quando comparada com o controle positivo, enquanto que as pré-tratadas com 2,5 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram uma redução fraco positiva.

Larvas pré-tratadas com 1,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$  não apresentaram redução estatisticamente significativa nas freqüências de

manchas simples grandes por mosca, quando comparada com o controle positivo, enquanto que as pré-tratadas com 2,5 e 5,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram uma redução fraco positiva.

A Figura 9 mostra a distribuição do tamanho de manchas simples por asa.

Larvas pré-tratadas com as três diferentes concentrações de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram um resultado fraco positivo na redução das freqüências de manchas gêmeas por mosca quando comparado com o controle positivo. A Figura 10 apresenta a distribuição do tamanho de manchas gêmeas por asa.

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) ( $mwh/flr^3$ ) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados (2 h) ou não com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy).

Tratamento (concentração)	Número de asas	Manchas por asa (n° de manchas) Diag. Estatíst. *			
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	Total m=2
Água	118	0,119 (14)	0,034 (04)	0,000 (00)	0,153 (18)
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	96	1,084 (103) +	2,6 (247) +	2,242 (213) +	5,926 (563) +
Mel (mg)					
1,0	120	0,117 (14) nc	0,025 (03) nc	0,017 (02) i	0,158 (19) -
2,5	120	0,100 (12) nc	0,042 (05) -	0,000 (00) nc	0,142 (17) nc
5,0	120	0,133 (16) i	0,000 (00) nc	0,008 (01) i	0,142 (17) nc

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; nc, não calculado; m, fator de multiplicação. Teste do  $X^2$  para proporções, bicaudal. Níveis de significância:  $\alpha=\beta=0,05$

Tabela 2. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) (*mwh/flr<sup>3</sup>*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), pré-tratados (2 h) ou não com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy).

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (n° de manchas) Diag. Estatíst. *			
		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes simples (> 2 células)	Gêmeas	Total
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	48	2,146 (103)	5,146 (247)	4,438 (213)	11,729 (563)
Raios- $\gamma$ (Gy) + mel (mg)					
10 + 1,0	50	1,400 (70) +	4,600 (230) -	2,560 (128) f+	8,560 (428) f+
10 + 2,5	50	1,540 (77) f+	3,980 (199) f+	2,160 (108) f+	7,680 (384) f+
10 + 5,0	50	1,340 (67) +	3,260 (163) f+	2,080 (104) f+	6,680 (334) f+

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; nc, não calculado. Teste U, bicaudal. Níveis de significância:  $\alpha=\beta=0,05$ .

#### 4.1.2. Descendentes balanceadores heterozigotos (BH)

As freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes BH, provenientes do cruzamento ST, pré-tratados ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy), são mostradas na Tabela 3 e na Figura 8.

Larvas pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , não apresentaram diminuição nas freqüências totais de manchas mutantes por mosca quando comparada com o controle positivo.

Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes balanceadores heterozigotos (BH) (*mwh/ TM3 Bd<sup>S</sup>*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), pré-tratados (2 h) ou não com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy).

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (n° de manchas) Diag. Estatíst. *		
		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes simples (> 2 células)	Total
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	40	0,450 (18)	0,700 (28)	1,150 (46)
Raios- $\gamma$ (Gy) + mel (mg)				
10 + 1,0	40	0,350 (14) i	0,700 (28) nc	1,050 (42) -
10 + 2,5	40	0,750 (30) nc	0,525 (21) -	1,275 (51) nc
10 + 5,0	40	0,625 (25) nc	0,425 (17) -	1,050 (42) -

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; nc, não calculado. Teste U, bicaudal. Níveis de significância:  $\alpha=\beta=0,05$ .

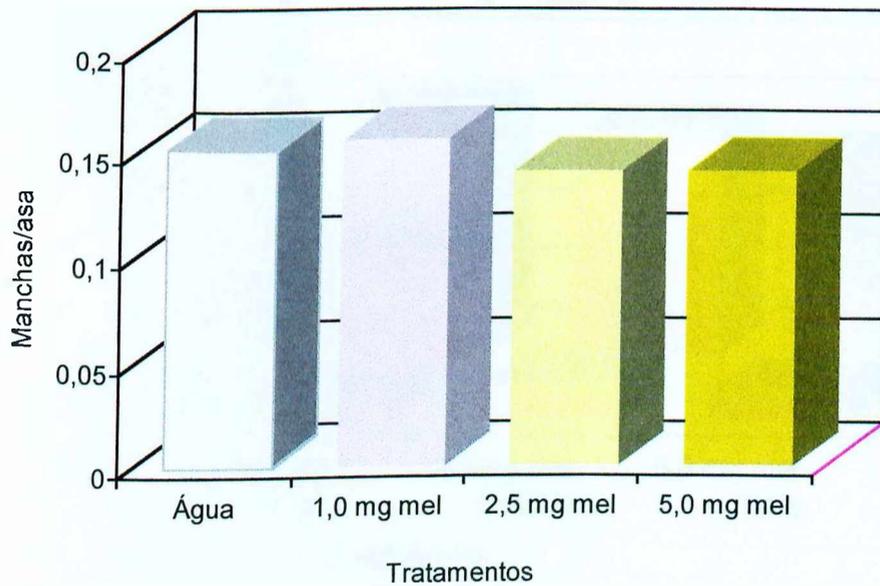


Figura 7. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados (2 h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml).

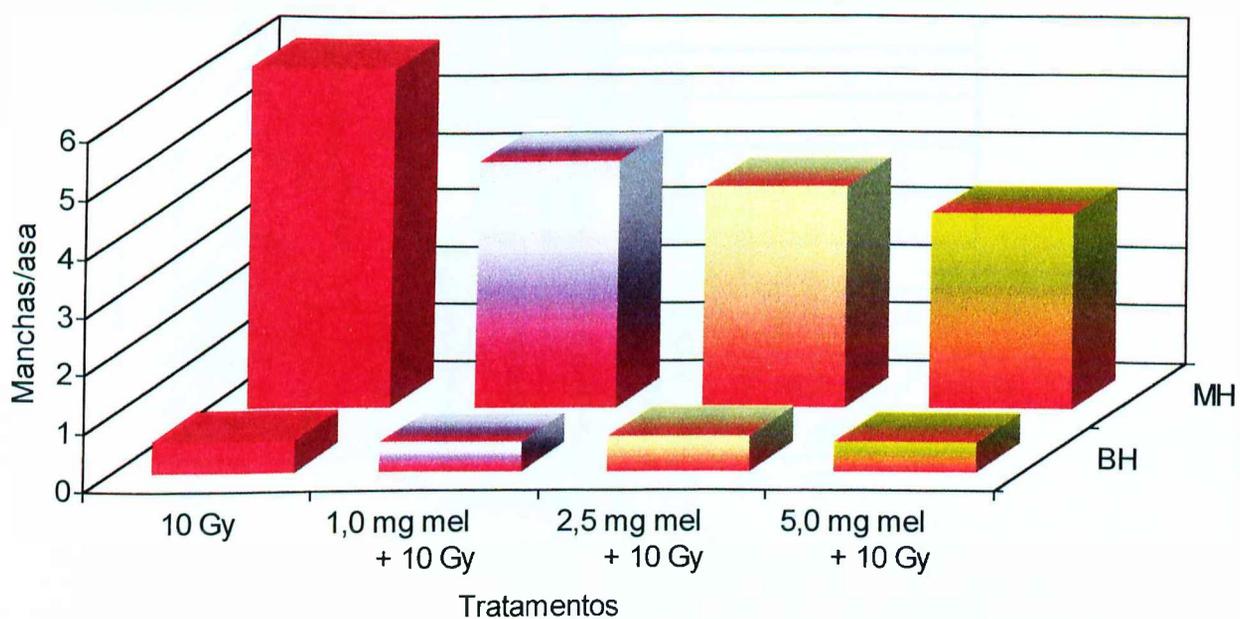


Figura 8. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e balanceadores heterozigotos (BH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) pré-tratados (2h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios gama (10 Gy).

