



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Frederico Freire Bastos


**Melatonina, isoenzimas de glutathione S-transferases e estresse oxidante em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**

Rio de Janeiro

2010

Frederico Freire Bastos

**Melatonina, isoenzimas de glutatona S-transferases e estresse oxidante  
em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B327 Bastos, Frederico Freire.

Melatonina, isoenzimas de glutathione S-transferases e estresse oxidante em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,1887) / Frederico Freire Bastos - 2010.  
97 f. : il.

Orientador: Israel Felzenszwalb.

Co-orientadora: Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Pacu (Peixe) - Teses. 2. Glutathione S-Transferase - Teses. 3. Melatonina - Teses. 4. Antioxidantes - Teses. 5. Espécies de oxigênio reativas - Teses. 6. Enzimas - Teses. I. Felzenszwalb, Israel. II. Bastos, Vera Lúcia Freire da Cunha. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 597.554.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Frederico Freire Bastos

**Melatonina, isoenzimas de glutathiona S-transferases e estresse oxidante  
em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 08 de março de 2010.

Coorientadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane Martins Cardoso de Salles  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

---

Prof. Dr. Gilberto Moraes  
Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Yael de Abreu Villaça  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2010

## DEDICATÓRIA

Agradeço a Jesus Cristo pela minha vida simplesmente perfeita, de estudo, trabalho, muita alegria, música, oceano, viagens, surf e integração com a natureza. Agradeço a ele por um corpo e uma mente sã. Pela proteção que me concedeu contra as enfermidades e mesquinhas do mundo.

Sou imensamente grato a meus pais que puderam oferecer-me escola, carinho e conforto no lar, todas as condições para que eu me tornasse uma pessoa cada vez melhor. Quatro anos após o mestrado, continuo insistindo em minha dedicatória... Parem de fumar!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus companheiros de laboratório: Aline, Eduardo, Laíses, Daphne, Bruna, Carlucio, Arthur, Roosevelt, Lin e aos professores Vera Bastos e Jayme Bastos. Reconheço e agradeço o espírito de grupo presente no laboratório e a amizade entre os profissionais que aqui trabalham, tornando possível o nosso compromisso com a ciência bastante prazeroso, sem contar das viagens para a fazenda e o Pantanal, que ficarão enraizados para sempre em minha memória.

Agradeço ao professor e orientador Israel Felzenszwalb pela amizade e confiança, preocupação e ajuda prestada ao longo dos últimos 8 anos de nossa convivência.

Deixo aqui um agradecimento em separado e especial ao Rafael e também ao Santiago que comigo fizeram com que todos os trabalhos de campo do laboratório fossem realizados acima de todas as complicações e contratempos ocorridos ao longo destes últimos anos. Dificuldades e problemas tivemos muitos, encaramos todos, e vencemos juntos! Valeu meninos!

Sou algo que precisa do oceano,  
pra sentir o vento e o gosto do sal,  
pra resolver a alma.

*Frederico Freire Bastos*

Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser. Que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e, simplesmente, ir ver.

*Amyr Klink*

Vem, ô Deus fala pra ele que eu tô bem  
Numa casa de serra ou de frente pro mar  
Onde eu possa olhar as estrelas pra relaxar  
Deitar o meu corpo no pasto pra descansar  
Da hipocrisia dos homens

E lá... Ô e lá  
Eu acordo bem cedo de prancha na mão  
Meu reggae e minhas ondas são quase oração  
E ela chega descalça na beira do mar  
Cabelos jogados ao vento ela vem me abraçar  
Me beijar com seus lábios morenos

Casar... Ô casar  
Na boca do rio eu construo meu lar  
Deu fome eu jogo anzol pra pescar  
Natureza promove energia no lar  
É Deus, é família, meu reggae, aqui vou ficar  
E é assim nessa paz que eu vivo...

*Frederico Freire Bastos*

## RESUMO

BASTOS, Frederico Freire. **Melatonina, isoenzimas de glutathione S-transferases e estresse oxidante em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2010. 97 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.

O oxigênio é fundamental para os vertebrados. No entanto, variações dos níveis de oxigênio na água podem provocar estresse oxidante em peixes porque privação de oxigênio seguida de reoxigenação forma espécies reativas de oxigênio (ERO) em células. Níveis intracelulares de ERO aumentados favorecem que moléculas de proteínas, fosfolípidios e ácidos nucleicos sofram alterações, vindo a prejudicar muitas funções celulares. No Pantanal, habitat do pacu, o nível de oxigênio varia circadianamente na água das lagoas rasas que acabam isoladas dos rios na seca. O pacu evoluiu sob a pressão contínua da exposição aos efeitos prejudiciais das ERO causados pelos pulsos de inundação. A melatonina, uma indolamina produzida na glândula pineal, influencia os níveis de atividade de enzimas antioxidantes que reduzem ERO, além de ser capaz de doar elétrons ou captar radicais livres de forma não enzimática. Os níveis de melatonina no pacu são mais altos no verão e menores no inverno. Isoenzimas de glutathione S-transferases que conjugam o tripetídeo glutathione com o 4-hidroxinonanal, aldeído derivado da peroxidação de ácidos graxos por ERO, são importantes para evitar alteração funcional de proteínas por ligação do 4-hidroxinonanal à sua estrutura. Neste trabalho procuramos relação entre estresse oxidante, níveis de atividades de glutathione S-transferase e melatonina, para estabelecer se a melatonina ajudaria pacus a superar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio. Ensaíamos atividades de isoenzimas de glutathione S-transferases no citosol de fígado de pacus mantidos em normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia no inverno e no verão. Medimos o efeito da melatonina *in vitro* e *in vivo* sobre as atividades de isoenzimas de glutathione S-transferase. Medimos os efeitos do estresse oxidante sobre a ligação do 4-hidroxinonanal com proteínas nos fígados de pacus tratados com melatonina. Somente as isoenzimas que conjugam 4-hidroxinonanal com glutathione mostraram menor atividade no inverno em relação ao verão; outras isoenzimas de glutathione S-transferases não alteram suas atividades sazonalmente. *In vitro* a melatonina não alterou a atividade de isoenzimas de glutathione S-transferase que conjugam o 4-hidroxinonanal, mas inibiu outras isoenzimas de glutathione S-transferase. *In vivo* a melatonina aumentou a atividade encontrada no inverno das isoenzimas que conjugam o 4-hidroxinonanal para os níveis do verão. A ligação de 4-hidroxinonanal com proteínas foi menor em pacus inoculados com melatonina. Nossos resultados mostram que a melatonina pode influenciar os efeitos de ERO em fígado de pacus. Ficou claro que a melatonina do plasma mantém os níveis de atividade conjugadora de 4-hidroxinonanal do fígado em pacus e que a baixa produção de melatonina no inverno não é adequada para a conjugação do 4-hidroxinonanal em fígado de pacus.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*. Glutathione S-transferase. Estresse oxidante. Melatonina.



## ABSTRACT

Oxygen is vital for vertebrates. However, changes in the levels of dissolved oxygen in water might cause oxidative stress in fishes because the shortage of oxygen followed by reoxygenation originates reactive oxygen species (ROS) inside cells. Higher intracellular levels of ROS favor alterations of proteins, phospholipids and nucleic acid molecules, which result in impairment of many cell functions. In Pantanal, the pacu's habitat, circadian variation of the oxygen levels occurs in water of the shallow lagoons that ended up isolated from the rivers along the dry season. Pacu has evolved under the pressure of continuous exposition to harmful effects of ROS caused by the annual inundation pulses. Melatonin, an indolamine produced by the pineal gland, influences the levels of activity of antioxidant enzymes that reduce ROS, and is capable of donating electrons or scavenge free radicals non-enzymatically. Pacu's melatonin levels are higher during summer than in winter. Glutathione S-transferases isoenzymes that catalyze the conjugation of the tripeptide glutathione with 4-hydroxynonenal, an aldehyde derived from peroxidation of fat acids by ROS, are important to avoid functional alterations of proteins consequential to the binding of 4-hydroxynonenal to their structures. In this work, we searched for facts that linked oxidative stress, levels of activity of glutathione S-transferase and melatonin, in order to establish whether melatonin could help pacus to overcome the pernicious effects of reactive oxygen species. We carried out assays of glutathione S-transferases in liver cytosol of pacus kept under normoxia, hypoxia, reoxygenation and hyperoxia, in the summer and in the winter. We measured the effect of melatonin *in vitro* and *in vivo* on isoenzymes of glutathione S-transferases. We measured the effects of oxidative stress on the binding of 4-hydroxynonenal to proteins in liver of pacu treated with melatonin. Only isoenzymes that conjugate 4-hydroxynonenal with glutathione showed less activity during the winter in comparison to the summer; other isoenzymes did not have their activities changed seasonally. *In vitro*, melatonin did not change the activity of glutathione S-transferases isoenzymes that conjugate 4-hydroxynonenal, but inhibited other isoenzymes of glutathione S-transferase. *In vivo*, melatonin enhanced the liver activity of the glutathione S-transferase that conjugate 4-hydroxynonenal found in winter up to the levels found in summer. The binding of 4-hydroxynonenal to proteins was lower in liver cytosol from pacus injected with melatonin. Our findings show that melatonin can influence the effects of ROS in liver of pacu. It became evident that plasma melatonin maintains the liver levels of the conjugating activity of 4-hydroxynonenal and that the lower production of melatonin during winter is not adequate to the conjugation of 4-hydroxynonenal.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*. Melatonin. Glutathione S-transferases, Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa da região Centro-Oeste do Brasil.....	19
Figura 2 –	Membrana interna da mitocôndria e complexos moleculares.....	22
Figura 3 –	Formação das principais espécies de oxigênio (ERO).....	25
Figura 4 –	Radical sendo neutralizado por um antioxidante.....	27
Figura 5 –	Etapas de oxidação de ácidos graxos a aldeídos.....	29
Figura 6 –	Sistema de biotransformação de xenobióticos.....	32
Figura 7 –	Esquema mostrando os sítios G e H das GST.....	34
Figura 8 –	<u>Estrutura química da glutationa reduzida (GSH)</u> .....	35
Figura 9 –	<u>Atividade de peroxidase de GST sobre hidroperóxidos de lipídeos</u> .....	36
Figura 10 –	<u>Conjugação do 4-HNE com o GSH</u> .....	37
Figura 11 –	<u>Papel das GST na atenuação da peroxidação de lipídeos</u> ...	38
Figura 12 –	<u>Molécula da N-acetyl-5-metoxytryptamina (melatonina)</u> .....	40
Figura 13 –	<u>Biossíntese da melatonina</u> .....	42
Figura 14 –	<u>Fotografia do pacu, Piaractus mesopotamicus</u> .....	48
Figura 15 –	<u>Esquema do preparo da fração solúvel</u> .....	53
Figura 16 –	<u>Efeito da concentração do substrato 4-HNE sobre a atividade de GST em citosol hepático de pacus submetidos a diferentes concentrações de oxigênio na água</u> .....	60
Figura 17 –	<u>Atividade de GST com 4-HNE em fração pós mitocondrial de peixes do Pantanal Matogrossense</u> .....	61
Figura 18 –	<u>Atividade geral e das isoenzimas pi e alfa de GST de pacus em normoxia e em hipoxia no verão e no inverno</u> ....	62
Figura 19 –	<u>Efeito in vitro da melatonina sobre a atividade geral de GST citosólica de fígado de pacu</u> .....	63
Figura 20 –	<u>Efeito in vivo da melatonina sobre as atividades geral e da</u>	

	<u>isoenzima pi de GST citosólica de fígado de pacu.....</u>	65
Figura 21 –	<u>Atividades de GST com 4-HNE em citosol hepático de pacu inoculados ou não com melatonina em normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia, no verão e no inverno.....</u>	67
Figura 22 –	<u>Immunoblot de carbonilação de proteínas em pacus injetados ou não com melatonina e submetidos a normoxia, hipoxia, reoxigenação, hiperoxia.....</u>	69
Figura 23 –	<u>Efeito in vitro de doses fisiológicas de melatonina sobre as atividades geral e da isoenzima pi de GST de fígado de peixes submetidos a hipoxia e normoxia.....</u>	71
Figura 24 –	<u>Efeito in vitro da melatonina em doses fisiológicas sobre a atividade de GST com 4-HNE de fígado de pacus.....</u>	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de marcadores de hipoxia no sangue .....	59
Tabela 2 - Comparação das $V_{m\acute{a}x}$ e $K_M$ da GST alfa sobre o 4-HNE .....	60
Tabela 3 - Concentração de melatonina no plasma de pacu inoculados com melatonina .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AFMKN <sup>1</sup>	Acetil- <i>N</i> <sup>2</sup> -formil-5-metoxiquinuramina
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AMK	<i>N</i> <sup>1</sup> -acetil-5-metoxiquinuramina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHP	Hidroperóxido de cumeno
DCNB	1,2-Dicloro-4-nitrobenzeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ETHA	Ácido etacrínico
FA-OOH	Hidroperóxido de ácido graxo
G	Gravidade
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
GPX	Glutaciona Peroxidase
GS <sup>-</sup>	Glutaciona desprotonada
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
HIF	Fator induzido por hipoxia
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
L <sup>·</sup>	Radical de lipídio
LH	Lipídio na forma reduzida
LO <sup>·</sup>	Radical alcóxil de lipídio
LOO <sup>·</sup>	Radical peróxil de lipídio
LOOH	Peróxido de lipídio
HIOMT	Hidroxi indol O-metiltransferase
4-HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
MDA	Malondialdeído
MSH	Hormônio estimulador de melanócitos
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NFκB	Fator nuclear κB
PL-OOH	Hidroperóxido de fosfolipídio
ROS	Espécie reativa do oxigênio (inglês)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

SNAT	Serotonina N-acetiltransferase
SOD	Superóxido dismutase
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletenodiamina
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	50
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
3.1	<b>Reagentes</b> .....	51
3.2	<b>Equipamentos</b> .....	51
3.3	<b>Desenho experimental</b> .....	51
3.4	<b>Preparação da fração citosol (solúvel)</b> .....	52
3.5	<b>Determinação de proteínas</b> .....	53
3.6	<b>Obtenção do plasma e extrato de plasma</b> .....	54
3.7	<b>Níveis de melatonina no plasma</b> .....	54
3.8	<b>Medida de hipoxia e hiperoxia</b> .....	54
3.9	<b>Determinação das atividades de GST</b> .....	55
3.10	<b>Efeito <i>in vitro</i> da melatonina sobre as atividades de GST solúveis hepáticas de pacu</b> .....	56
3.11	<b>Determinação da concentração de melatonina no plasma após a injeção dos peixes com melatonina</b> .....	56
3.12	<b>Carbonilação de proteínas (medida do 4-HNE ligado à proteínas)</b> .....	56
3.13	<b>Testes estatísticos e cinéticos</b> .....	58
4	<b>RESULTADOS</b> .....	59
4.1	<b>Padronização das condições ótimas de ensaio enzimático</b> .....	59
4.2	<b>Níveis de atividade de GST com 4-HNE na fração pós-mitocondrial de fígado de peixes coletados no Pantanal</b> .....	61
4.3	<b>Níveis das atividades de GST em normoxia e em hipoxia no verão e no inverno</b> .....	61
4.4	<b>Efeito <i>in vitro</i> da melatonina sobre a atividade de GST solúvel de fígado de pacu com CDNB</b> .....	63
4.5	<b>Níveis de melatonina no plasma em pacus inoculados com 3 e 0,3 mg de melatonina / kg de peso</b> .....	63
4.6	<b>Efeito <i>in vivo</i> da melatonina sobre as atividades de GST de fígado de pacu com CDNB e com ETHA</b> .....	64

4.7	<b>Efeito dos níveis de oxigenação sobre a atividade de conjugação da GST com o 4-HNE em pacus tratados ou não com melatonina, no inverno e no verão.....</b>	<b>65</b>
4.8	<b>Carbonilação de proteínas por 4-HNE em fração citosólica hepática de pacus injetados ou não com melatonina em normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia.....</b>	<b>68</b>
4.9	<b>Efeito <i>in vitro</i> da melatonina sobre as atividades de GST com CDNB ou com ETHA de fígado de pacus submetidos a normoxia e hipoxia.....</b>	<b>69</b>
4.10	<b>Efeito <i>in vitro</i> da melatonina na atividade de GST sobre 4-HNE de fígado de pacus submetidos a normoxia e hipoxia, reoxigenação e hiperoxia..</b>	<b>71</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Foi nos oceanos primitivos que a vida deve ter-se originado. Pelo menos é o que até agora os cientistas têm aceitado como a hipótese mais provável. O bioquímico russo Aleksander Ivanovitch Oparin (1894-1980) procurou explicar a formação do primeiro ser vivo a partir de moléculas orgânicas complexas. Oparin acreditava que as moléculas orgânicas foram produzidas de reações entre os gases existentes na atmosfera primitiva. Essas reações teriam sido provocadas pela energia dos raios ultravioletas do sol e pelas descargas elétricas de raios durante as tempestades, as quais eram muito frequentes. Entre as diversas moléculas orgânicas supostamente produzidas a partir dos gases primitivos dos vulcões e da própria atmosfera, destacam-se os aminoácidos. Os aminoácidos devem ter combinado uns com os outros dando origem aos seus polímeros, as proteínas. Ao longo de milhões de anos as proteínas foram se acumulando nos mares primitivos e se juntando em minúsculos aglomerados, aos quais Oparin chamou de “coacervados”. A ciência atual admite que muitas substâncias presentes nos mares primitivos foram lentamente se juntando aos coacervados, tornando-os cada vez mais complexos. Admite-se também que no interior dos coacervados ocorreram muitas reações entre substâncias até que, depois de milhões de anos, surgiram os ácidos nucleicos. Assim, pouco a pouco, os coacervados puderam se transformar em seres unicelulares.

Os primeiros seres vivos da Terra eram unicelulares, heterotróficos e alimentavam-se de matéria existente nos oceanos. Com o passar do tempo, o número desses seres primitivos aumentou bastante e os alimentos existentes nos oceanos foram lentamente se tornando insuficientes para todos. Após muitas modificações ocorridas no material genético, alguns desses seres tornaram-se capazes de produzir clorofila e fazer fotossíntese, surgindo os primeiros seres autotróficos, que produziam o alimento necessário para manterem-se vivos no planeta. Então, os autotróficos e heterotróficos iniciaram a longa evolução que deu origem a toda a vida que hoje existe na Terra.

A água doce, essencial para a manutenção da vida, é o recurso mais importante do planeta, e nos próximos vinte anos se tornará escassa. Apesar de sua escassez e essencialidade, a água vem sendo desperdiçada em muitas partes do planeta. A falta de saneamento, aliada ao crescimento populacional e industrial são causas da degradação da qualidade dos recursos hídricos. Estima-se que 18% da população mundial não tenham acesso à água potável e que 40% das pessoas não sejam atendidas pelos serviços sanitários (ONU, 2005), o que faz crescer a preocupação internacional com a conservação dos mananciais a cada dia. A América Latina possui 26% da água doce disponível em todo o mundo, grande parte no Brasil (ONU, 2005). O país, entretanto, desperdiça enormes volumes com vazamentos causados por tubulações velhas, falta de conscientização da população — que faz mau uso da água — e, principalmente, devido a falta de sistemas de saneamento e tratamento de rejeitos urbanos e industriais, além da contaminação causada pelas atividades agrícolas e pelos acidentes ambientais.

### 1.1. Pantanal

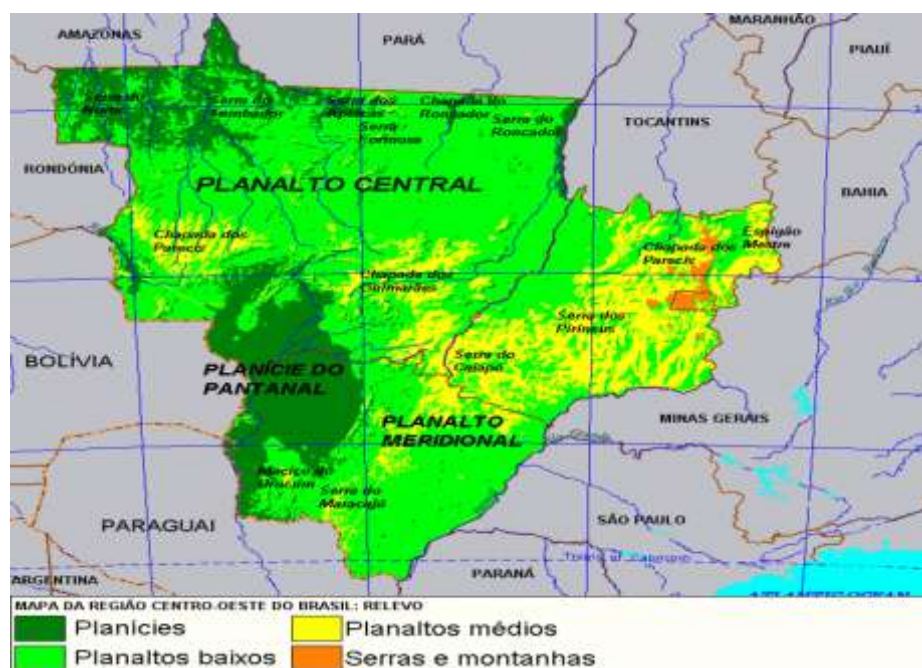


Figura 1. Mapa da região Centro-Oeste do Brasil.

O Pantanal está distribuído entre o Brasil, o Paraguai e a Bolívia, sendo que 70% dele está em território brasileiro, nos estados de Mato Grosso e de Mato Grosso do Sul. Com aproximadamente 210.000 km<sup>2</sup>, dos quais 140.000 km<sup>2</sup> estão em território brasileiro, é a maior área alagada do planeta. O Pantanal abriga uma rica flora e fauna com mais de 260 espécies de peixes, 122 de mamíferos, 93 de répteis, 1.132 de borboletas e 656 de pássaros (<http://www.brazilecovip.com.br/pantanal.html>). Nas lendas indígenas e nos primeiros mapas, o Pantanal foi descrito como um grande mar com várias ilhas, e como os índios que habitavam a região de Cáceres eram os Xaraés (donos do rio), foi chamado em 1555 de “mar dos Xaraés”. Nos anos chuvosos o rio Paraguai transborda por cerca de 20 km, invadindo lagoas e regenerando o “mar dos Xaraés”. A consequência são as inundações que ocorrem entre os meses de outubro até abril, originando um ciclo de vida particular desta região. O fenômeno anual de cheia e de seca recorrente no Pantanal é conhecido como pulso de inundação. Constitui o que em ecologia é chamado de “processo ecológico essencial”, ou seja, o processo que comanda a riqueza, a distribuição e a abundância da vida em um ecossistema. A abundância da fauna, especialmente a aquática, é explicada pelo pulso de inundação porque a cheia e a seca maximizam a oferta de alimentos para a fauna. No período da cheia uma parte da vegetação submersa das áreas inundadas morre e decompõe, formando detritos orgânicos, que junto com flores, frutos e sementes, servem de fonte de alimento para os peixes. Outra parte desta vegetação funciona como filtro, retendo os sedimentos e matéria orgânica dissolvida, os quais, por sua vez, servem como substrato para desenvolvimento de algas e micro-organismos. A inundação também propicia o desenvolvimento da vegetação aquática que serve de habitat para os insetos, que são outra fonte de alimento para os peixes. Na fase da seca, a vegetação terrestre ressurgue, agora em terras mais fertilizadas pela matéria orgânica da vegetação aquática decomposta durante o período das cheias. Dessa forma, o sistema consegue incorporar e aproveitar matéria orgânica de forma bastante eficiente, o que explica a riqueza e diversidade dos rios nas planícies inundáveis (<http://www.brazilecovip.com.br/pantanal.html>).

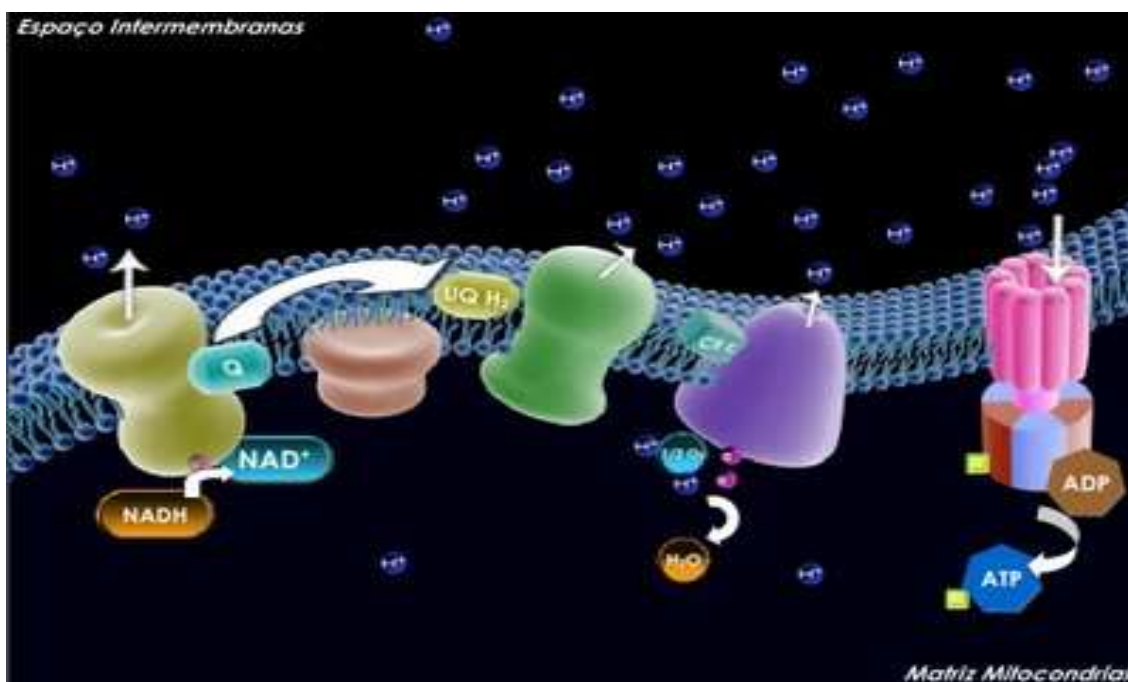
## 1.2. Estresse oxidante

Acompanhando o ciclo de inundação do Pantanal está o ciclo do oxigênio. Mudanças nos níveis de oxigênio podem acontecer nos ambientes aquáticos. Por isso organismos aquáticos, inclusive os peixes, desenvolveram inúmeras adaptações para que pudessem sobreviver em anoxia, hipoxia e hiperoxia (Lushchak e col., 2005). Os níveis de oxigênio podem variar bastante, tanto sazonalmente como diariamente, fato explicado pelo pulso de inundação e pela massa de algas aquáticas do Pantanal. Durante o dia, as algas fazem fotossíntese produzindo oxigênio. Durante a noite, devido à ausência de luz, o oxigênio é apenas consumido, tanto pelas algas como pelos demais organismos aeróbicos, e sua concentração na água pode chegar até perto de zero. Ambientes de águas quentes têm menos oxigênio dissolvido na água do que ambientes de águas frias, bem como os ambientes de águas correntes têm mais oxigênio dissolvido do que os que apresentam águas paradas. Devido a estas variações de oxigênio na água, especialmente nos ambientes de água doce, o oxigênio foi o principal fator para a evolução dos peixes. Cada espécie de peixe necessita de diferentes níveis de oxigênio para realizar suas funções metabólicas normais. As respostas e aclimatações também variam entre as espécies de peixes quando eles são submetidos à hipoxia ou hiperoxia (Nikinmaa, 2002).

Os termos hipoxia e hiperoxia são mais bem empregados para definir concentrações baixas ou altas de oxigênio no sangue de um animal. Animais em condições de hipoxia ou hiperoxia apresentam alterações bioquímicas e fisiológicas que podem levá-los à morte (Ma, 2009). A concentração de oxigênio intracelular pode interferir na sinalização celular, metabolismo energético, expressão gênica e apoptose (Nikinmaa, 2002). Sabe-se, por exemplo, que o metabolismo de proteínas, as biossínteses da ureia e da glicose, e a atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase diminuem severamente em hepatócitos de tartaruga em anoxia (Hochachka e col., 1996).

Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio começa a ser limitante quando a taxa de fosforilação oxidativa começa a diminuir, prejudicando a formação de ATP, o que acarreta um déficit energético (Schmidt e Kamp, 1996). A

passagem dos elétrons pelos complexos de membrana na mitocôndria faz com que os prótons sejam bombeados para o espaço intermembranas. Os prótons voltam para a matriz mitocondrial ao atravessarem novamente a membrana interna, porém agora através da ATP-sintase. A passagem de prótons pela ATP-sintase está ligada a um processo de fosforilação, transformando moléculas de ADP em moléculas de ATP. Todavia, na ausência de oxigênio ou mesmo em baixas concentrações de oxigênio, as transferências de elétrons através dos complexos I, III e IV diminuem de velocidade ou são interrompidas, o que faz com que a ATP-sintase comece a exercer um papel inverso bombeando prótons da matriz de volta para o espaço intermembranas. Para tanto ocorre hidrólise de ATP em ADP. Isto significa que em baixas concentrações de oxigênio a mitocôndria passa de produtora para consumidora de ATP (Lisa e col., 1998).