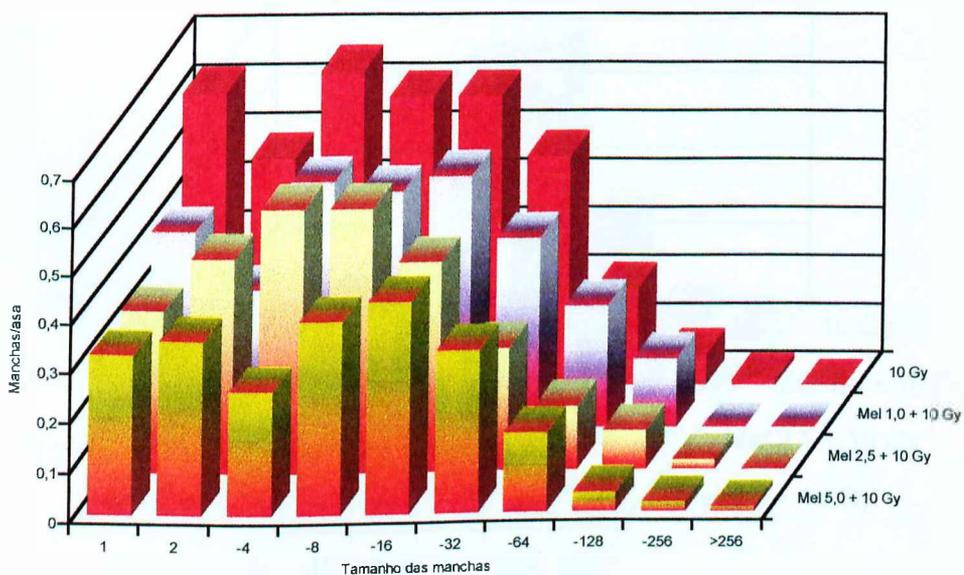


Figura 9. Distribuição do tamanho de manchas simples observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) pré-tratados (2h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios gama (10 Gy).

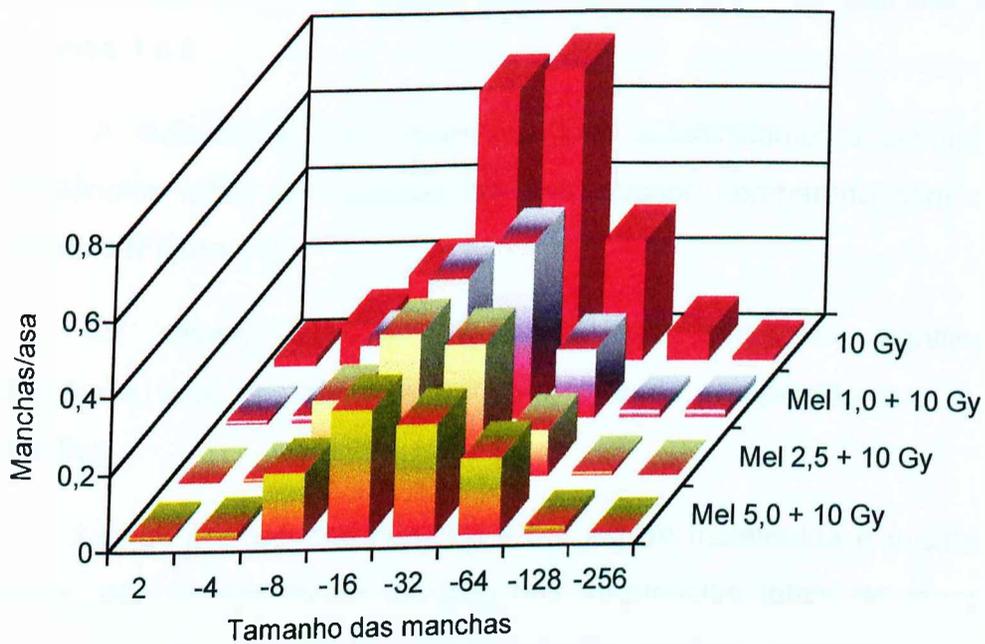


Figura 10. Distribuição do tamanho de manchas gêmeas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) pré-tratados (2h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios gama (10 Gy).

## 4.2. Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB)

---

### 4.2.1. Descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH)

As freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH, provenientes do cruzamento HB, pré-tratados ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados ou não com raios- $\gamma$  (10 Gy) são mostradas nas Tabelas 4 e 5.

A melatonina não induziu aumento estatisticamente significativo nas freqüências totais de manchas por asa, quando comparado com o controle negativo (Figura 11).

Os raios- $\gamma$  induziram aumento estatisticamente significativo na freqüência total de manchas por asa, quando comparado com o controle negativo.

Larvas pré-tratadas com 1,0 e 5,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , não apresentaram redução nas freqüências totais de manchas por mosca, quando comparada com o controle positivo, enquanto que as pré-tratadas com 2,5 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram redução fraco positiva. A Figura 12 mostra as freqüências totais de manchas por asa.

Larvas pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , não apresentaram redução estatisticamente significativa nas freqüências de manchas simples pequenas por mosca, quando comparada com o controle positivo.

Larvas pré-tratadas com 1,0 e 5,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , não apresentaram redução nas freqüências de manchas simples grandes por mosca, quando comparada com o controle positivo, enquanto que

as pré-tratadas com 2,5 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram uma redução fraco positiva.

A Figura 13 mostra a distribuição do tamanho de manchas simples por asa.

Larvas pré-tratadas com 2,5 e 5,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , apresentaram um resultado fraco positivo na redução das freqüências de manchas gêmeas por mosca, quando comparado com o controle positivo, enquanto que as pré-tratadas com 1,0 mg de melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , não apresentaram redução. A Figura 14 apresenta a distribuição do tamanho de manchas gêmeas por asa.

Tabela 4. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) ( $mwh/flr^3$ ) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), tratados (2 h) ou não com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy).

Tratamento (concentração)	Número de asas	Manchas por asa (n° de manchas) Diag. Estatíst. *			Total m=2
		Pequenas simples (1-2 células) m=2	Grandes simples (> 2 células) m=5	Gêmeas m=5	
Água	118	0,229 (27)	0,076 (09)	0,025 (03)	0,33 (39)
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	100	0,66 (66)	2,61 (261)	2,02 (202)	5,29 (529)
Mel (mg)					
1,0	120	0,158 (19) nc	0,042 (05) nc	0,025 (03) nc	0,225 (27) nc
2,5	120	0,192 (23) nc	0,075 (09) nc	0,033 (04) i	0,300 (36) nc
5,0	120	0,233 (28) -	0,100 (12) -	0,050 (06) i	0,383 (46) -

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; nc, não calculado; m, fator de multiplicação. Teste do  $X^2$  para proporções, bicaudal. Níveis de significância:  $\alpha=\beta=0,05$ .

Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) (*mwh/flr<sup>3</sup>*) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), pré-tratados (2 h) ou não com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy).

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (n° de manchas) Diag. Estatíst. *			
		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes simples (> 2 células)	Gêmeas	Total
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	50	1,320 (66)	5,220 (261)	4,040 (202)	10,580 (529)
Raios- $\gamma$ (Gy) + mel (mg)					
10 + 1,0	49	1,531 (75) nc	5,367 (263) nc	3,694 (181) -	10,592 (519) nc
10 + 2,5	50	1,560 (78) nc	3,900 (195) f+	2,640 (132) f+	8,120 (406) f+
10 + 5,0	50	1,580 (79) nc	4,940 (247) -	3,300 (165) f+	9,840 (492) -

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; nc, não calculado. Teste U, bicaudal. Níveis de significância:  $\alpha=\beta=0,05$ .

#### 4.2.2. Descendentes balanceadores heterozigotos (BH)

As freqüências de manchas observadas nos descendentes BH, provenientes do cruzamento HB, pré-tratados ou não com melatonina e irradiados com raios- $\gamma$ , são mostradas na Tabela 6 e na Figura 12.

Larvas pré-tratadas com melatonina e irradiadas com raios- $\gamma$ , não apresentaram diminuição nas freqüências totais de manchas por mosca quando comparada com o controle positivo.

A Figura 15 mostra as taxas de mutação e recombinação somáticas induzidas pelos raios gama.

Tabela 6. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes balanceadores heterozigotos (BH) (*mwh/TM3 Bd<sup>S</sup>*) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), pré-tratados (2 h) ou não com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios- $\gamma$  (10 Gy).

Tratamento (concentração)	Número de moscas	Manchas por mosca (n° de manchas) Diag. Estatíst. *		
		Pequenas simples (1-2 células)	Grandes simples (> 2 células)	Total
Raios- $\gamma$ (10 Gy)	40	0,500 (20)	0,700 (28)	1,200 (48)
Raios- $\gamma$ (Gy) + mel (mg)				
10 + 1,0	43	0,767 (33) nc	0,581 (25) -	1,349 (58) nc
10 + 2,5	40	0,575 (23) nc	0,425 (17) -	1,000 (40) -
10 + 5,0	40	0,875 (35) nc	0,975 (39) nc	1,850 (74) nc

\* Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1995): +, positivo; f+, fraco positivo; -, negativo; i, inconclusivo; nc, não calculado. Teste U, bicaudal. Níveis de significância:  $\alpha=\beta=0,05$ .