**Figura 2.** Membrana interna da mitocôndria e complexos moleculares.

Severa diminuição do metabolismo energético (Lutz, 1997; Hochachka, 1986) juntamente com uma maior eficiência das vias que produzem ATP (Hochachka, 1993) são os principais mecanismos de defesa contra a hipoxia.

Na adaptação à hipoxia, as vias que maximizam a produção de ATP por mol de oxigênio são favorecidas. Outra importante resposta adaptativa é tornada possível por uma proteína heterodimérica conhecida por fator de transcrição induzido pela hipoxia (HIF). O HIF-1 estimula a síntese de proteínas que promovem mudanças metabólicas dentro das células de tecidos em hipoxia e induz neovascularização para suprir e restabelecer o nível de oxigênio adequado para o tecido (Manolescu e col., 2009). O HIF-1 também tem papel importantíssimo na regulação da apoptose, adesão celular, estrutura do citoesqueleto, motilidade celular, homeostase epitelial, tônus vascular, eritropoese, metabolismo do ferro e regulação do pH (Brahimi-Horn, 2005).

Tanto a privação como a reintrodução de oxigênio ao organismo podem causar sérios danos para os órgãos e tecidos de mamíferos, como no caso de situações nas quais as células sofrem isquemia seguida de reperfusão (Manolescu e col., 2009; Garcia e col., 1996; Ruuge e col., 1991; Downey, 1990). Águas excessivamente enriquecidas em oxigênio podem sobrecarregar as células e provocar um estresse oxidante que alguns autores reportaram tolerável para alguns peixes, especialmente em carpas (Lushchak e col., 2005) e no peixe japonês (Lushchack e col., 2001). Peixes parecem ter mecanismos diferentes de adaptação a mudanças bruscas de oxigênio que os fazem superar os efeitos prejudiciais observados em humanos. Tais fatos despertaram curiosidades em nosso grupo de pesquisa, levando-nos a estudar a bioquímica e as alterações ocorridas em pacu, pois o pacu consegue suportar altas variações da concentração de oxigênio causadas pelos ciclos de inundação que ocorrem no Pantanal sem sofrer danos celulares decorrentes do estresse oxidante.

### **1.3. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)**

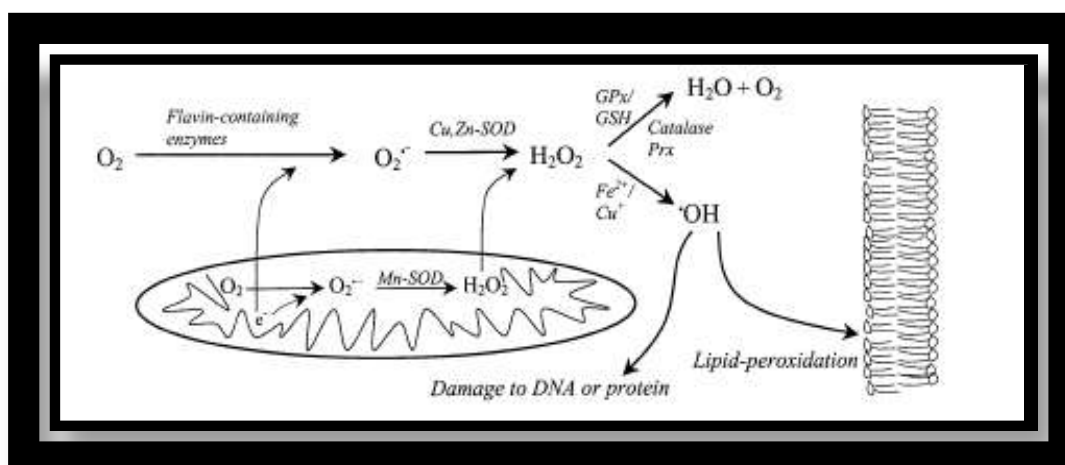
O oxigênio é fundamental para a célula. Devido a sua abundância na atmosfera e suas propriedades termodinâmicas favoráveis, o oxigênio resultou ao longo da evolução como o acceptor final de elétrons da cadeia respiratória (Ma, 2009). A completa redução do oxigênio em água pela citocromo oxidase é

a etapa principal no mecanismo de formação de ATP nos organismos aeróbicos. Entretanto, a redução parcial do oxigênio resulta na formação de várias espécies reativas de oxigênio que podem ser prejudiciais a vários componentes celulares (Ando e Fugita, 2009).

A presença de radicais livres em materiais biológicos foi descoberta a menos de cinquenta anos atrás (Commoner, 1954). Logo após esta descoberta Harman (1956) sugeriu que radicais livres pudessem ser gerados a partir de reações catalisadas por enzimas *in vivo*. Ele descreveu os radicais livres como sendo moléculas prejudiciais às células. Mc Cord e Fridovich em 1969 descobriram então a enzima superóxido dismutase (SOD), o que convenceu a maioria dos cientistas que radicais livres exerciam importantes funções na biologia.

Radicais livres, assim como as espécies reativas de oxigênio são pequenas moléculas de meia vida bastante curta (Buonocore e Groenendaal, 2007), que têm um ou mais elétrons desemparelhados e são caracterizados por terem alta reatividade molecular, por isso sequestram elétrons de moléculas vizinhas para se tornarem estáveis (Jones, 2008). O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $HO\cdot$ ) formam o grupo das ERO mais importante (Figura 3). Das três formas, a mais reativa é o radical hidroxil (Jones, 2008). Cerca de 1 a 4% de todo o oxigênio consumido pelas células são transformados em ânion superóxido a partir do "vazamento" ocorrido da cadeia respiratória, principalmente dos agentes redutores presentes nesta região, como é o caso da semiubiquinona. O ânion superóxido é formado pela redução monovalente do oxigênio molecular. Atividades de enzimas solúveis como as xantino-oxidases e das NAD e NADP-oxidases presentes na membrana de células fagocitárias do sangue são também outras fontes importantes de formação de ânion superóxido (Hermes-Lima e col., 2001). O ânion superóxido é convertido através da enzima SOD (Fridovich, 1978), que é dependente de cobre e zinco nos procariotos, em peróxido de hidrogênio. Em tecidos biológicos o ânion superóxido também pode ser convertido não enzimaticamente em outras espécies de oxigênio não reativas ou na forma de oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) (Steinback e col., 1993). O  $H_2O_2$  não é um radical livre propriamente dito, mas é classificado como tal, pois pode se difundir facilmente por qualquer compartimento e estrutura celular. Na

presença de metais de transição na forma reduzida, o peróxido de hidrogênio pode se transformar em radical hidroxil (Chance, 1979), a ERO com maior potencial reativo. O peróxido de hidrogênio também pode ser convertido em água por enzimas como a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPX). Várias espécies reativas de oxigênio são formadas e estão presentes ao mesmo tempo na célula, sendo difícil dizer qual delas é responsável pela intensidade do efeito bioquímico provocado.



**Figura 3.** Formação das principais espécies reativas de oxigênio (ERO).

Muitas ERO são formadas a partir de reações enzimáticas como da xantina oxidase, NADPH oxidases, citocromo P-450 oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases e superóxido dismutase. A auto-oxidação das catecolaminas e a síntese de prostaglandinas também contribuem para a formação de ERO (Manolescu, 2009). Entretanto, o principal local de produção de ERO são as mitocôndrias. Essa alta produção acontece quando moléculas de oxigênio presentes na mitocôndria reagem com elétrons que escapam da cadeia respiratória, principalmente dos complexos II e III (Turrens, 2003). Variações nos níveis de oxigênio disponíveis para o organismo vivo, e consequentemente, para a mitocôndria, podem aumentar a perda de elétrons na cadeia respiratória, contribuindo para uma maior formação das ERO (Ježek e Hlavatá, 2005). Sabe-se que hipoxia está associada a um aumento de

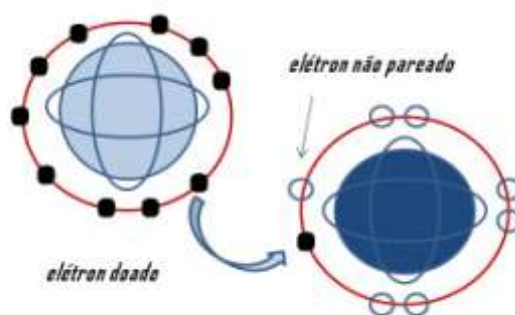


produção de ERO (Pialoux e col., 2009) e que o complexo III é a principal fonte de formação de ERO durante a hipoxia (Bell e col., 2007). Radiação ionizante e biotransformação de xenobióticos também são outras fontes importantes de formação de ERO.

Um desequilíbrio entre a taxa de formação de moléculas oxidantes e a de moléculas antioxidantes presentes no organismo provoca um estado de estresse na célula, conhecido por estresse oxidante (Ma, 2009). O estresse oxidante é caracterizado pelo aumento de ERO, podendo gerar morte celular se não for rapidamente neutralizado. Já é bem sabido que o estresse oxidante é provocado por processos fisiológicos, patofisiológicos e por processos endógenos ou exógenos que afetam diretamente ou indiretamente o balanço redox do organismo (Ma, 2009). Metais pesados, como o cádmio e cromo, induzem estresse oxidante de várias maneiras, causando danos à respiração mitocondrial, aumentando a produção de ERO a partir da reação de Fenton, da peroxidação lipídica e da diminuição da quantidade de antioxidantes intracelulares, como por exemplo da glutathiona (GSH) (Hee e col., 2008, 2007).

O estresse oxidante é uma faca de dois gumes. As ERO são essenciais para as células porque funcionam como sinalizadores celulares estimulando a ativação da guanilato ciclase e formação do segundo mensageiro cGMP (Mittal e Murad, 1977). Elas também participam de processos imunológicos relacionados às células T (Roth e Droge, 1987) e da ativação de certos genes (Schreck e Baeuerle, 1991). Muitas vezes uma concentração de ERO elevada se torna necessário a fim de estimular a proliferação e remoção de moléculas que já não cumprem com sua função na célula. Por outro lado, estresse oxidante por longo prazo danifica estruturas e funções de moléculas e tecidos (Ma, 2009). O ideal para a homeostase celular é que a célula consiga manter um equilíbrio entre a taxa de formação e a taxa de degradação das ERO. Para isso é preciso que diversas moléculas atuem como antioxidantes celulares. Existem dois grupos de antioxidantes: os enzimáticos e os não enzimáticos. Dentre os enzimáticos podemos citar as glutathiona peroxidases (GPX), as superóxido dismutases (SOD), a catalase (CAT) e as glutathiona S-transferases (GST), que são fundamentais para neutralizar as espécies reativas de oxigênio. Dentre os antioxidantes não enzimáticos podemos mencionar a melatonina,

que é o antioxidante mais conservado durante a evolução e o mais potente, mas também a glutathiona reduzida (GSH), o ácido ascórbico (vit. C), os tocoferóis e os tocotrienóis (vit. E) (Lushchak e col., 2001). Já foi observado que os níveis e atividades das enzimas antioxidantes podem aumentar à medida que as espécies reativas de oxigênio aumentam (Lushchak e Bagnyukova, 2006a).

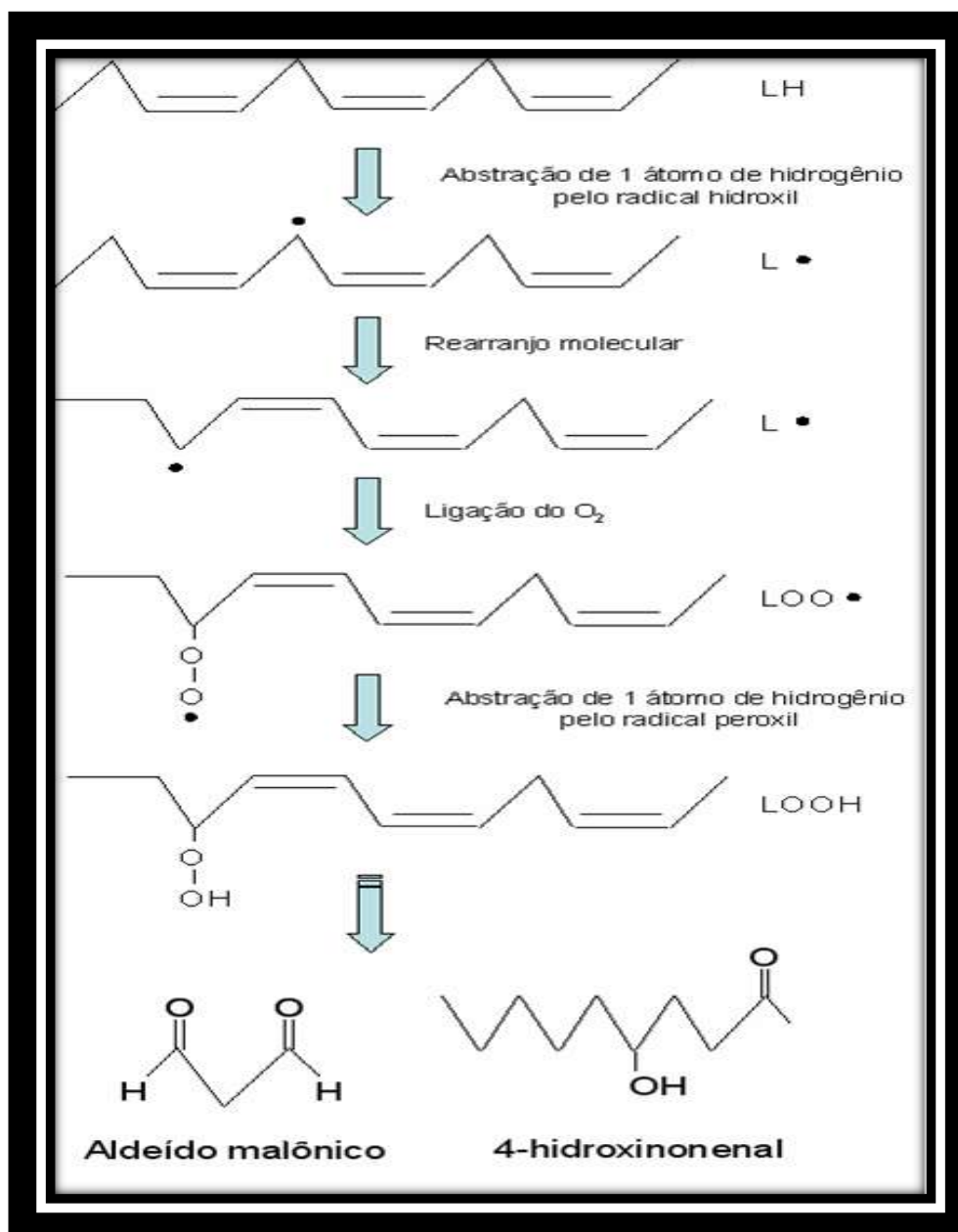


**Figura 4.** Radical sendo neutralizado por um antioxidante.

As consequências do estresse oxidante incluem modificações de proteínas, lipídios e DNA. Algumas proteínas podem sofrer oxidação e modificações covalentes reversíveis e irreversíveis em seus aminoácidos (Ghezzi e Bonetto, 2003), modificando-os em grupos aldeídos ou cetônicos. Este processo é denominado de carbonilação de proteína. Isto é extremamente prejudicial para as proteínas, pois causa agregação, inativação e sua degradação (Levine e col., 1990; Costa e col., 2002). Estes eventos já foram estudados em culturas de trigo, e em células e tecidos de mamíferos (Costa e col., 2002; Van Der Vlies e col., 2002; Rabek e col., 2003). Sabe-se que a exposição de mexilhão ao cobre causa carbonilação de proteínas em sua glândula digestiva (Kirchin e col., 1992). Irradiação também provoca

carbonilação de proteína em *M. edulis* e *Dosinia lupinus*, que são duas espécies de bivalves marinhos (Walker, 2000). O aumento dos níveis de ERO na célula, causado por uma condição de estresse oxidante, como por exemplo em processo de isquemia seguido de reperfusão, como acontece no caso de infartos, pode aumentar bastante a carbonilação de proteínas, acarretando danos irreversíveis para a célula, tecido ou órgão.

O radical hidroxil é o principal responsável pelo dano oxidante ao DNA das células. Ele altera as bases de purina, pirimidina e o açúcar desoxirribose. Devido à proximidade da área em que as ERO são formadas e a capacidade limitada de reparação, o DNA mitocondrial se mostra mais sensível aos danos oxidantes que o DNA nuclear. Mitocôndria danificada gera cada vez mais ERO, que por sua vez danificam ainda mais a mitocôndria, aumentando cada vez mais os danos ao DNA. Este ciclo vicioso pode explicar em parte porque o estresse oxidante é comumente associado a doenças crônicas como neurodegeneração, inflamações crônicas e vários tipos de câncer (Ma, 2009). Modificação lipídica causada por ERO resulta em peroxidação de lipídios, principalmente dos ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídios da membrana, alterando a fluidez da mesma (Catalã, 2009). Este processo de peroxidação é propagado ao longo da membrana e, se não for interrompido, pode culminar com a fragmentação do lipídio em aldeídos, em especial o aldeído malônico (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Wheatley, 2000).



**Figura 5.** Etapas de oxidação de ácidos graxos a aldeídos.

#### 1.4. 4-hidroxinonenal

O 4-hidroxinonenal (4-HNE) é o principal produto da fragmentação de lipídios de membrana e lipoproteínas (Figura 5) (Völkel e col., 2005). Esta fragmentação, especificamente, é causada pelo ataque das ERO (Weigel e col., 2002) aos ácidos graxos insaturados ômega 3, como o ácido alfa-

linolênico e o ácido eicosapentanóico, e ômega 6, como o ácido linoleico e o ácido araquidônico. (Esterbauer e col., 1991). O 4-HNE tem alta atividade biológica e causa redução nos níveis de GSH, indução de ERO e aumento do óxido nítrico (NO) (Lee e col., 2004; Awasthi e col., 2004). Em altas concentrações provoca efeitos citotóxicos, mutagênicos, hepatotóxicos e genotóxicos (Awasthi e col., 2003 e 2004), contribuindo para vários efeitos deletérios do estresse oxidante (Negre-Salvayre e col. 2008, Esterbauer e col., 1991). Sabe-se também que em concentrações acima de 100  $\mu\text{M}$  o 4-HNE inibe inúmeras funções biológicas, como síntese de proteínas e de DNA, atividade do citocromo P-450 e a atividade da glicose 6-fosfatase (Lamé e Segall, 1987). O 4-HNE também pode influir na patogenia de doenças degenerativas como a aterosclerose, o câncer e a doença de Alzheimer (Awasthi e col., 2004). Prova disso, é que na doença de Alzheimer, no diabetes e na aterosclerose, os níveis de 4-hidroxinonenal estão aumentados (Poli e col., 2008a). Níveis baixos de 4-HNE são considerados fisiológicos para as células porque regulam a apoptose, a diferenciação celular, o crescimento celular e várias vias de transdução de sinais (Awasthi e col., 2003) como por exemplo a ativação da adenilato ciclase (Awasthi e col., 2004). Alguns destes estudos sugerem que o 4-HNE está diretamente associado a eventos de sinalização e controle do ciclo celular e que estes eventos dependem da concentração de 4-HNE, evidenciando que concentração baixa de 4-HNE intracelular é crucial para o funcionamento correto e programado das células (Awasthi e col., 2004, 2005). Estudos mostram que os níveis plasmáticos de 4-HNE, assim como também em órgãos como o fígado, variam bastante nos animais em condições de estresse oxidante (Awasthi e col., 2004). Os níveis normais fisiológicos de 4-HNE nos tecidos estudados variam de aproximadamente 0,1 - 0,2 mM e podem aumentar para 10 mM a 5 mM em condições de estresse oxidante (Awasthi e col., 2004). Medições dos níveis de 4-HNE intracelular são difíceis devido ao seu alto poder reacional com outras moléculas e em geral não refletem a sua exata concentração e toxicidade.

Atualmente o 4-HNE é ferramenta biomarcadora de estresse oxidante nas células (Poli e col., 2008b). Dados mostram um crescimento cada vez maior de estudos na área de patofisiologia utilizando-se do 4-HNE como

biomarcador oxidante de órgãos do sistema gastrointestinal, sistema nervoso central, cardiovascular, respiratório e até mesmo urinário (Zarkovic e col., 2003).

Estudos *in vitro* mostraram que o 4-HNE pode ser rapidamente biotransformado através de pelo menos três vias diferentes (Laurent e col., 2000). A primeira via é através da formação do álcool 1,4-dihidroxinonol (1,4-DHN), catalisada pelas álcool desidrogenases (Siems e Grune, 2003). A outra forma é a conversão deste aldeído no seu correspondente ácido carboxílico, o 4-hidroxi-2-nonenóico (4-HNA), catalisada pelas aldeído desidrogenases (Siems e Grune, 2003). A terceira e última via da biotransformação do 4-HNE é a conjugação com a glutathiona reduzida realizada pelas glutathiona S-transferases (GST) (Parvez e col., 2004; Leiers e col., 2003; Siems e Grune, 2003). Neste caso o HNE-GSH é posteriormente transformado em metabólito polar como álcool ou ácido carboxílico e passa por uma série de reações até ser excretado como ácido mercaptúrico.

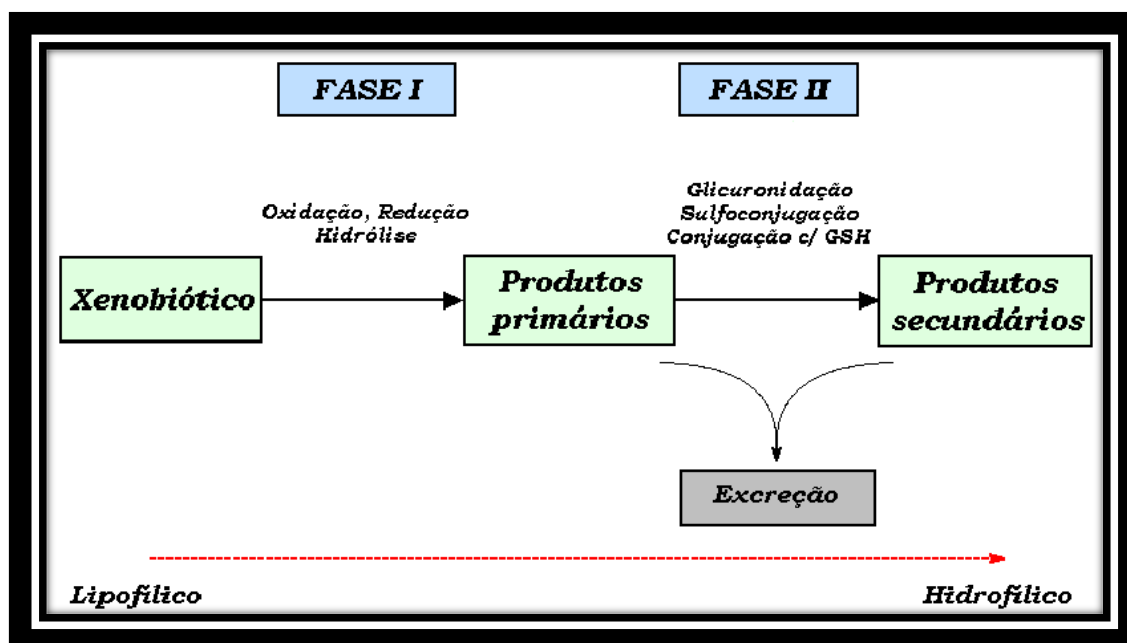
### **1.5. Biotransformação**

Lagoas, rios, oceanos e estuários recebem efluentes não tratados oriundos de despejos urbanos e industriais, deposição atmosférica e drenagem de substâncias do solo. Isto pode diminuir a oxigenação da água. Depois de lançadas no ambiente as substâncias tóxicas de caráter lipossolúvel se acumulam nos animais à medida que um se alimenta do outro – fenômeno chamado de biomagnificação trófica – pois interagem com as moléculas de lipídios das biomembranas e não podem ser prontamente excretados dos organismos. Essas substâncias estranhas e nocivas ao organismo são denominadas xenobióticos.

Os xenobióticos sofrem biotransformação por enzimas presentes nos rins, no pulmão, no trato gastrintestinal, na mucosa nasal e no fígado. Dentre

estes tecidos, o fígado é o principal responsável pelo metabolismo de biotransformação, pois os hepatócitos são capazes de remover os xenobióticos e os endobióticos do sangue com alta eficiência (Klassen e col., 1996; Hayes e Pulford, 1995).

A biotransformação pode ser mais bem compreendida se estudada em dois grupos de reações; reações da fase I e de fase II da biotransformação (Figura 6). Na fase I ocorrem as reações de redução, de hidrólise e de oxidação. Estas reações são responsáveis por expor ou introduzir grupamentos químicos funcionais nas moléculas do xenobiótico acarretando um aumento da sua polaridade, o que pode levar à perda do seu potencial tóxico e sua excreção, resultando em desintoxicação. Os metabolitos resultantes do metabolismo na fase I podem sofrer biotransformação desintoxicante propriamente dita na fase II. Etapas frequentes da fase II são as reações de conjugação catalisadas pelas sulfotransferases (ST), glicuronosiltransferases (UGT) e pelas glutathione S-transferases (GST), as quais promovem a conjugação de uma variedade de moléculas tóxicas com moléculas endógenas. Os conjugados, mais solúveis e na maior parte das vezes inativos, são excretados. As GST conjugam as substâncias tóxicas com a glutathione (GSH), o conjugado é excretado na bile ou transformado até ácido mercaptúrico, que é eliminado na urina (Habig e col., 1974).



**Figura 6.** Sistema de biotransformação de xenobióticos.

## 1.6. Glutathione S-transferases (GST)

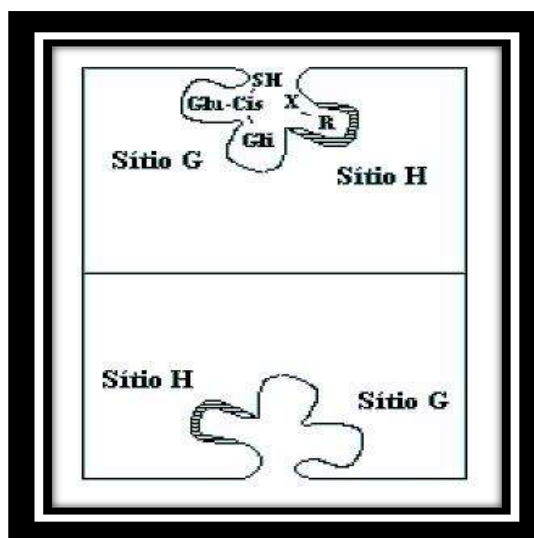
As enzimas glutathione S-transferases (EC 2.5.1.18) foram descobertas por Booth e seus colegas no início dos anos sessenta. Na década de oitenta, graças aos trabalhos de pesquisadores como Douglas (1987) e Mannervik (1988), elas ficaram conhecidas como enzimas desintoxicantes de endo e xenobióticos. Além disso, as GST estão intimamente envolvidas na regulação de importantes vias metabólicas (Dourado e col., 2009; Hayes e col., 2005), na biossíntese de leucotrienos, prostaglandinas e testosterona, na degradação da tirosina e no aumento da expressão gênica em que intervém o complexo proteico nuclear de transcrição kB (NF-kB) (Hayes e col., 2005). Estão também relacionadas a doenças, como Parkinson (Li e col., 2003), Alzheimer (Li e col., 2003; Sultana e Butterfield, 2004; Lovell e col., 1998), aterosclerose (Brasen e col., 2003), diabetes (Raza e col., 2004) cirrose hepática (Czeczot e col., 2006), envelhecimento (Sandhu e Kaur, 2002) e formação de catarata (Ansari e col., 1996). Trabalhos mais recentes mostram um importante papel das GST na regulação dos produtos originados do estresse oxidante, como por exemplo, o 4-HNE (Parvez e col., 2004).

As enzimas GST têm massa molecular aproximada de 50.000 dáltons, sendo formadas por uma grande família de vários genes (Pham e col., 2002). As citosólicas são solúveis (Ladner e col., 2004) e com estrutura e função bastante similares. As microsossomais são conhecidas por estarem associadas aos eicosanoides das membranas (MPEG) (Jakobsson, 1999), sendo que estas não aparentam nenhuma similaridade estrutural com as GST solúveis (Holm e col., 2002). As GST apresentam atividade de conjugação e apresentam atividade peroxidásica (Hayes e col., 2005). A maior parte das GST está presente no citosol (95%), enquanto apenas 5% estão aderidas às membranas (Hurst e col., 1998; Hayes e col., 2005).