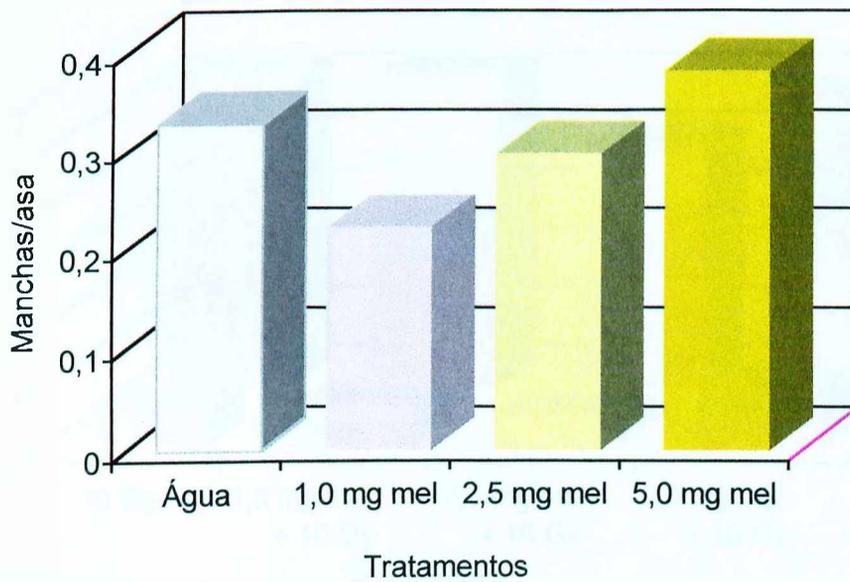


Figura 11. Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) tratados (2h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml).

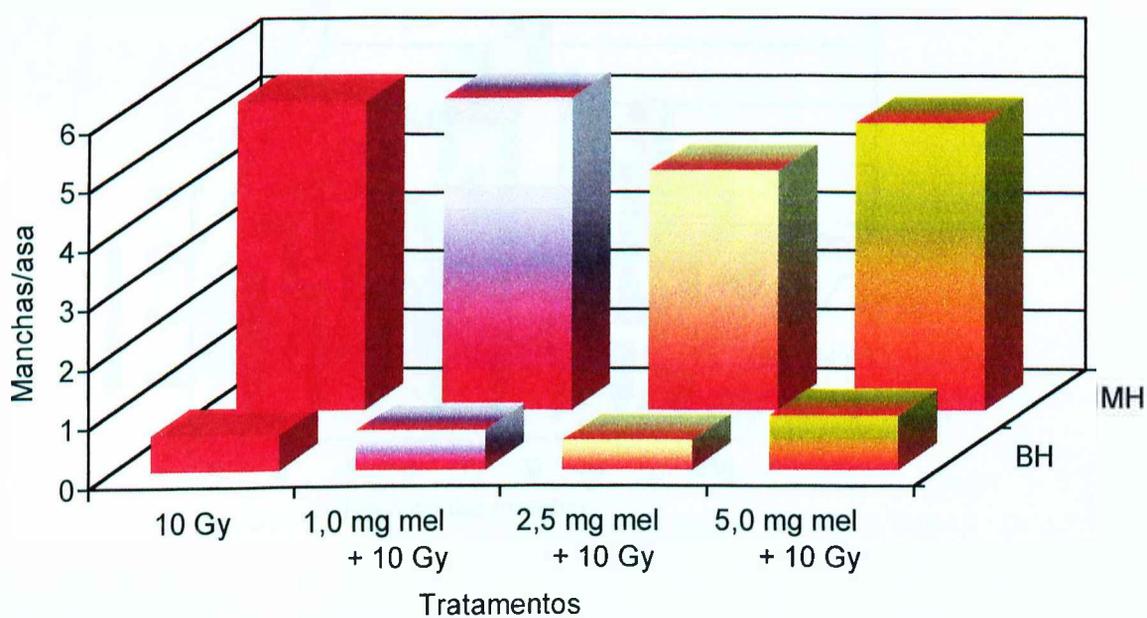


Figura 12. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e balanceadores heterozigotos (BH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) pré-tratados (2 h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios gama (10 Gy).

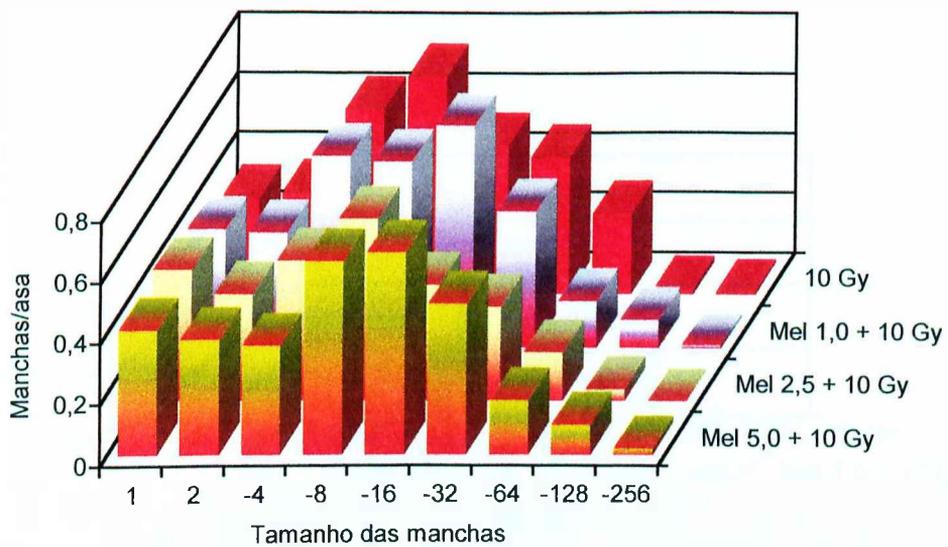


Figura 13. Distribuição do tamanho de manchas simples observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) pré-tratados (2 h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios gama (10 Gy).

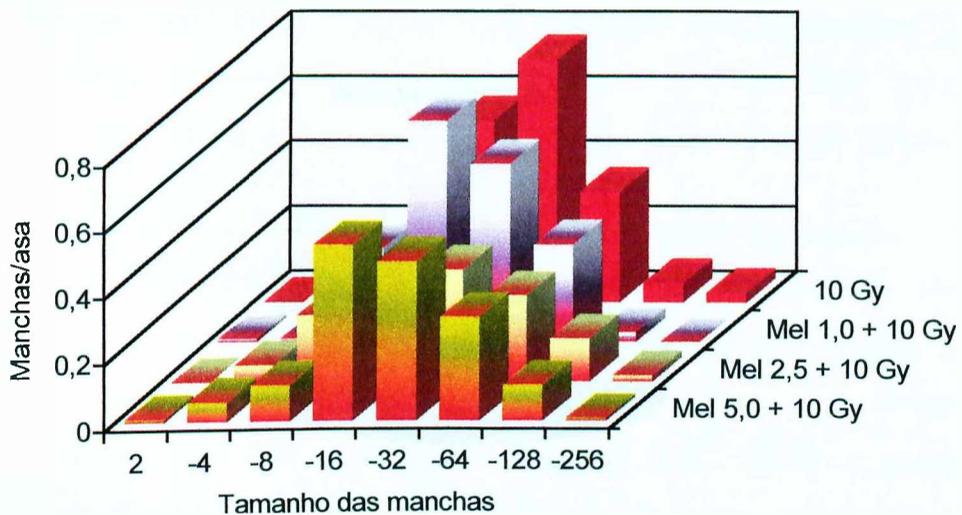


Figura 14. Distribuição do tamanho de manchas gêmeas observadas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) pré-tratados (2 h) ou não com melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg / ml) e irradiados com raios gama (10 Gy).