As GST citosólicas são compostas por dois polipeptídios iguais (homodímeros) ou diferentes (heterodímeros). Cada subunidade da GST possui atividade catalítica, sendo que cada subunidade contém um sítio, chamado de sítio G, que corresponde ao sítio de ligação do GSH, e um sítio H, correspondente ao sítio de ligação do substrato a ser metabolizado (Figura 7)



(Dourado e col., 2009; Hayes e Pulford, 1995; Mannervik, 1985). O mecanismo de ação enzimática da GST envolve a retirada de um próton do GSH por uma tirosina do sítio catalítico, transformando o GSH em  $\text{GS}^-$ . As reações de conjugação ocorrem por reações de substituição, quando o  $\text{GS}^-$  desloca o grupo eletronegativo ou por reações de adição, quando o  $\text{GS}^-$  é adicionado a uma dupla ligação ou a uma estrutura cíclica.



**Figura 7.** Esquema mostrando os sítios G e H das GST.

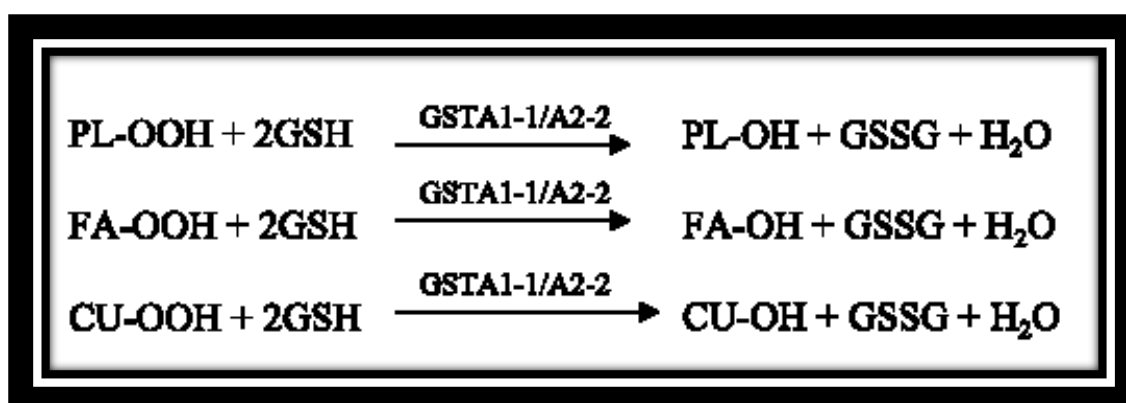
O tripetídeo glutathiona, substrato endógeno da glutathiona S-transferase, é formado por três aminoácidos: o ácido  $\gamma$ -glutâmico, a cisteína e a glicina (Figura 8). Já os substratos (xeno ou endobióticos) que poderão reagir com o GSH possuem como característica um átomo eletrofílico, serem hidrofóbicos e reagirem não enzimaticamente com o GSH.



variar bastante, servindo como uma boa ferramenta de biomarcação ambiental (Martinez-Lara e col., 1996; Otto e Moon, 1996).

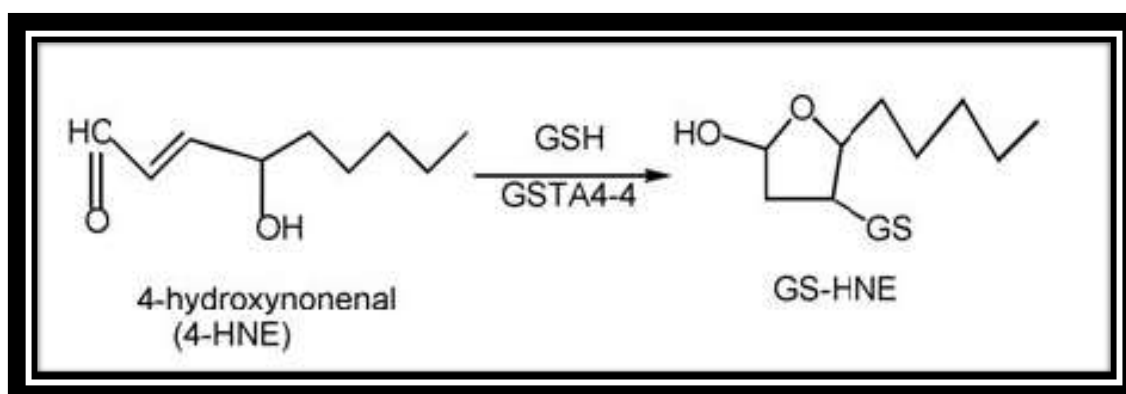
Algumas classes de GST, assim como as glutathione peroxidases (GPX), apresentam atividade de peroxidase, mas não usam  $H_2O_2$  como substrato e independem de selênio. As GST da classe alfa, como as GSTA1-1, GSTA2-2, GST 5.8 e GST 4-4 têm grande atividade peroxidásica e podem reduzir eficientemente os níveis de hidroperóxidos de ácidos graxos (FA-OOH) e hidroperóxidos de fosfolipídios (PL-OOH) presentes nas células, sendo ainda capazes de reduzir também hidroperóxidos orgânicos não fisiológicos, tais como o hidroperóxido de cumeno (CHP) (Figura 9) (Awasthi e col., 2004). Estudos mostram que exposição a substâncias pró-oxidantes aumentaram a expressão das GST em micróbios, plantas, moscas, peixes e mamíferos (Leiers e col., 2003), dando-nos evidências de que as GST são ferramentas essenciais no combate contra agentes oxidantes, a fim de manter os níveis normais de ERO no organismo, assegurando assim a homeostase e um correto funcionamento celular.

No fígado, um órgão metabolicamente ativo que sofre constantemente com os efeitos provocados pelas ERO, as GST são cerca de 3-5% do total das proteínas solúveis, sendo que a maior parte delas é da classe alfa (Awasthi e col., 2004).



**Figura 9.** Atividade de peroxidase de GST sobre hidroperóxidos de lipídeos. Os hidroperóxidos de lipídeos são reduzidos aos álcoois correspondentes gerando glutathione oxidada (GSSG) e água como produtos. PL-OOH é hidroperóxido de fosfolipídio, FA-OOH corresponde a hidroperóxido de ácido graxo e CU-OOH a hidroperóxido de cumeno.

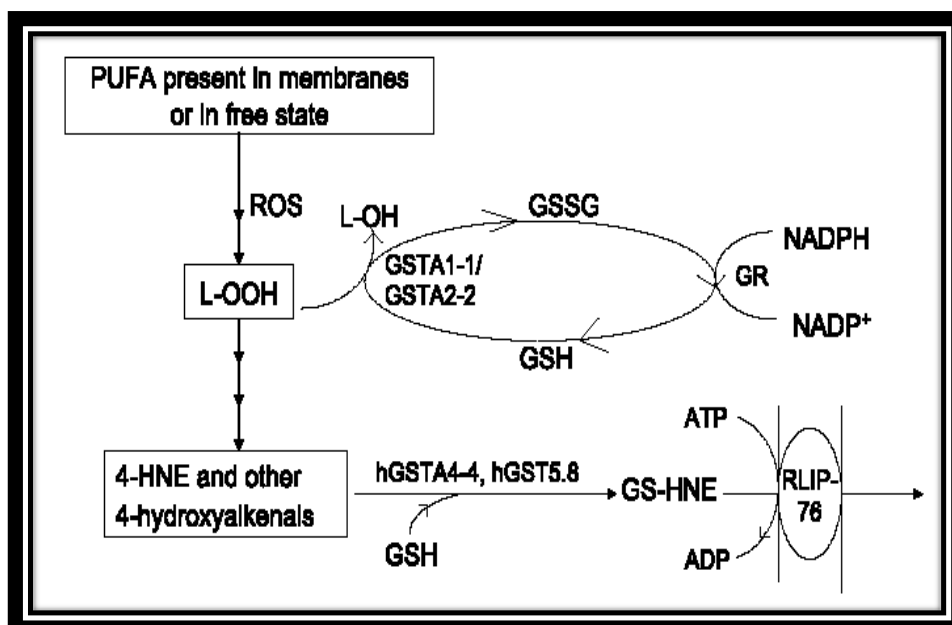
As isoenzimas da classe alfa, além da atividade peroxidásica, também são capazes de conjugar alguns peróxidos orgânicos, protegendo o organismo do estresse oxidante (Parvez e col., 2004; Sharma e col, 2004b; Leiers e col., 2003). Logo, os níveis de 4-HNE na célula podem ser regulados pelas GST que são capazes por atividade peroxidásica de diminuir a sua formação, ou, por atividade de transferase, conjugá-lo com glutathiona. Embora o 4-HNE seja suficientemente eletrofílico para reagir espontaneamente com o GSH, a GST acelera cerca de 600 vezes a velocidade de conjugação (Siems e Grune, 2004), ajudando a manter o 4-HNE em níveis adequados para a célula. O acelerado processo de conjugação do 4-HNE com o GSH reduz rapidamente o GSH celular (Siems e Grune, 2004).



**Figura 10.** Conjugação do 4-HNE com o substrato endógeno GSH catalisada pela isoenzima de GST 4-4.

O conjugado de HNE (GS-HNE) (Figura 10) é eliminado através de transporte dependente de ATP realizado pela RLIP76 (Figura 11) (Cheng e col., 2001). Já é admitido que o principal papel das GST alfa deva ser o controle do nível intracelular de HNE, já que altas concentrações podem levar a célula à apoptose (Yang e col., 2003). Estudos mostram que células tratadas com hidroperóxido de fosfolípídios, luz ultravioleta ou  $H_2O_2$ , não entram em apoptose se previamente tiverem sido transfectadas com GST que metabolizam 4-HNE, e que os níveis dos aldeídos 4-HNE e malônico (MDA) nestas células são extremamente baixos (Sharma e col., 2004a), o que

evidência que a sinalização induzida por 4-HNE ou por outros agentes como  $H_2O_2$ , luz ionizante e xenobióticos à apoptose pode ser modulada por alteração da expressão de GST (Awasthi e col., 2004).



**Figura 11.** Papel das GST na atenuação da peroxidação de lipídeos. Peroxidação de PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) é iniciada por ERO e geram lipoperóxidos que podem automaticamente propagar a peroxidação.

Apesar da GST alfa contribuir significativamente para a atividade sobre o 4-HNE e corresponder a cerca de 90% da atividade total de GST hepática humana, outras isoenzimas de GST, como a mi e a pi, também são importantes, visto que camundongos *knockout* para isoenzimas alfa ainda detêm cerca de 40% da atividade de conjugação (Awasthi e col., 2004). Estes achados indicam que a indução das GST não só da classe alfa mas também de outras classes são uma resposta bem conservada e evolutiva das células frente ao estresse oxidante (Dourado e col., 2009; Hayes e col., 2004).

As GST trabalhando em conjunto nas suas variadas funções formam uma rede de defesa e contribuem para resistência contra carcinógenos, drogas antitumorais, poluição ambiental e produtos do estresse oxidante, ou mesmo

ligando covalentemente em sua estrutura alguns hormônios, o que atenua a ação deles no organismo (Dourado e col., 2009; Völkel e col., 2006; Hayes e col., 2005; Hamilton e col., 2003; Lien e col., 2002).

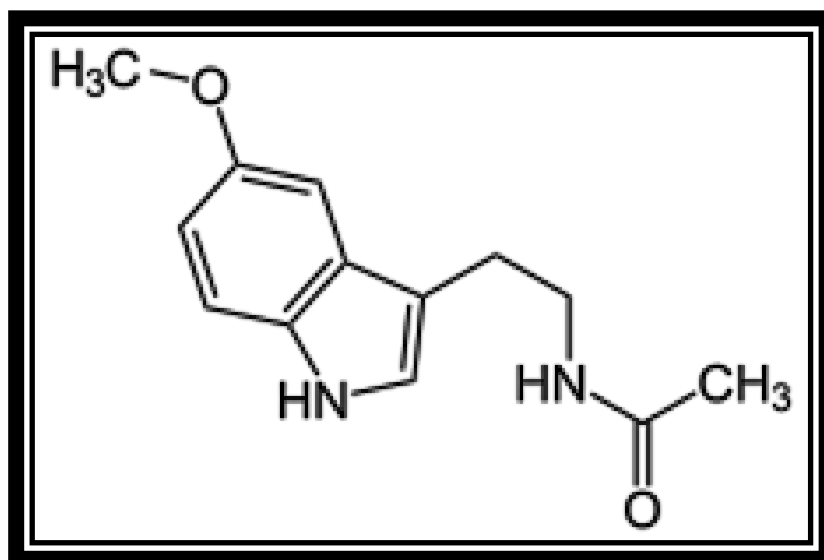
## 1.7. Melatonina

Com o passar do tempo e o aumento da quantidade dos seres vivos nos ambientes aquáticos, a competição por comida e por nichos ecológicos deve ter forçado alguns destes seres, para evitar a competição, a “tentar” a buscar melhores condições nos ambientes terrestres. Assim como o ambiente aquático, o ambiente terrestre impunha condições próprias para o ciclo de vida dos animais. O alto teor de oxigênio presente na atmosfera, que implicava provavelmente numa maior formação de quantidades intracelulares de espécies reativas de oxigênio, bem como a escassez de água, foram algumas das condições primordiais às quais os seres que deixaram o meio aquoso tiveram de se adaptar. Sendo assim, adaptações histológicas, fisiológicas e bioquímicas forçosamente aconteceram. Pode ser que a melatonina seja uma molécula ancestral e provavelmente o antioxidante mais antigo que tenha servido para a adaptação à vida terrestre.

Em 1958 a melatonina foi isolada da pineal de bovinos e caracterizada pelo dermatologista Aaron Lerner. Foi primeiramente descrita como sendo uma molécula que atuava sobre os melanócitos, que são células ricas em melanina, envolvidas com o clareamento da pele de sapos, serpentes, tartarugas, lagartos e peixes (Lerner e col., 1958; Claustrat e col., 2005). Mesmo que não participe da síntese da melanina, a melatonina é um conhecido hormônio antagonista do hormônio estimulante dos melanócitos (MSH). Enquanto o MSH dispersa os grânulos de pigmentos, a melatonina leva ao clareamento da pele ao causar a agregação deles (Beyer e col., 1998).

A molécula da melatonina, uma indolamina também denominada N-acetyl-5-metoxytriptamina (Figura 12) tem uma característica anfipática, o que permite a sua entrada em qualquer célula, compartimento, ou fluido corporal

(Poeggeler e col., 2002). Já que a melatonina consegue atravessar até mesmo a barreira hematoencefálica e nenhuma melatonina é estocada, as concentrações desse hormônio no plasma refletem aquelas presentes na pineal (Claustrat e col., 2005).



**Figura 12.** Molécula da N-acetyl-5-metoxytryptamina ou melatonina.

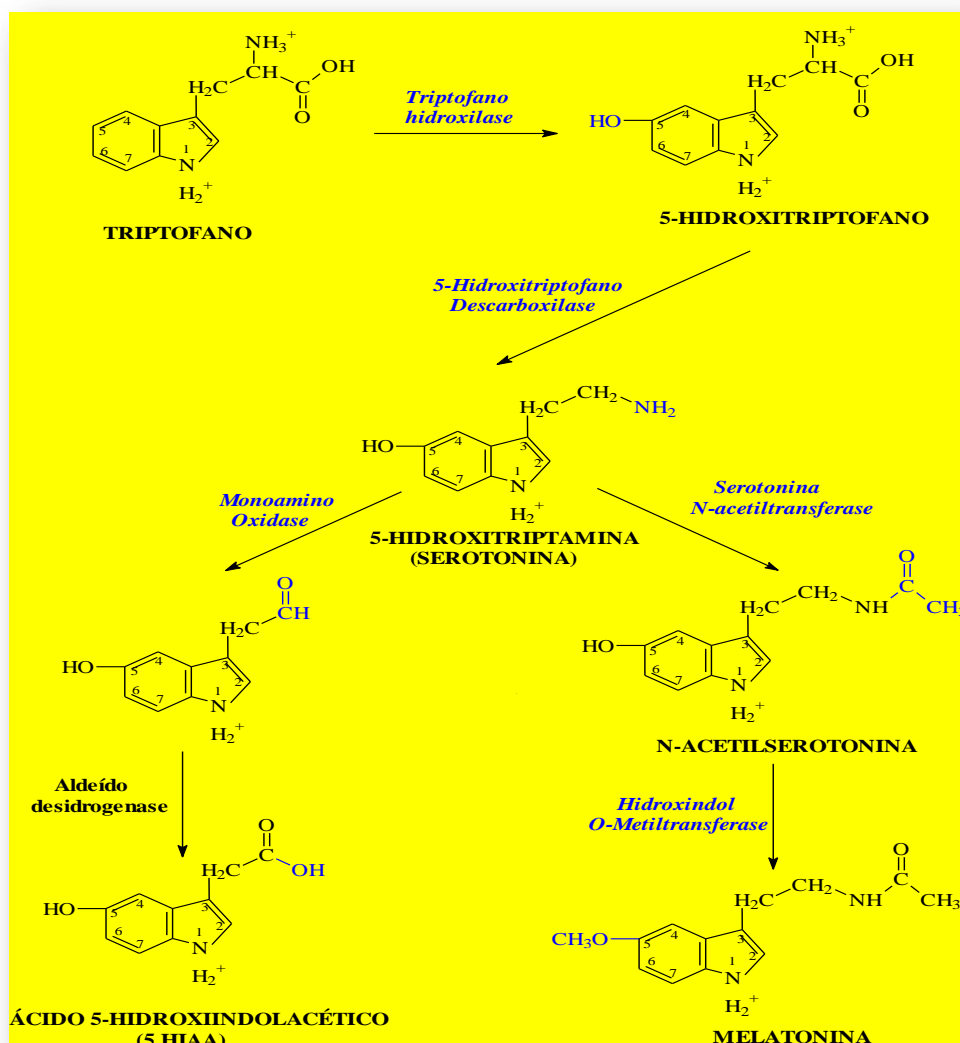
A melatonina é sintetizada principalmente pela glândula pineal no sistema nervoso central (SNC). Nos animais a glândula pineal é conhecida por ser um transdutor neuroendócrino de informações vindas do ambiente. Na maioria dos animais a glândula pineal é uma vesícula que está fragilmente ligada ao "teto" do diencéfalo. Esta vesícula é formada por um epitélio pseudoestratificado e apresenta células fotorreceptoras cônicas que mantêm contato com o fluido cérebro-espinhal na sua porção apical. As células fotorreceptoras da pineal estabelecem contatos sinápticos com neurônios de segunda ordem que enviam seus axônios para o cérebro. Em mamíferos a pineal está subordinada ao eixo sistema nervoso central - olho. Muitos estudos relatam a similaridade de células fotorreceptoras destes dois órgãos, retina e pineal (Falcón e col., 2007b; Falcón, 1999). Em répteis e pássaros, a pineal também está relacionada à pele. O fígado, a retina, a pele, os intestinos, as plaquetas, os leucócitos, a medula óssea e possivelmente outros tecidos também são fontes secundárias de melatonina (Pandi-Perumal e col., 2006).

Além de ser encontrada nos vertebrados e invertebrados, a melatonina também pode ser encontrada em protozoários, fungos, sementes, folhas e frutos (Pandi-Perumal e col., 2006). Alguns trabalhos que extraíram melatonina de folhas e sementes de diferentes plantas verificaram que a concentração era muitas vezes mais elevada que as concentrações encontradas no plasma humano durante a noite. É interessante mencionar que as ervas utilizadas pela medicina chinesa para tratar doenças relacionadas a radicais livres e retardamento do envelhecimento são ervas que possuem altos níveis de melatonina (Pandi-Perumal e col., 2006).

A via de biossíntese da melatonina é parecida em todos os organismos ou tipos celulares testados. Esta via consiste em hidroxilação do triptofano seguida de descarboxilação, N-acetilação e O-metilação, nesta sequência (Falcón e col., 2009) (Figura 13). A melatonina pode ser formada em menor escala pela O-metilação da serotonina seguida de N-acetilação da 5-metoxitriptamina, ou também pela metilação do triptofano, seguida de descarboxilação e N-acetilação (Falcón e col., 2009; Sprenger e col., 1999).

Na pineal de mamíferos, a etapa limitante para a formação de melatonina é normalmente a N-acetilação, catalisada pela serotonina N-acetiltransferase (SNAT). Nos olhos de anfíbios a hidroxilação do triptofano é outra etapa limitante para a formação da melatonina. Outro aspecto interessante é que os níveis de melatonina presentes no sangue e no fluido cérebro-espinhal são mais elevados durante a noite e mais baixos durante o dia (Falcón e col., 2009; Reiter, 1993) e que esta variação corresponde à variação circadiana que também ocorre com as atividades das enzimas serotonina N-acetiltransferase (SNAT) e da hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT). Existem evidências de que os níveis de melatonina decrescem com o aumento da idade em mamíferos, incluindo o homem (Reiter, 1998; Poeggeler e col., 1993; Sack e col., 1986). Isto é uma das sugestões para a causa do processo de envelhecimento (Mauriz, 2007), pois com a queda da melatonina os distúrbios do apetite, da locomoção, o aumento de espécies reativas de oxigênio, as mudanças hormonais e os distúrbios do sono podem começar a acontecer.





**Figura 13.** Biossíntese da melatonina.

O controle do nível de atividade das enzimas de síntese e degradação da melatonina e, conseqüentemente, da quantidade de melatonina circulante tem origem numa região do hipotálamo chamada de núcleo supraquiasmático. Esta região cerebral é o “marcapasso” circadiano do nosso organismo.

Durante a noite, devido à grande diminuição de luz que chega à retina, ocorre a liberação de noradrenalina do núcleo supraquiasmático. Este hormônio se liga a receptores alfa e beta adrenérgicos ativando a adenilato ciclase dos pinealócitos promovendo um aumento de entrada de cálcio na

célula e um aumento e acúmulo de AMP cíclico (cAMP), que por sua vez aumentará a fosforilação e a síntese da enzima SNAT, aumentando assim os níveis de melatonina durante a noite (Claustrat e col., 2005; Falcón e col., 1999). Durante o dia, a luz inibe a liberação de noradrenalina e a atividade da SNAT, conseqüentemente, o aparecimento de melatonina (Falcón e col., 1999). A principal função da melatonina é relacionar a informação claro-escuro, vinda do ambiente, às funções fisiológicas do indivíduo, de acordo com seus níveis na corrente sanguínea (Claustrat e col., 2005). Outras diversas funções fisiológicas do organismo tais como a modulação biológica do humor, do sono, da fisiologia da retina, do comportamento sexual, da fisiologia e do comportamento sazonal-reprodutivo, do ritmo circadiano e de funções imunológicas envolvem melatonina ou os produtos gerados a partir de sua degradação, como é o caso dos metabólitos N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N-acetil-5-metoxiquinuramida (AMK) que foram descritos como muito importantes para neutralizar radicais hidroxil (Tan e col., 2001; Manda e col., 2007; Schaefer e Hardeland, 2009).

Em mamíferos, já foi bem estabelecido que a melatonina possui função fisiológica transferidora dos efeitos fotoperiódicos para a reprodução (Bittman e col., 1983) e que ela influi na regulação dos ritmos sazonais de termorregulação e hibernação (Mayer e col., 1997). A melatonina também pode influir na regulação da massa corporal e da quantidade de gordura visceral dos mamíferos. Com o passar da idade os níveis de melatonina diminuem e a quantidade de gordura visceral aumenta. Em algumas espécies os níveis de melatonina parecem ser dirigidos pelas mudanças sazonais. Na verdade, nestas espécies, os ritmos anuais são endógenos e estão sincronizados com as mudanças ambientais, o que faz com que os níveis de melatonina sejam maiores no verão do que no inverno (Waldhauser e col., 1985; Klvela e col., 1988; Touitou e col., 1984).

Uma área crescente de estudo diz respeito ao efeito protetor da melatonina contra os agentes oxidantes. O fato de a melatonina ter grande capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxil, ânion superóxido, hidroperóxidos e radicais de lipídios peroxidados (Poeggeler e col., 1993) estimulou inúmeras pesquisas nesta área. Estes estudos demonstraram que a melatonina age com maior eficiência sobre as espécies

reativas de oxigênio do que a maioria das outras moléculas antioxidantes, incluindo as vitaminas C e E (Poeggeler e col, 1993). A melatonina combate as espécies reativas de oxigênio basicamente de três maneiras. Ela pode doar um elétron de sua molécula para o radical livre, ou capturar o radical livre para ela, como já foi demonstrado em inúmeras culturas celulares e em sistemas vivos (Hardeland, 2005; Srinivasan e col., 2005; Poeggeler e col., 2002; Hardeland e Fuhrberg, 1996). A terceira forma de combater os radicais livres é fundamental para a célula, pois estudos mostram que a melatonina promove o aumento da atividade de certas enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase, a glutathiona redutase, a glicose-6-fosfato desidrogenase e a superóxido dismutase, e também contribui para a diminuição da atividade de enzimas pró-oxidantes, como a óxido nítrico sintetase e as lipoxigenases (Hardland, 2005). Já foi demonstrado que a melatonina aumenta a expressão de mRNA de enzimas antioxidantes (Srinivasan, 2005). Quando espécies reativas de oxigênio aumentam de concentração na célula, o I-kB (inibidor do NF-kB) é liberado e o NF-kB, agora livre de inibição, pode ser transportado para o núcleo, lugar em que se liga ao seu elemento de resposta, localizado em regiões promotoras dos genes da maioria das enzimas antioxidantes. Um fator de transcrição nuclear (ROR) é responsável por manter os níveis normais de síntese de I-kB (Delerive e col., 2001). Aumento de I-kB implica em diminuição de translocação do NF-kB para o núcleo, diminuindo a síntese das enzimas antioxidantes. Artigos mais recentes mostram que a melatonina pode interferir na via do ROR e é justamente através de dois principais mecanismos que a melatonina controla o aumento dessas enzimas (Falcón 2009). O primeiro mecanismo ocorre quando a melatonina se liga diretamente a calmodulina presente na célula, inativando as quinases dependentes de calmodulina, acarretando uma diminuição da atividade de transcrição do ROR. A diminuição dessa atividade, por sua vez, vai reprimir o gene do I-kB e diminuir a sua concentração na célula, permitindo o aumento e a manutenção de NF-kB funcional (Wu e col., 2004) para que elevadas taxas de enzimas antioxidantes sejam sintetizadas continuamente. O segundo mecanismo é mais direto e ocorre através da inibição da atividade constitutiva ou basal do ROR pelo receptor de melatonina presente na membrana da célula, o que provocará os mesmos efeitos sobre o I-kB.

Outra importante ação da melatonina é a neuroproteção. Dados recentes mostraram que a melatonina protege cérebro de coelhos contra os danos oxidantes induzidos por radicais livres por promoção do aumento de enzimas antioxidantes e, especificamente, através da redução dos níveis de peroxidação lipídica (Kerman e col., 2005). Já se sabe que a melatonina melhora o sono, especialmente quando existe distúrbio circadiano. A injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de estreptozotocina, um antibiótico antineoplásico também usado para indução do diabetes experimental, causa alterações nas funções cognitivas, associadas à geração de radicais livres, em cérebro de ratos. Sharma e Gupta (2001) mostraram que a melatonina foi eficaz em reduzir os déficits cognitivos e o estresse oxidativo causado pela injeção i.c.v. de estreptozotocina em ratos.

Tendo em vista que a melatonina apresenta notável poder antioxidante e os seus níveis diminuem com a idade, vários pesquisadores sugeriram que este hormônio exerce papel crucial na gênese de doenças neurodegenerativas. Melhoras em pacientes com Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose e outras doenças neurodegenerativas foram observadas com o uso da melatonina (Snirivasan e col., 2005). Melatonina está sendo receitada frequentemente para promover o sono (James e col., 1990; Folkard e col., 1990; Zisapel, 1990). Ações antioxidantes são observadas em diferentes níveis, incluindo atenuação da formação de radicais livres causados por efeitos antiexcitatórios e anti-inflamatórios (Hardland, 2005). Outros estudos mostram ainda que a melatonina participa de processos relacionados a certas doenças cardíacas, AIDS, diabetes, depressão e câncer (Beyer e col., 1998).

A meia vida da melatonina no soro de mamíferos é de aproximadamente de 30 a 57 minutos (Lane e Mosse, 1984; Mallo e col., 1990). A melatonina circulante pode ser hidroxilada pelos citocromos P-450 (mono-oxigenases) do fígado e transformada em 6-hidroximelatonina, sofrer conjugação e ser excretada como 6-sulfatoximelatonina na urina. Todavia, boa parte da melatonina é catabolizada através da quebra oxidante do anel pirrol (Hirata e col., 1974). Isto pode ser muito importante, pois a maioria da melatonina é liberada via pineal para dentro do fluido espinhal mais do que para o sangue circulante (Tricoire e col., 2002). O produto primário da quebra do anel pirrol, que pode ser também formado por um ataque de radicais livres à melatonina, é

o N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramida (AFMK) (Vijayalaxmi e col., 2004), que perde o radical formil transformando-se em N-acetil-5-metoxiquinuramida (AMK). Nas etapas metabólicas que transformam a melatonina em AFMK, mais de quatro radicais livres podem ser consumidos. AFMK e AMK reagem com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tendo também um papel importante na decomposição destes radicais livres. Esta característica faz da melatonina o mais potente antioxidante não enzimático dentre os já conhecidos (Pandi-Perumal e col., 2006). Reações enzimáticas e pseudoenzimáticas, assim como reações fotocatalíticas também levam a formação de AMFK (Hardeland, 2005). A quebra do anel pirrol constitui 1/3 de toda a melatonina catabolizada (Ferry e col., 2005), podendo ser mais do que isto em certos tecidos. AMK auxilia nas funções metabólicas das mitocôndrias e regula negativamente as ciclooxigenases (Hardeland, 2005).