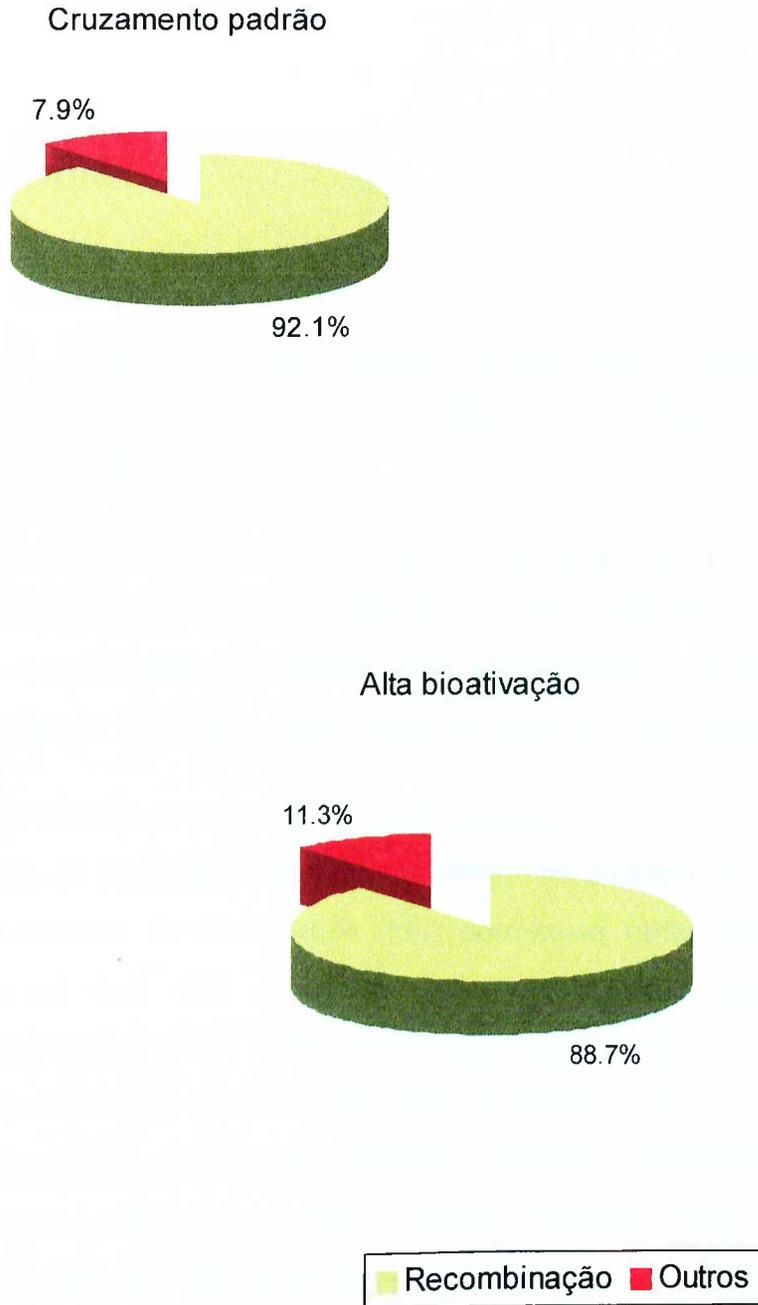


Figura 15. Taxas de mutação e recombinação somáticas induzidas pelos raios gama (10 Gy), em asas de *Drosophila melanogaster* dos descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação.

## 5. DISCUSSÃO

A melatonina vem sendo amplamente utilizada em estudos experimentais com o objetivo de investigar propriedades que possam oferecer algum benefício ao homem.

O teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) foi empregado para avaliar a capacidade genotóxica e/ou antigenotóxica da melatonina, quando associada aos raios gama, em células de asas de *Drosophila melanogaster*.

O SMART é um teste de curta duração que oferece muitas vantagens neste tipo de avaliação. Por meio de diferentes cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) permite-se obter respostas tanto para substâncias que não precisam ser metabolizadas para se mostrarem genotóxicas (Graf *et al.*, 1984), quanto para substâncias xenobióticas, as quais necessitam de altos níveis constitutivos de enzimas citocromo P-450 (Frölich e Würgler, 1989). Este teste permite também, detectar se os eventos genotóxicos provocados pelo agente indutor são mutagênicos ou recombinogênicos (Graf *et al.*, 1984).

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que a melatonina possui propriedades que amenizam os efeitos provocados pelos raios gama, apenas nos descendentes marcadores trans-heterozigotos, embora apresentando diferenças quanto aos cruzamentos e ao tamanho das manchas.

No cruzamento ST, a melatonina mostrou-se eficiente quanto aos efeitos protetores, reduzindo significativamente a frequência de manchas simples pequenas, enquanto que nas frequências totais, a capacidade protetora não se

mostrou tão eficiente, pois os resultados foram fraco positivos. Isto sugere que a melatonina foi mais potente no estágio tardio do desenvolvimento larval, pois a presença de manchas pequenas se deve a eventos genotóxicos ocorridos na fase tardia do desenvolvimento e, contrariamente, manchas grandes se devem a eventos genotóxicos ocorridos na fase inicial do desenvolvimento larval.

No cruzamento HB, não foi verificado efeito protetor na menor dose testada (1,0 mg). Nas doses maiores (2,5 e 5,0 mg) a melatonina teve um efeito protetor, mas não foi tão eficaz quanto no cruzamento ST, pois apresentou resultados fraco positivos na redução das freqüências de manchas simples grandes e manchas gêmeas, sugerindo que a melatonina, contrariamente aos resultados do cruzamento ST, atuou mais na fase inicial do desenvolvimento larval.

Diante desses resultados é possível especular que as diferenças na atuação desse hormônio se devem ao nível constitutivo de enzimas citocromo P-450 de cada linhagem.

As enzimas citocromo P-450 estão freqüentemente envolvidas no metabolismo de agentes xenobióticos, com a conseqüente produção de radicais livres (Gram *et al.*, 1986; Coon *et al.*, 1992).

Kothari e Subramanian (1992a; 1992b) em estudos realizados em ratos, verificaram que a melatonina atua inibindo a atividade das enzimas citocromo P-450. Esses dados foram também observados por Sewerynek e Reiter (dados não publicados) que encontraram uma redução de 30% da atividades dessas enzimas (Reiter *et al.*, 1995).

Tan *et al.* (1994) trabalhando com ratos Sprague-Dawley sugeriram que a melatonina atua, provavelmente, por meio da inibição da enzima citocromo P-450. Musatov *et al.* (1998), em estudos realizados com Hamster chinês (teste cometa) e com bactérias (teste de Ames), sugerem que a melatonina pode interagir com a ativação do processo metabólico, talvez por meio da inibição das enzimas citocromo P-450.

Pelo fato do agente indutor de mutações, utilizado neste experimento, ser um agente físico (radiação gama), não houve diferenças significativas quanto as freqüências de manchas mutantes nos dois cruzamentos (ST e HB), pois os raios gama não dependem de ativação metabólica para exercerem seus efeitos genotóxicos. Assim sendo, em relação ao controle positivo, a presença de altos níveis de enzimas citocromo P-450 não teve influência nas freqüências de manchas mutantes.

Entretanto, as diferenças encontradas nos cruzamentos (ST e HB), quanto ao estágio de atuação da melatonina, nos permite especular que a melatonina interagiu com as enzimas metabolizantes citocromo P-450 pois, no cruzamento padrão, o qual é caracterizado por um baixo nível constitutivo destas enzimas, a melatonina foi mais eficiente atuando tardiamente no desenvolvimento larval. No entanto, no cruzamento HB, o qual apresenta altos níveis constitutivos de enzimas citocromo P-450, o efeito protetor da melatonina se manifestou, de forma menos eficaz, apenas na fase inicial. Contudo, é possível sugerir que a melatonina, no cruzamento de alta capacidade de bioativação, foi rapidamente metabolizada, conferindo assim um curto tempo de atuação.

Os valores encontrados na análise dos descendentes BH, em ambos cruzamentos, mostraram que a radiação gama não foi capaz de induzir altas freqüências de manchas mutantes, como as induzidas nos descendentes MH, pois os descendentes BH apresentam uma constituição genotípica que impede a ocorrência de eventos recombinogênicos. Isto permite concluir que os efeitos provocados pela radiação gama se devem, principalmente, aos eventos recombinogênicos, concordando assim com a literatura (Guzmán-Rincón *et al.*, 1994). Não foi verificado também nos descendentes BH, em ambos cruzamentos, a proteção da melatonina contra os eventos mutacionais, permitindo concluir que os efeitos rádioprotetores exercidos pela melatonina se devem a efeitos anti-recombinogênicos. Estes efeitos podem ser confirmados pela redução nas freqüências de manchas simples e gêmeas observada nos descendentes MH do cruzamento ST.

O mecanismo pelo qual a melatonina apresenta efeitos protetores contra os raios gama permanece ainda em especulação. Recentes estudos relatam que estes efeitos são devidos à propriedades anti-oxidativas que se manifestam pela ação *direta*, seqüestrando radicais livres, e *indireta*, estimulando enzimas antioxidativas (Vijaylaximi *et al.*, 1995; Vijaylaximi *et al.*, 1996).

As ações da melatonina nos processos metabólicos eram consideradas inconsistentes, pois os receptores de membranas eram distribuídos limitadamente nas células (Reiter, 1991c). Devido ao fato da melatonina estar presente em organismos unicelulares (Poeggeler *et al.*, 1991), entende-se que, em qualquer organismo multicelular, a melatonina não necessita interagir com receptores (Reiter, 1995) e também a alta solubilidade lipídica permite um rápido acesso no interior de todas as células, facilitando a interação com a molécula de DNA (Costa *et al.*, 1995).