## **1.8. Melatonina e Peixes**

Embora já se saiba que o crescimento e desenvolvimento larval (Boeuf e Falcón 2001), a pigmentação, a atividade natatória (Vera e col., 2007), o consumo de oxigênio (Falcón e col., 2007a), as respostas imunológicas (Falcón e col., 2009; Pandi-Perumal e col., 2006), a reprodução (Sébert, 2007; Mayer e col., 1997) e a migração de peixes de clima temperado e do ártico são todos controlados por ciclos anuais e sazonais (Falcón e col., 2009), os mecanismos pelos quais a melatonina atua em peixes, e principalmente nos peixes neotropicais, não estão totalmente elucidados. O mecanismo de produção de melatonina nos peixes não é exatamente igual ao mecanismo de produção nos mamíferos e não dependem somente de estímulos de fotorreceptores localizados na retina do peixe, mas também de estruturas sensíveis à luz presentes na própria pineal, órgãos periféricos, em fotorreceptores localizados em regiões profundas do cérebro (Falcón e col., 2009) e em estruturas que controlam o ciclo circadiano presente na região do diencéfalo (Falcón e col., 2007a,b).

Sabe-se também que nos peixes, diferentemente de qualquer outro vertebrado, existem duas enzimas SNAT decorrentes de uma duplicação gênica. A SNAT1, que é expressa principalmente na retina e no cérebro e a SNAT2, que é expressa na pineal (Falcón e col., 2007b). Esta diferença tem diferentes implicações na regulação fótica e na produção de melatonina do peixe (Coon e Klein, 2006) aprimorando as informações referentes a migração e reprodução vindas do ambiente.

Obviamente a evolução dos peixes teleósteos e dos mamíferos seguiu um padrão bastante diferente. Mais estudos são necessários para determinar se a melatonina reflete uma convergência evolutiva entre peixes teleósteos e tetrápodes. A coexistência de diversos ciclos circadianos em peixes faz surgir inúmeras perguntas do real papel e sincronização exercida pela melatonina. Já é bastante aceito que a melatonina tem um papel central nos ritmos diários e fisiológicos em vertebrados e possivelmente ela atua sobre outros hormônios cerebrais e pituitários, mas ainda são necessários inúmeros estudos para elucidar todos os detalhes de sua importância nos teleósteos (Amano e col., 2003).

Os peixes ocupam o topo da cadeia trófica nos ambientes aquáticos e são alimentos de alto valor nutritivo. Sua carne é bastante apreciada e podem ser encontrados facilmente em praticamente todos os rios, lagos e oceanos do planeta. Por terem a capacidade de se adaptar fisiologicamente às condições mais adversas os peixes são considerados animais plásticos. São animais pré-históricos e muitas vezes se utilizam de mecanismos diferentes dos mamíferos para suplantar as dificuldades impostas pelo ambiente. Algumas espécies são bastante tolerantes a condições de anoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia (Lushchak e col., 2006a). Peixes desenvolveram inúmeras adaptações fisiológicas, incluindo diminuição da taxa metabólica, rearranjo de fluxo sanguíneo, principalmente para o cérebro e coração, e outras maneiras de produção eficiente de energia (Nilsson e Renshaw, 2004). Os *Carassius*, um gênero de peixe teleósteo, podem mudar a conformação da guelra para promover aumento da superfície de troca gasosa e excretar etanol e dióxido de carbono como produto final da fermentação de glicose evitando a acidose láctica em condições de hipoxia (Nikinmaa e Rees, 2005; Nilsson e Renshaw, 2004).

Os serrasalmídeos surgiram no neotrópico após a separação da África da América do Sul por volta do Cetáceo Inferior há aproximadamente 100 milhões de anos. As adaptações dos serrasalmídeos às variações bruscas que acontecem no ambiente e aos diversos nichos ecológicos garantiram a sobrevivência do grupo ao longo do tempo.

Pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), (Figura 14) podem ser reconhecidos por ter um corpo bastante achatado lateralmente, com uma série de espinhos abdominais e ventrais. Apresentam dentes molariformes e firmemente presos às mandíbulas que são usados primordialmente para triturar frutas e sementes. Biogeograficamente estão distribuídos apenas no neotrópico e sua presença em outras regiões do planeta deve-se a introdução pelo homem. Seis gêneros são encontrados na bacia do Paraguai-Paraná e três gêneros na bacia do São Francisco. O gênero *Piaractus* é encontrado em todas as regiões.



**Figura 14.** *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).

Resultados de nosso laboratório mostraram que mugilídeos apresentavam maior atividade de conjugação de CDNB com a GSH por ação da GST no verão que no inverno. Esse resultado foi fundamental para que

podéssemos imaginar uma possível relação entre os níveis de atividade de GST e os níveis de melatonina, que, como já vimos, também variam sazonalmente e com o fotoperíodo.

Uma vez que as ERO podem oxidar os grupamentos tióis das moléculas e estes grupamentos estão intimamente relacionados à conformação e a estrutura de moléculas como as isoenzimas de GST e do GSH (Nordberg e Arnér, 2001), pensamos em uma possível relação entre o estresse oxidante causado pelo aumento de ERO e as atividades das enzimas de GST de pacu. Considerando a adaptação do pacu ao pulso de inundação do Pantanal, seguindo a mesma linha de raciocínio, propusemos investigar também se a potência antioxidante da melatonina poderia minimizar os efeitos causados pelas GST sobre as ERO dos pacus submetidos à hipoxia, reoxigenação e hiperoxia.

Nossas investigações têm uma importância fundamental se considerarmos que concentrações de melatonina, que variam diária e sazonalmente no pacu (Iseki e col., 2000), estariam relacionadas a conjugação de 4-HNE com GSH, catalisada pelas isoenzimas de GST. Assim, a susceptibilidade de pacus a endo e xenobióticos poderia revelar-se mais intensa em uma determinada época do ano ou até mesmo ao longo do dia. Entender os processos pelos quais os peixes conseguem de certa forma tolerar mudanças bruscas de oxigênio na água e um conseqüente aumento de ERO pode ser bastante proveitoso. Estes conhecimentos poderão ser aplicados no futuro para os mamíferos e certamente para o homem, a fim de promover uma maior qualidade e expectativa de vida ao combater doenças e males provocados pelo estresse oxidante. Já que poucos estudos são feitos sobre a bioquímica de nossa ictiofauna, também é de fundamental relevância conhecer mais sobre enzimas de peixes neotropicais endêmicos, pois novos conhecimentos ajudarão mais a preservação ecológica e também ao aumento na produtividade de pisciculturas.



## **2. OBJETIVOS**

Investigar possível ação protetora da melatonina em pacus contra estresse oxidante provocado por hipoxia, reoxigenação e hiperoxia. Verificar se esta proteção é sazonal e se está relacionada com a atividade de isoenzimas de glutathione S-transferases.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Reagentes

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), ácido etacrínico (ETHA), glutationa reduzida (GSH), albumina sérica bovina, dodecil sulfato de sódio, bis-acrilamida, TEMED, Tris (tris[hidroximetil]-aminometano), persulfato de amônia e melatonina foram comprados da Sigma Chemical Co. O 4-hidroxinonenal (4-HNE) foi comprado da Cayman Chemical Company. Imunoglobulinas IgG<sub>1</sub> monoclonais de camundongo, específicas para aminoácidos complexados com 4-HNE [HNEJ-2] foram adquiridas da Abcam. Imunoglobulinas IgG<sub>1</sub> monoclonais específicos para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de camundongos foram adquiridas da Millipore. Kit ECL<sup>TM</sup> *Western Blotting Analysis System*, contendo imunoglobulinas específicas para imunoglobulinas de camundongo e solução de revelação, foi adquirido da Amersham, GE Healthcare. Filmes de quimiluminescência de alta performance (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL) adquiridos da Amersham, GE Healthcare. Todos os outros reagentes utilizados tinham alto grau analítico.

#### 3.2. Equipamentos

Agitador tipo Vortex Phoenix AP 56; balança analítica Mettler A J 150; espectrofotômetro Shimadzu UV-160 A; espectrofotômetro Beckman DU 530; homogeneizador tipo Potter-Elvehjem; potenciômetro Analyser pH 300; ultracentrífuga refrigerada Hima CP 70G Hitachi; cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) acoplado a um detector fluorimétrico usando uma coluna de fase reversa tipo C-18 (ODS Hypersyl, 200 mm x 4,6 mm, 5 µ); oxímetro da Hanna Instruments – mod. HI 91410, cuba de eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra Cell Bio-Rad; cuba de transferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad; equipamento de revelação Macrotec MX-2; analisador modular AVL/Roche OMNI 7.

#### 3.3. Desenho experimental

Os pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887), foram capturados dos tanques de pisciculturas localizadas no Estado do Rio de Janeiro. Alguns

da fazenda Sol Nascente, em Laje do Muriaé, e outros do Pesque-e-pague São João, em Itaocara. Todos os pacus apresentavam peso aproximado de 1,5 kg.

Os pacus foram divididos em quatro grupos de cinco animais: normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia. Cinco animais do grupo normoxia foram deixados por 42 horas em tanque com concentração de oxigênio de  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo em seguida submetidos à eutanásia. Em outro tanque, contendo cinco pacus, a concentração de oxigênio foi baixada para  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ao longo de 6 horas borbulhando nitrogênio gasoso na água. Depois de 42 horas os pacus desse tanque sofreram eutanásia. Em um terceiro tanque com cinco pacus, a concentração de oxigênio foi baixada também por 6 h até  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e, depois de 42 h, elevada por 30 min até  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Assim que o oxigênio dissolvido alcançou  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  neste terceiro tanque os cinco animais (reoxigenação) sofreram eutanásia. Em um quarto tanque também foi abaixada a concentração de oxigênio até  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Depois de 42 h, o oxigênio voltou a ser borbulhado nesse tanque até que sua concentração fosse de  $9,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Seis horas depois os cinco pacus (hiperoxia) sofreram eutanásia. Ao longo dos experimentos os níveis de oxigênio dissolvido na água foram monitorados por um medidor de  $\text{O}_2$  dissolvido na água.

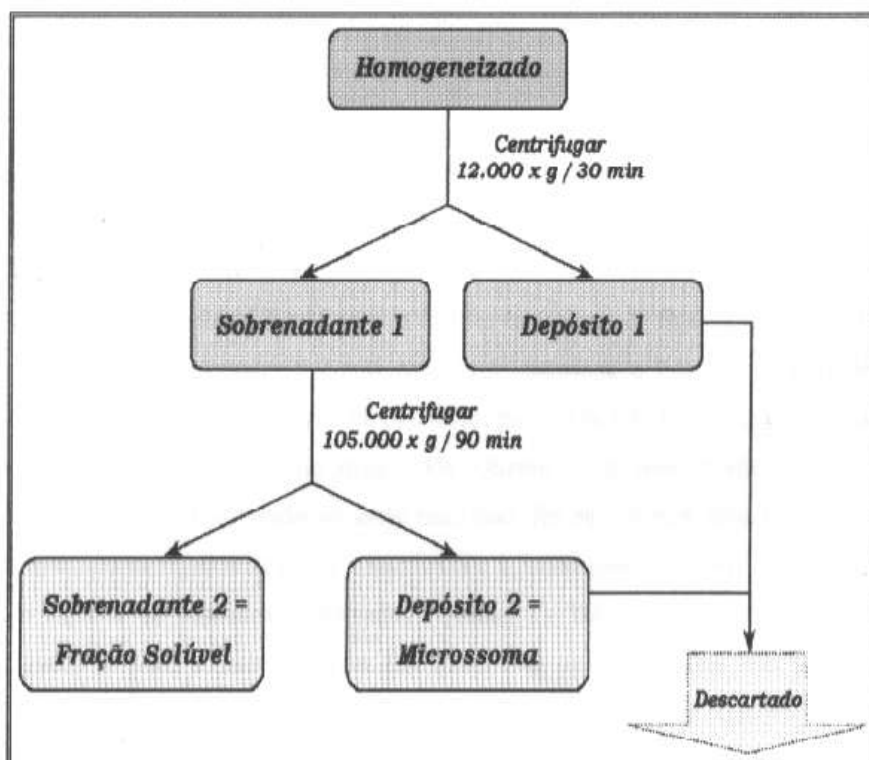
Os experimentos com injeções intracelomáticas de melatonina também aconteceram do modo descrito acima, sendo que as injeções de melatonina nos animais foram feitas sempre, em todos os grupos, 4 horas antes da eutanásia de cada grupo. As doses injetadas de melatonina foram de  $0,3 \text{ mg}$  de melatonina / kg de peixe (dose fisiológica) e  $3 \text{ mg}$  de melatonina / kg de peixe (dose farmacológica).

### **3.4. Preparação da fração citosol (solúvel)**

Os pacus foram sacrificados por ruptura da coluna vertebral com uma faca de lâmina serrilhada. Seus fígados foram rapidamente retirados após abertura ventral com tesoura, lavados em soro fisiológico e imediatamente congelados em nitrogênio líquido.

Para o preparo da fração solúvel (Figura 14), os fígados foram descongelados imediatamente antes do uso, secos em papel de filtro, pesados e processados individualmente em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem

(Potter, 1955) a 2.000 rpm por 2 min, a 4 °C, em solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo 0,25 M de sacarose. Foram usados 4 mL de tampão para cada 1 g de fígado. O homogeneizado foi então centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação foi submetido a 105.000 x g por 90 min a 4 °C. O novo sobrenadante, que chamamos fração solúvel celular (citosol) foi guardado no congelador a -20 °C até o momento do uso.



**Figura 15.** Esquema do preparo da fração solúvel

### 3.5. Determinação de proteínas

A quantidade de proteínas totais presente na fração solúvel foi determinada pelo método de Peterson (Peterson, 1977), que é uma simplificação do método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando o reativo de Folin-Ciocalteu. A soroalbumina bovina foi utilizada como proteína de referência.