Os danos provocados pela radiação ionizante se devem a mecanismos classificados como: *direto*, que produz quebra das ligações químicas na estrutura molecular do DNA; e *indireto*, que resulta em radicais livres altamente reativos hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e hidrogênio ( $\bullet\text{H}$ ). Estudos têm demonstrado que uma significativa proporção dos efeitos biológicos provocados por radiação são atribuídos a ação indireta, e que os radicais  $\bullet\text{OH}$  são primariamente responsáveis por estes efeitos da radiação (Littlefield *et al.*, 1988).

O processo de inativação do radical  $\bullet\text{OH}$  pela melatonina se dá pela doação eletrônica que resulta na produção do radical cátion indolil, não tóxico às macromoléculas, que posteriormente pode seqüestrar cataliticamente a molécula de  $\bullet\text{O}_2^-$ , um precursor do radical  $\bullet\text{OH}$ , gerando assim o metabólito não enzimático N<sub>1</sub>-acetil-N<sub>2</sub>-formil-5-metoxiquinuramina (Reiter *et al.*, 1997). Outro mecanismo utilizado pela melatonina na redução da formação do radical hidroxil é a indução da enzima glutathione peroxidase, responsável pela metabolização de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , precursor do radical  $\bullet\text{OH}$  (Janiaud, 1987).

Os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com dados relatados na literatura especializada sobre os efeitos protetores da melatonina.

Os dados obtidos por Badra *et al.* (1999) em seu estudo realizado em camundongos machos adultos albino, verificando a incidência de micronúcleos e aberrações cromossômicas, revelaram que a melatonina oferece proteção contra raios ionizantes apenas quando administrada antes da irradiação, confirmando assim, o seu efeito rádioprotetor por meio da capacidade de seqüestrar radicais livres gerados pela radiação ionizante.

Por meio da análise de linfócitos humanos, foi verificado uma redução na incidência de micronúcleos (Vijayalaxmi *et al.*, 1995b), de aberrações cromossômicas (Vijayalaxmi *et al.*, 1995a), e de quebras de cadeia simples de DNA (Vijayalaxmi *et al.*, 1998) induzidos por radiações gama em amostras de sangue periférico pré-tratado com melatonina. O mesmo efeito rádioprotetor foi também verificado por meio da análise de aberrações cromossômicas e micronúcleos em indivíduos tratados *in vivo* com melatonina e que, posteriormente, tiveram suas células sangüíneas irradiadas com raios gama *in vitro* (Vijayalaxmi *et al.*, 1996). A melatonina, em altas doses, apresentou um efeito protetor por meio do aumento da sobrevivência de camundongos expostos à radiação gama (Vijayalaxmi *et al.*, 1999).

De acordo com Severynek *et al.* (1996) a melatonina reduz a freqüência de micronúcleos, em células da medula óssea e células do sangue periférico de ratos Sprague-Dawley machos, induzidos por um lipopolissacarídeo (LPS), que é um importante gerador de radicais livres.

Lai e Singh (1997) em estudos realizados em ratos Sprague-Dawley machos, observaram que a melatonina impediu a incidência de quebras de fitas duplas de DNA nas células de cérebros, provocadas pela radiofreqüência eletromagnética.

Musatov *et al.* (1998) com o objetivo de estudar o modo de ação da melatonina, desenvolveram testes comparativos para avaliar o potencial

antigenotóxico da melatonina, em bactérias (*Salmonella typhimurium*) e mamíferos (Hamster chinês), por meio dos testes de Ames e Cometa, respectivamente. O teste de Ames permite avaliar a ação antioxidativa direta, pelo fato de que bactérias não apresentam receptores específicos, enquanto que o teste cometa permite investigar os dois modos de ação da melatonina (direta e indireta) pela ativação de enzimas antioxidativas. Os resultados revelaram que a melatonina protege as células danificadas tanto por mutágenos oxidativos quanto por agentes alquilantes.

Ortiz *et al.* (2000) avaliando a incidência de micronúcleos em células da medula óssea e do sangue periférico verificaram o efeito protetor da melatonina contra os efeitos provocados pelo agente genotóxico paraquat.

Vale ressaltar a necessidade de se investigar uma possível interação do hormônio com as enzimas citocromo P-450, quando não se utiliza agentes químicos como indutores de efeitos genotóxicos.

A grande questão que envolve esse hormônio é saber se a quantidade fisiológica produzida oferece proteção à molécula de DNA contra os eventuais agentes genotóxicos, ou se a melatonina é relevante apenas farmacologicamente. Considerando o grande número de radicais livres produzidos no organismo, e o fato da melatonina ser irreversivelmente oxidada, parece ser insuficiente o número de moléculas de melatonina produzidas endogenamente, para que esta possa seqüestrar estes radicais, de forma significativa (Reiter *et al.*, 1995).

No entanto os resultados encontrados por Tan *et al.* (1994) demonstram que a glândula pineal intacta e funcional oferece condições para proteger a molécula de DNA contra agentes carcinogênicos, tais como o safrole.

De qualquer modo, a quantidade endógena produzida fornece uma defesa significativa contra o dano oxidativo, e mesmo que seja apenas farmacologicamente, considerando a falta de toxicidade, o seu uso seria aparentemente quase ilimitado (Reiter *et al.*, 1995).

O presente estudo permitiu também observar a eficácia do teste para detecção de mutações e recombinações somáticas, pois as frequências de manchas mutantes obtidas nos controles (negativo e positivo) corresponderam às frequências esperadas. Em relação aos raios gama, não houve diferenças significativas nas frequências de manchas mutantes observadas entre os diferentes cruzamentos, em ambos descendentes. Quanto aos descendentes BH, as frequências de manchas mutantes foram relativamente baixas, de acordo com o esperado, pelo fato que estes descendentes apresentam apenas eventos mutacionais.

Diante dos resultados obtidos neste experimento, assim como dados encontrados na literatura especializada, podemos concluir que a melatonina exerce efeitos protetores quanto aos danos oxidativos induzidos pelos raios gama, e que o SMART é um importante instrumento para a detecção de efeitos genotóxicos de agentes físicos e químicos, bem como na revelação de efeitos protetores de substâncias produzidas endógenamente pelo organismo, ou que possam estar presentes em medicamentos, dietas, plantas, etc.

## 6. CONCLUSÕES

Com o objetivo de avaliar os potenciais genotóxico e/ou antigenotóxico da melatonina quando associada aos raios gama, foi empregado o teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Em vista dos resultados obtidos podemos concluir que:

- a melatonina não possui efeitos genotóxicos;
- os raios gama possuem efeitos genotóxicos devidos, principalmente, à recombinação somática;
- não houve diferença quanto a atividade genotóxica dos raios gama entre os cruzamentos efetuados (ST e HB).
- a melatonina apresenta efeitos anti-recombinogênicos, quando associada aos raios gama, nos descendentes marcadores trans-heterozigotos;
- a melatonina não exerceu proteção contra os efeitos mutagênicos provocados pelos raios gama;
- os efeitos radioprotetores, exercidos pela melatonina nos descendentes marcadores trans-heterozigotos, se manifestaram de forma distinta, entre os cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação, sugerindo uma possível interação da melatonina com as enzimas citocromo P-450.

## 7. RESUMO

Diante da necessidade de revelar substâncias que possam exercer algum tipo de efeito protetor contra a exposição a agentes que causam danos à saúde do homem, utilizou-se o teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, para avaliar os potenciais genotóxico e/ou antigenotóxico da melatonina quando associada aos raios gama.

Para tanto, foram realizados dois cruzamentos: padrão (Standard cross - ST) e de alta capacidade de bioativação (High bioactivation cross - HB) que, pelo fato de apresentar um alto nível constitutivo de enzimas citocromo P-450, permite detectar substâncias xenobióticas. De ambos cruzamentos foram obtidos descendentes marcadores trans-heterozigotos (MH) e balanceadores heterozigotos (BH), que na fase larval (3º estágio), foram submetidas ou não ao pré-tratamento com diferentes concentrações de melatonina (1,0; 2,5 e 5,0 mg) e, posteriormente, foram irradiadas ou não com raios gama (10 Gy).

O SMART de asa permite identificar, fenotipicamente, pêlos mutantes nas asas das moscas e, também, quantificar as taxas de mutação e recombinação induzidas pelo agente genotóxico.

Os dados obtidos demonstraram que a melatonina não possui efeitos genotóxicos, mas que exerce uma proteção dose dependente contra os efeitos causados pelos raios gama, nos descendentes MH do cruzamento ST. As análises dos descendentes BH revelaram que os efeitos causados pela radiação gama são devidos, principalmente, à recombinação, e que a radioproteção da melatonina se deve apenas aos seus efeitos anti-recombinogênicos. Foram encontradas diferenças entre os resultados dos cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação, o que permite

sugerir uma possível interação entre a melatonina e as enzimas citocromo P-450.

Considerando estes resultados, é possível afirmar que, dentro das condições laboratoriais trabalhadas, a melatonina apresentou efeitos que possam amenizar os danos causados pela radiação gama, condizendo assim com os relatos da literatura.

## 8. ABSTRACT

In view of the need to identify substances that can exert protective effects against agents that damage men's health, this work evaluated the genotoxic and antigenotoxic potential of melatonin, using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*.

Standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were performed. The HB cross present a high level of cytochrome P-450 enzymes. From both crosses marker-trans-heterozygous and balancer-heterozygous flies were obtained. Larvae of the third instar were submitted or not to pretreatment with different concentrations of melatonin (1.0; 2.5 and 5.0 mg / ml) and subsequently were irradiated or not with gamma rays (10 Gy).

The test permitted the identification of mutant hairs on the wings of the fruit fly, and also quantification of the mutation and recombination rate induced by the genotoxic agent.

Our experimental results demonstrated that melatonin does not have genotoxic effects, and that it exerts protection against the effects caused by gamma rays in marker-trans-heterozygous descendents of ST cross. Analysis of the balancer-heterozygous flies revealed that the effects caused by gamma radiation were due mainly to recombination, and the radioprotection of melatonin was due only to the anti-recombinagenic effects. Differences were found between the results of standard and high bioactivation crosses, which suggests a possible interaction between melatonin and cytochrome P-450 enzymes.

Considering these results it may be concluded that under appropriated laboratory conditions, melatonin may reduce gamma radiation damage.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. P., 1994. Cancer. In: *Molecular Biology of The Cell*. 3<sup>a</sup> ed. Ed. Garland Publishing, Inc. New York and London, pp. 1255-1291.
- ANTUNES, L. M. G. & TAKAHASHI, C. S., 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in wistar rat bone marrow cells. *Mutation Res.*, 419 (1-3): 137-143.
- ANTUNES, L. M. G., ARAÚJO, M. C. P., DARIN, J. D. C. & BIANCHI, M. L. P., 2000. Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on ciplastin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Res.*, 465 (1-2): 131-137.
- ARENDT, J., 1988. Melatonin. *Clinical Endocrinology*, 29: 205-229.
- AXELROD, J., 1974. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 184: 1341-1348.
- BADRA, F. M., EL HABITB, O. H. M. & HARRAZA, M. M., 1999. Radioprotective effect of melatonin assessed measuring chromosomal damage in mitotic and meiotic cells. *Mutation. Res.*, 444 (2): 367-372.

- BREZEZINSKI, A., SEIBEL, M. M., LYNCH, H. J., DENG, M. H. & WURTMAN, R. J., 1987. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64 (4): 865-867.
- BREZEZINSKI, A., LYNCH, H. J., SEIBEL, M. M., DENG, M. H., NADER, T. M. & WURTMAN, R. J., 1988. The circadian rhythm of plasma melatonin during the normal menstrual cycle and amenorrheic women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 66 (5): 891-895.
- CARDINALI, D. P., LYNCH, H. J. & WURTMAN, R. J., 1972. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*, 91: 1213.
- CHEN, L. D., TAN, D. X., REITER, R. J., YAGA, K., POEGGELER, B., KUMAR, P., MANCHESTER, L. C. & CHAMBERS, J. P., 1993. *In vivo* and *in vitro* effects of the pineal gland and melatonin on  $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$  dependent ATPase in circadian sarcolemma. *J. Pineal Res.*, 14: 178-183. In: REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.
- CHEN, L. D., KUMAR, P., REITER, R. J., TAN, D. X., CHAMBER, J. P., MANCHESTER, L. C. & POEGGELER, B., 1994. Melatonin reduces  $^3H$ -Nitrendipinebinding in the heart. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 207: 34-37.

- CHIK, C. L. & HO, A. K., 1989. Multiple regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 53: 197-203.
- COON, M. J., DING, X. & VAZ, A. D. N., 1992. Cytochrome P-450: Progress and predictions. *FASEB J.*, 6: 669-673.
- COSTA, E. J. X., LOPES, R. H. & LAMY-FREUND, M. T., 1995. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.*, 19: 123-126.
- CUMMINGS, M. A., BERGA, S. L., CUMMINGS, K. L., KRIPKE, D. F., HAVILAND, M. G., GOLSHAN, S. & GILLIN, J. C., 1989. Light suppression of melatonin in unipolar depressed patients. *Psychiat. Res.*, 27: 351. In: REITER, R. J., 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12 (2): 151-180.
- DAPKUS, D. & MERREL, D. J., 1977. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 87: 685-697.
- DEGUCHI, T., 1977. Tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat: postsynaptic localization and absence of a circadian rhythm. *J. Neurochem.*, 28: 667.
- DOLLINS, A. B., ZHDANOVA, I. V., WURTMAN, R. J., LYNCH, H. J. & DENG, M. H., 1994. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in

day time on sleep, mood, body temperature and performance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 1824-1828.

EDENHARDER, R., WORF-WANDELBURG, A., DECKER, M. & PLATT, K. L., 1999. Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. *Mutation Res.*, 444 (1): 235-248.

FREI, H. & WÜRGLER, F. E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.*, 203: 297-308.

FREI, H. & WÜRGLER, F. E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 341: 235-247.

FREIRE-MAIA, N., 1972. Estrutura da matéria e radiações. Noções de radiogenética geral. In: *Radiogenética humana*. Ed. USP. São Paulo, pp: 1-48.

FRÖLICH, A. & WÜRGLER, F. E., 1989. New tester strains improved bioactivation capacity for the *Drosophila melanogaster* wing spot test. *Mutation Res.*, 234: 71-80.

GOODHEAD, D. T., 1994. Initial events in the cellular effects of the ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Rad. Biol.*, 65 (1): 7-17.

- GRAF, U., WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J., FREI, H., JUON, H., HALL, C. B. & KALE, P. G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6: 153-188.
- GRAF, U. & SINGER, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 8: 15-27.
- GRAF, U. & van SCHAIK, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 271: 59-67.
- GRAF, U., ABRAHAM, S. K., GUZMÁN-RINCÓN, J. & WÜRGLER, F. E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 402: 203-209.
- GRAM, T. E., OKINE, L. K. & GRAM, R. A., 1986. The metabolism of xenobiotics by certain extrahepatic organs and its relation to toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 26: 259-276.
- GUPTA, D., 1988. Pathophysiology of pineal function in health and disease in children. *Pineal Res. Rev.*, 6: 261-300. In: REITER, R. J., 1992. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays*, 14 (3): 169-175.

- GUZMÁN-RINCÓN, J., GRAF, U., VARELA, A., POLICRONIADES, R. & DELFIN, A., 1994. Somatic Mutation and Recombination induced by fast neutrons in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 10. Suppl., 1: 29-30. In: GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U., 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation And Recombination Test as a Biomonitor. Biomonitor. Biomarkers as Indicators of Enviromental Change. Edited by F. M. Butterworth *et al.* Plenum Press, New York.
- GUZMÁN-RINCÓN, J. & GRAF, U., 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation And Recombination Test as a Biomonitor. Biomonitor. Biomarkers as Indicators of Enviromental Change. Edited by F. M. Butterworth *et al.* Plenum Press, New York.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C., 1989. Free Radical Biology and Medicine, 2<sup>nd</sup> ed., Clarendon Press, Oxford. In: REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.
- HÄLLSTRÖM, I. & BLANCK, A., 1985. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. *Chem. Biol. Interact.*, 56: 157-171.
- IGUCHI, H., KATO, K. & IBAYASHI, H., 1982. Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55 (1): 27-29.

- JANIAUD, P., 1987. Light, pineal, melatonin and chemical carcinogenesis. *Neuroendocrinol. Lett.*, 9: 311. In: VIJAYALAXMI, REITER, R. J., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., LEAL, B. Z. & MELTZ, M. L., 1995. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiation Res.*, 143: 102-106.
- KADA, T., INOUE, T. & MANIKI, M., 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. In: *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. E. J. Kleokowsky. (ed.). Praeger, New York, pp: 113-152. In: Santos, J. H. Diagnóstico da antigenotoxicidade da vanilina e de um isômero de posição, a o-vanilina, em termos de mutação gênica, aberração cromossômica e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tese, 1999, pp: 1- 71.
- KANEKO, M., BEAMISH, R. E. & DHALLA, N. S., 1989. Depression of heart sarcolemma  $C^{2+}$  - pumping ATPase activity by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.*, 256: H368-H374.
- KLEIN, D. C. & MOORE, R. Y., 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-metiltransferase: Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.*, 174: 245-262.
- KONOPACKA, M., WIDEL, M. & RZESZOWSKA-WOLNY, J., 1998. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutation Res.*, 417 (2-3): 85-94.

- KOPIN, I. J., PARE, M. B., AXELROD, J. & WEISSBACH, H., 1961. The rate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.*, 236: 3072-3075.
- KOTHARI, L. & SUBRAMANIAN, S., 1992a. A possible modulatory influence of melatonin on representative phase I and phase II drug melabolizing enzymes in DMBA-induced rats. Abstract International Meeting on Pineal Gland: Basic and Clinical Aspects. France, 7-9. September, pp. 78. In: TAN, D. X., REITER, R. J., CHEN, L., POEGGELER B., MANCHESTER, L. C. & BARLOW-WALDEN, L. R., 1994. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by carcinogen safrole. *Carcinogenesis*, 15 (2): 215-218.
- KOTHARI, L. & SUBRAMANIAN, S., 1992b. A possible modulatory influence of melatonin on representative phase I and phase II drug melabolizing enzymes in 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene induced rat mammary tumorigenesis. *Anti-Cancer Drugs*, 3: 623-628. In: REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.
- LAI, H. & SINGH, N. P., 1997. Melatonin and a spin-trap compound block radiofrequency eletromagnetic radiation-induced DNA strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*, 18: 446-454.
- LESNIKOV, V. A. & KORNEVA, E. A., 1992. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging: II. Thyrotropin-releasing hormone and melatonin forestall involution and promote reconstitution of the thymus in

anterior hypothalamic area (AHA)-lesioned mice. *Int. J. Neuroscience*, 62: 141-153.

LIEBERMAN, H. R., WALDHAUSER, F., GARFIELD, G., LYNCH, H. J. & WURTMAN, R. J., 1984. Effects of melatonin on human mood and performance. *Brain Res.*, 323: 201-207.

LINCOLN, G., ELBING, F. & ALMEIDA, O., 1985. Generation of melatonin rhythms. In: Photoperiodism, melatonin and the pineal. *Ciba Foundation Symposium*, 117: 129-148. In: RONCO, A. L. & HALBERG, F., 1992. The pineal gland. *Anticancer Res.*, 16: 2033-2040.

LINDSLEY, D. L. & ZIMM, G. G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, pp: 1133.

LISSONI, P., BASTONE, A., SALA, R., MAURI, R., ROVELLI, F., VIVIANI, S., BAJETTA, E., ESPOSTI, D., ESPOSTI, G., BELLA, L. D. & FRASCHINI, F., 1987. The clinical significance of melatonin serum determination in oncological patients and its correlations with GH and PRL blood levels. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23 (7): 949-957.

LISSONI, P., CRISPINO, S., BARNI, S., SORMANI, A., BRIVIO, F., PELIZZONI, F., BRENNNA, A., BRATINA, G. & TANCINI, G., 1990. Pineal gland and tumor cell kinetics: serum levels of melatonin in relation to Ki-67 labeling rate in breast cancer. *Oncology*, 47: 275-277.

- LITTLEFIELD, L. G., JOINER, E. E., COLYER, S. P., SAYER, A. M. & FROME, E. L., 1988. Modulation of radiation induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger. 1: Dose response studies in human lymphocytes exposed 220 kV x-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 53: 875-890. In: VIJAYALAXMI, REITER, R. J., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., LEAL, B. Z. & MELTZ, M. L., 1995. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiation Res.*, 143: 102-106.
- MARABINI, S., CAROSSINO, A. M. & CAGNONI, M., 1992. Effects of melatonin on the proliferation of peripheral blood mononuclear cell cultures from leukaemic patients and control subjects. *Med. Sci. Res.*, 20: 551-553.
- MIKUNI, M., SAITO, Y., KOYAMA, T. & YAMASHITA, I., 1981. Circadian variation of cyclic AMP in the rat pineal gland. *Journal of Neurochemistry*, 36 (3): 1295-1297.
- MORISHIMA, I., MATSUI, H., MUKAWA, H., HAYASHI, K., TOKI, Y., OKUMURA, K., ITO, T. & HAYAKAWA, T., 1998. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci.*, 63 (7): 511-521.
- MURNAME, J. P., 1996. Role of induced genetic instability in the mutagenic effects of chemicals and radiation. *Mutation Res.*, 367 (1): 11
- MUSATOV, S. A., ANISIMOV, V. N., ANDRÉ, V., VIGREUX, C., GODARD, T., GAUDUCHON, P. & SICHEL, F., 1998. Modulatory effects of melatonin on

genotoxic response of reference mutagens in the Ames test and the comet assay. *Mutation Res.*, 417: 75-84.

ORTIZ, G. G., REITER, R. J., ZUNIGA, G. MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., PABLOS, M. I., OH, C. S., GARCIA, J. J. & BITZER-QUINTERO, O. K., 2000. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutation Res.*, 464: 239-245.

PACKER, L., 1994. Vitamin E is nature's master antioxidant. *Sci. Amer. (Sci. Med.)*, Mar/Apr, pp. 54-63. In: REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.

PANG, S. F., TANG, F. & TANG, P. L., 1984. Negative correlation of age and the levels of pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *The Journal of Experimental Zoology*, 229: 41-47.

PANGERL, B., PANGERL, A. & REITER, R. J., 1990. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: A review. *J. Neural Transm.*, 17-30. In: REITER, R. J., 1992. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays*, 14 (3): 169-175.

POEGGELER, B., BALZER, I., HARDELAND, R. & LERCHIL, A., 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften*, 78: 268-269. In: REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J.,

ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.

POZO, D., REITER, R. J., CALVO, J. P. & GUERRERO, J. M., 1994. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.*, 55: PL455-PL460.

REITER, R. J., 1973. Comparative physiology. *Ann. Rev. Physiol.*, 35: 305-328.

REITER, R. J., 1985. Action spectra, dose response relationships and temporal aspects of light's effects on the pineal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 453: 215-230.

REITER, R. J., 1990. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science*, 210: 1372-1373. In: REITER, R. J., 1992. The aging pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays*, 14 (3): 169-175.

REITER, R. J., 1991a. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 79: C153-C158.

REITER, R. J., 1991b. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12 (2): 151-180.

REITER, R. J., 1991c. Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci.*, 6: 223-227. In: REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.

REITER, R. J., 1992. The aging pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays*, 14 (3): 169-175.

REITER, R. J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G. G. & ACUÑA-CASTROVEJO, D., 1995. A Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.*, 18: 1-11.

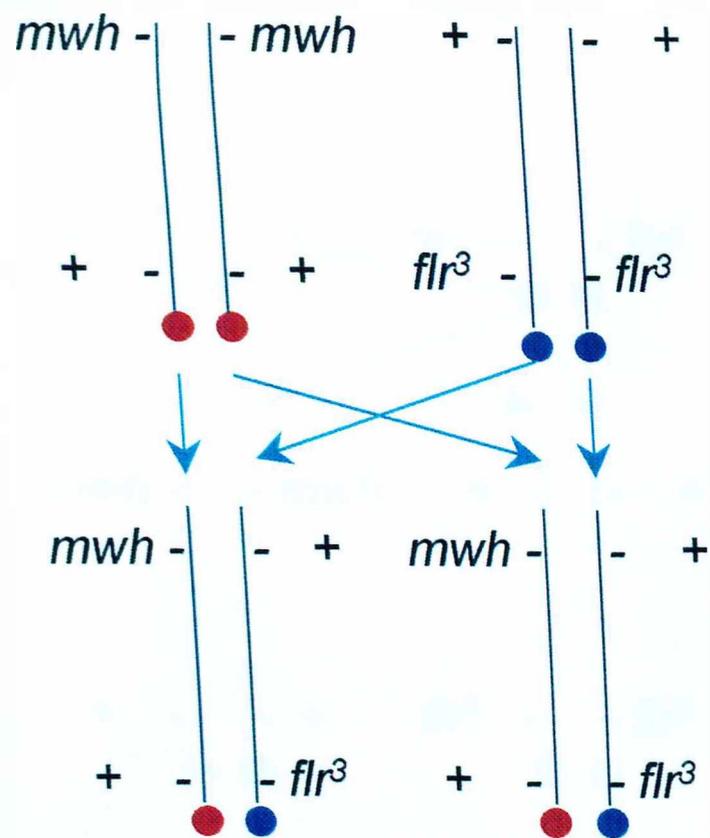
REITER, R. J., TANG, L., GARCIA, J. J. & MUÑOZ-HOYOS, A., 1997. *Life Sci.*, 60: 2255-2271. In: MORISHIMA, I., MATSUI, H., MUKAWA, H., HAYASHI, K., TOKI, Y., OKUMURA, K., ITO, T. e HAYAKAWA, T., 1998. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci.*, 63 (7): 511-521.

SEWERYNEK, E., ORTIZ, G. G., REITER, R. J., PABLOS, M. I., MELCHIORRI, D. & DANIELS, W. M., 1996. Lipopolysaccharide-induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 117: 183-188.

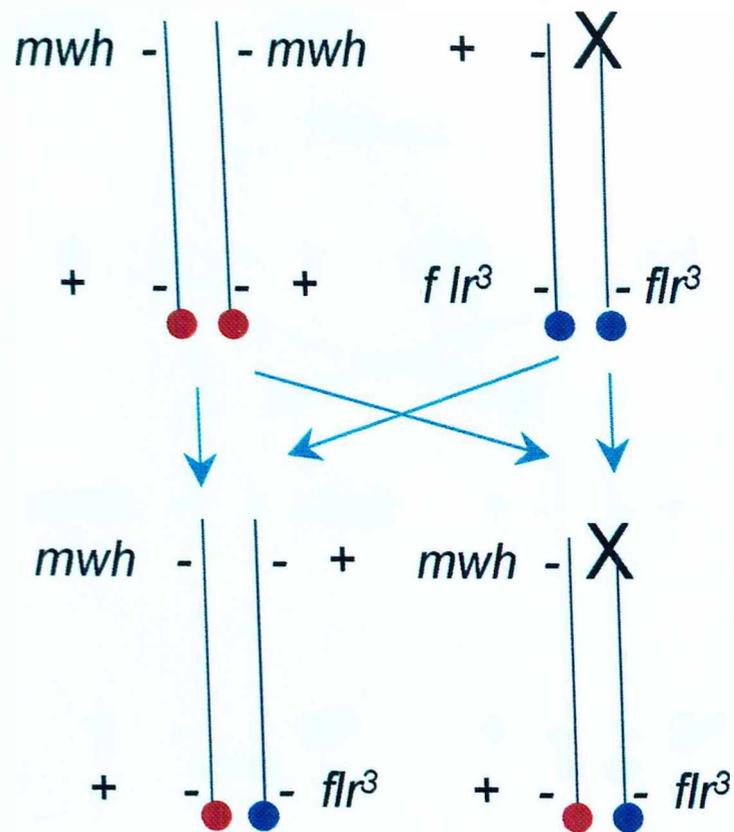
- TESTART, J., FRYDMAN, R. & ROGER, M., 1982. Seasonal influence of diurnal rhythms in the onset of the plasma luteinizing hormone surge in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55 (2): 374-377.
- VIJAYALAXMI, REITER, R. J. & MELTZ, M. L., 1995a. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutation Res.*, 346: 23-31.
- VIJAYALAXMI, REITER, R. J., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., LEAL, B. Z. & MELTZ, M. L., 1995b. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiation Res.*, 143: 102-106.
- VIJAYALAXMI, REITER, R. J., HERMAN, T. S. & MELTZ, M. L., 1996. Melatonin and radioprotection from genetic damage: *In vivo / in vitro* studies with humans volunteers. *Mutation Res.*, 371: 221-228.
- VIJAYALAXMI, REITER, R. J., HERMAN, T. S. & MELTZ, M. L., 1998. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutation Res.*, 397: 203-208.
- VIJAYALAXMI, MELTZ, M. L., REITER, R. J. & HERMAN, T. S., 1999. Melatonin and protection from whole body irradiation: survival studies in mice. *Mutation Res.*, 425 (1): 21-27.

- VOISIN, P., NAMBOODIRI, M. A. A. & KLEIN, D. C., 1984. Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J. Biol. Chem.*, 259:10913.
- VOGEL, E. W., 1987. Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: The need for a change in test strategy. *Mutagenesis*, 2: 161-171.
- VOGEL, E. W., 1992. Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Res.*, 284: 159-175.
- VOORDOUW, B. C. G., EUSER, R., VERDONK, R. E. R., ALBERDA, T., JONG, F. H., DROGENDIJK, A. C., FAUSER, B. C. J. M. & COHEN, M., 1992. Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55 (2): 374-377.
- WEINBERG, R., 1996. How Cancer arises. *Sci. Amer.*, 275: 32-40.
- WEISS, B., 1969. Effects of environmental lighting and chronic denervation on the activation of adenylyl cyclase of rat pineal gland by noropinephrine and sodium chloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 168: 146.

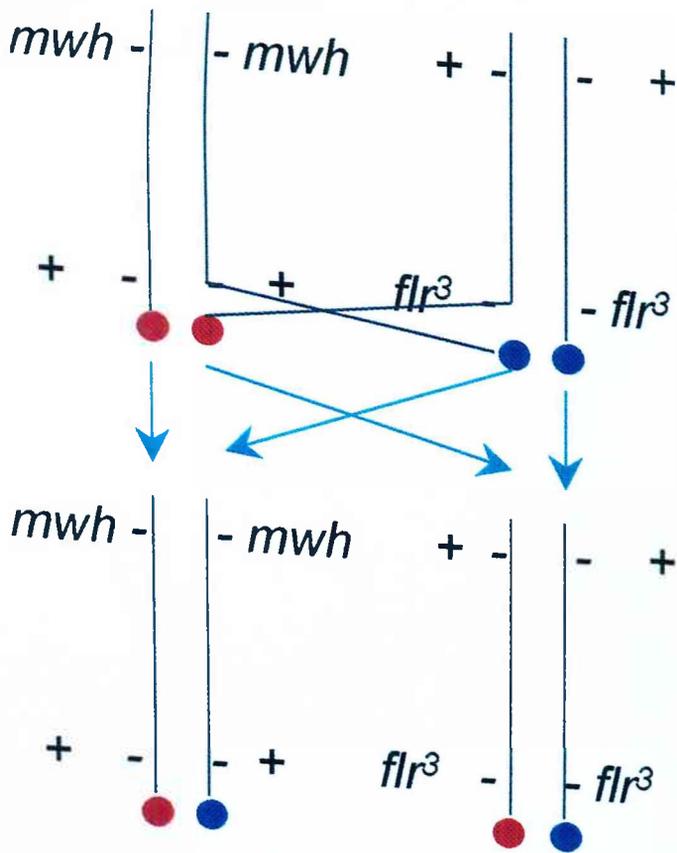
Anexo 1: Esquema de uma divisão mitótica normal e de divisões mitóticas que sofreram alterações provocadas por eventos genotóxicos



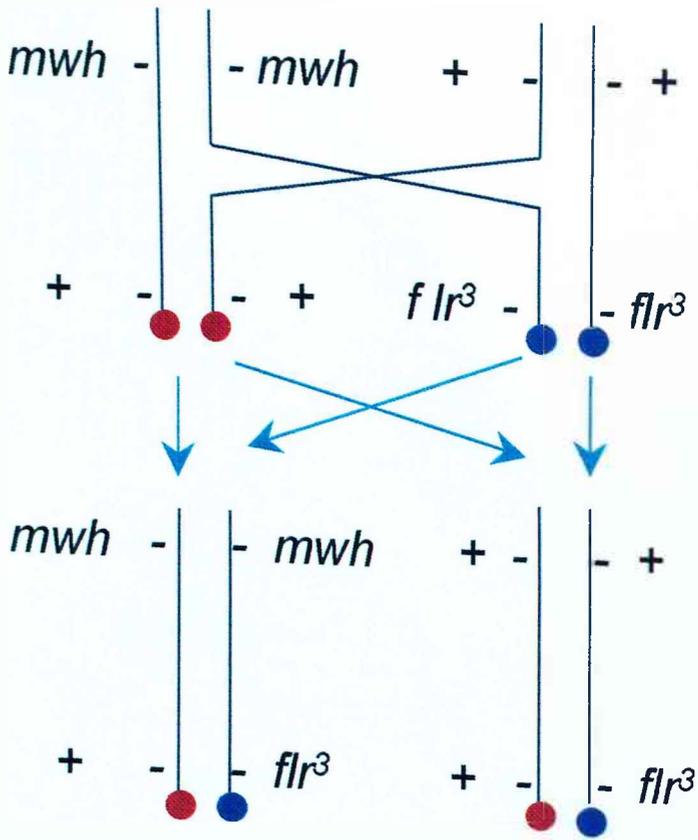
Normal



Deleção; Mutação pontual



Recombinação proximal



Recombinação distal