### 3.6. Obtenção do plasma e extrato de plasma

Um mililitro de sangue de pacu foi retirado por punção de um vaso sanguíneo no pedúnculo caudal, localizado logo abaixo da coluna vertebral, com uma seringa de vidro de 1 mL rinçada com heparina para evitar a coagulação sanguínea. O sangue foi colocado em tubos do tipo *ependorf* e foi centrifugado por 10 min a 12.000 rpm para obtenção do plasma sobrenadante. Ao plasma, transferido para tubos *ependorf* limpos, foi adicionado ácido perclórico para uma concentração final de 3,5%, a fim de que todas as proteínas pudessem ser desnaturadas. A suspensão com as proteínas insolubilizadas foi centrifugada por 10 min a 12.000 x *g*. O sobrenadante (extrato de plasma) foi aplicado numa coluna de fase reversa em HPLC para a detecção da melatonina. Importante destacar que todos os tubos *ependorf* deste processo estavam envoltos em papel laminado para evitar degradação da melatonina pela luz.

### 3.7. Níveis de melatonina no plasma

Volumes de 100  $\mu$ L de soluções de concentrações conhecidas (padrões) de melatonina em metanol 10% foram injetados em uma coluna de HPLC C-18 de fase reversa (ODS Hipersylo, 200 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ ). As concentrações de melatonina usadas foram de 10, 60, 120 e 340 pM. A fase móvel foi tampão de acetato de sódio 10 mM, pH 4,82, contendo 23% de metanol. A melatonina eluída em aproximadamente 30 min foi detectada por fluorescência a 285 nm (excitação) e 350 nm (emissão). Para medir a concentração de melatonina no plasma, 100  $\mu$ L do extrato de plasma foram injetados na coluna.

### 3.8. Medida de hipoxia e hiperoxia

Foram determinados a  $pO_2$  e a  $pCO_2$  no sangue dos pacus, assim como o teor do lactato plasmático usando o aparelho Accutrend® lactate com as tiras-teste BM-Lactate de acordo com as instruções do fabricante. Estas determinações foram realizadas no Centro de Tratamento Intensivo do Hospital Universitário Pedro Ernesto. A concentração de oxigênio na água foi determinada com a utilização de um oxímetro.

### 3.9. Determinação das atividades de GST

Para o ensaio das atividades geral e das isoenzimas pi de GST solúveis de fígado de pacu foram usadas as condições ótimas de ensaio previamente padronizadas por Camacho e col. (2001). Monitoramos espectrofotometricamente as concentrações dos conjugados de CDNB e GSH (atividade geral) e de ácido etacrínico e GSH (atividade pi) à medida que apareciam no meio de reação. Os ensaios das atividades com 4-HNE foram adaptados para fígado de pacu a partir de método descrito para ratos (Per Ålin e col., 1985). Curvas de substrato também foram feitas para saber qual seria a concentração ideal de 4-HNE a ser usada, já que a atividade de GST com 4-HNE nunca fora ensaiada antes em um peixe neotropical.

Para a medida da atividade geral adicionou-se ao meio reacional 3 µg de proteína da fração citosólica, 2 mM de CDNB em etanol a 4% e 5 mM de glutathiona reduzida (GSH) em 0,1 M de tampão fosfato de potássio, pH 6,0. O aparecimento do conjugado foi continuamente registrado por 3 min a 340 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-160A. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de absorvidade para o CDNB de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Habig e col., 1974).

As atividades de GST da classe pi em fração citosol de fígado de pacu foram determinadas em um meio reacional preparado para conter 250 µg de proteínas, 0,25 mM de ETHA em etanol a 4% e 0,65 mM de glutathiona reduzida (GSH) em 0,025 M de tampão fosfato de potássio, pH 7,0. O aparecimento do conjugado foi continuamente registrado por 3 min a 270 nm. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de absorvidade para o ETHA que é de  $5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Habig e col., 1974).

A atividade de GST da classe alfa em fração citosol de fígado de pacu foi ensaiada em um meio reacional contendo 20 µg de proteínas, 100 µM de 4-HNE em água e 2,5 mM de glutathiona reduzida (GSH) em 0,1 M de tampão fosfato de sódio, pH 6,5. O desaparecimento do 4-HNE foi continuamente registrado por um intervalo de 3 min a 224 nm. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de absorvidade para o 4-HNE de  $13,75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Per Ålin e col., 1985).

### **3.10. Efeito *in vitro* da melatonina sobre as atividades de GST solúveis hepáticas de pacu**

Em tubos de ensaio foram colocados tampão de ensaio, fração solúvel, e melatonina dissolvida em água bidestilada nas concentrações de 10, 60, 120 e 340 pM. Depois de 15 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro, o substrato exógeno e o GSH foram adicionados para determinação das atividades de GST. Os ensaios cinéticos das atividades de GST foram feitos do mesmo modo como descritos nos itens anteriores.

### **3.11. Determinação da concentração de melatonina no plasma após a injeção dos peixes com melatonina**

Diferentes doses de melatonina foram previamente injetadas no pacu e as doses de melatonina para estudo foram de 0,3 (dose fisiológica) e de 3 (dose farmacológica) mg de melatonina por kg de peixe. Antes de injetar os animais, retiramos 0,5 mL de seu sangue. A seguir, os peixes foram injetados com 50  $\mu$ L de melatonina diluída em água na cavidade celomática. Novas coletas de sangue ocorreram nos tempos 0, 45, 90 e 180 min. O sangue foi tratado como descrito no item 3.6 e os extratos de plasma injetados no HPLC para análise.

### **3.12. Carbonilação de proteínas (medida do 4-HNE ligado à proteínas)**

As proteínas carboniladas da fração solúvel foram detectadas através da técnica de *immunoblot*. O anticorpo primário foi imunoglobulina IgG1 monoclonal de camundongo, específica para aminoácidos complexados com 4-HNE (mouse monoclonal [HNEJ-2] para 4-hydroxy-2-nonenal, Abcam). Os anticorpos secundários foram imunoglobulinas associadas à peroxidase do rábano (*horseradish peroxidase*), específicas para imunoglobulinas de camundongo (ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System, Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare). Um volume de fração citosólica contendo 50  $\mu$ g de proteínas foi misturado à solução tampão da amostra (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 10% de glicerol, 1 g/mL de 2-mercaptoetanol, 2% de SDS e uma pitada de azul de bromofenol). A mistura foi então mantida em banho fervente por 5 min e

centrifugada a 12.000 rpm por 5 min. Após estas etapas, a amostra estava pronta para ser aplicada no gel.

A separação das proteínas e dos fragmentos proteicos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel de corrida continha 15% de bis-acrilamida, 0,0625% de TEMED, 0,1% de persulfato de amônio em solução tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, com 0,1% de SDS. O gel de empacotamento continha 3,3% de bis-acrilamida, 0,19% de TEMED, 0,14% de persulfato de amônio em solução tampão Tris-HCl 81 mM, pH 6,8, contendo 0,0645% de SDS. Após a polimerização do gel a placa foi transferida para a cuba de eletroforese e a solução tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, contendo 0,19 M de glicina e 3,47 mM de SDS) foi adicionada. Após a aplicação das amostras e dos padrões de peso molecular a corrida se processou à temperatura ambiente por cerca de 50 min a 170 V (voltagem fixa) e 400 mA.

Após a separação eletroforética, o gel foi retirado do sistema e imerso em banho de solução tampão de transferência gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, contendo 192 mM de glicina e 20% de metanol). A mesma solução foi usada para umedecer a membrana, os papéis de filtro, a membrana de nitrocelulose e as esponjas usados para a montagem do “sanduíche” (esponja, papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel de filtro e esponja). A transferência foi realizada a 100 V, 317 mA com voltagem fixa. A transferência transcorreu por 2,5 h em banho de gelo.

Após a transferência, a membrana foi retirada do “sanduíche” e lavada com solução de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl (TBS). A eficiência da transferência foi analisada ao imergir a membrana em uma solução diluída dez vezes de Ponceau S. Em seguida, a membrana foi descorada com solução TBS e incubada à temperatura ambiente com a solução de bloqueio (solução TBS + 0,05 % de Tween 20 e 5% de albumina) por 1 h. Após este tempo, a membrana foi incubada *overnight*, na geladeira, sob agitação constante com uma solução contendo o anticorpo primário (solução de bloqueio + 0,10 µg/mL de anticorpo primário).

Após sucessivas lavagens da membrana com solução de TBS para retirada do anticorpo primário não ligado, a membrana foi então incubada com uma solução de anticorpo secundário (solução de bloqueio + anticorpo secundário, 1:10.000 v/v) por 1 h à temperatura ambiente sob agitação



constante. Ao final deste processo, a solução foi descartada e a membrana lavada diversas vezes com TBS para retirada do anticorpo não ligado.

A detecção do anticorpo secundário foi realizada por imunoluminescência utilizando-se o protocolo fornecido pelo fabricante (ECL™ *Western Blotting Analysis System*, Amersham™, GE Healthcare). A membrana foi recoberta com 1 mL de solução de revelação (luminol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 1:1 v/v) e mantida no escuro por 5 min. Em uma câmara escura, um filme de quimiluminescência de alta performance (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) foi posicionado contra a membrana dentro de um cassete de raios-X. O tempo de exposição foi de 10 a 30 min e após este período, o filme foi revelado.

A mesma membrana usada para a marcação com anticorpo contra 4-HNE-aminoácido foi remarcada com anticorpos específicos para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) depois de realizadas as etapas descritas a seguir. A membrana contendo os anticorpos primários e secundários foi submersa em solução de *striping* (solução tampão Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 contendo 2% de SDS + 10% de β-mercaptoetanol) e permaneceu por 30 min em um banho a 55 °C. A solução foi então descartada e a membrana lavada com solução TBS para remover o excesso de β-mercaptoetanol. Uma vez retirados os anticorpos, a membrana estava pronta para ser bloqueada e marcada com novos anticorpos. Tais etapas foram realizadas de acordo com o método descrito anteriormente, mas utilizando-se como anticorpos primários imunoglobulinas específicas para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (2 µg.mL<sup>-1</sup>).

### 3.13 Testes estatísticos e cinéticos

Os gráficos e as análises estatísticas foram feitos pelo programa Prism 5.0 da GraphPad Software versão 5.00. A comparação entre os grupos normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia foi feita usando o teste não paramétrico ANOVA com pós-teste de Tuckey. Em alguns experimentos realizamos também o teste t não pareado.

## 4. RESULTADOS

Para confirmarmos que os pacus estavam em hipoxia, colhemos amostras de seu sangue e medimos a saturação da hemoglobina, as pressões parciais de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, bem como os níveis de bicarbonato e lactato do plasma. A Tabela 1 mostra que não houve saturação da hemoglobina mensurável nos animais mantidos a 0,5 ppm de O<sub>2</sub> (hipoxia). Esses animais apresentaram diminuição dos níveis de bicarbonato e aumento do lactato plasmático.

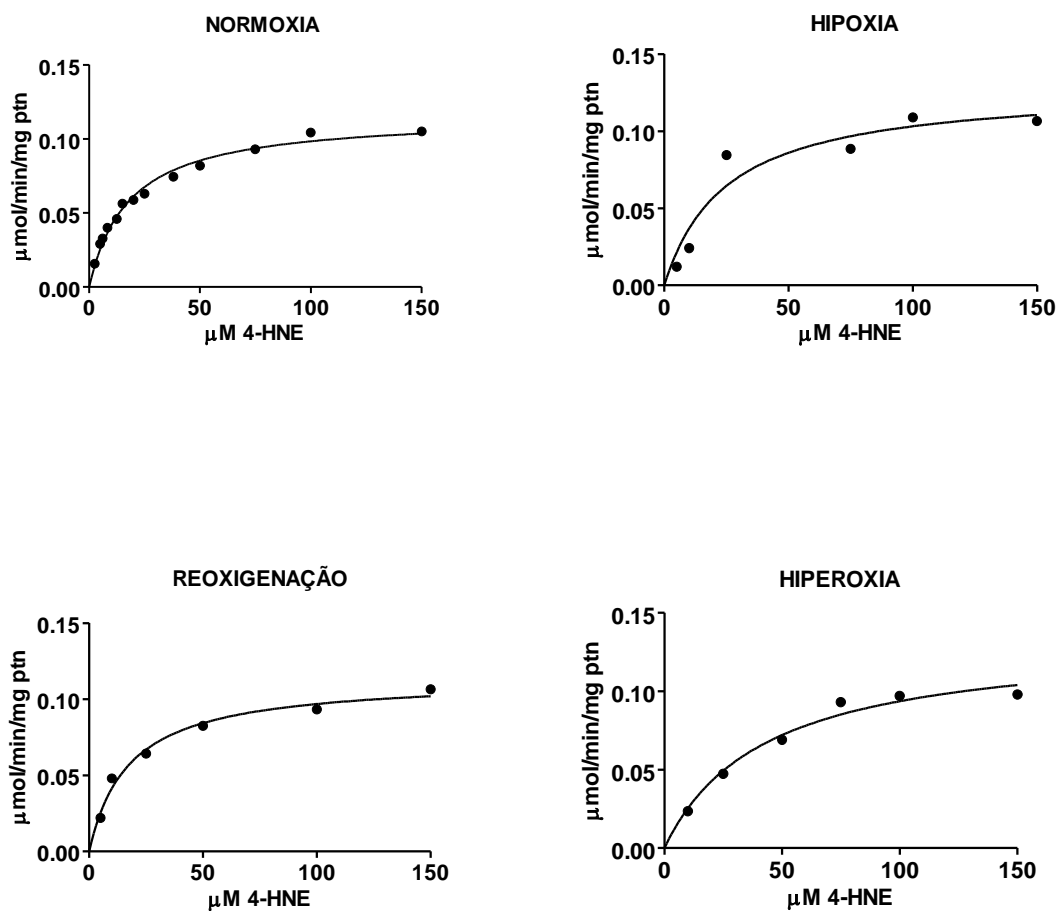
**Tabela 1:** Valores de marcadores de hipoxia no sangue.

	pO <sub>2</sub> (mmHg)	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	% sat Hb	lactato (mM)
Normoxia	30,3 ± 4,2	24,3 ± 4,5	44,0 ± 3,7	42,7 ± 8	2,9 ± 1,2
Hipoxia	0	7,7 ± 2,0	7,3 ± 1,9	0	4,4 ± 1,5

Valores expressos como média aritmética com desvio padrão (*n* = 5 em cada grupo).

### 4.1. Padronização das condições ótimas de ensaio enzimático.

Para podermos comparar os níveis de atividade de conjugação da GST com 4-HNE resolvemos fazer curvas de substrato para garantirmos o ensaio da atividade usando a concentração ótima de 4-HNE. Estes experimentos foram realizados com frações solúveis de fígado de animais sacrificados no inverno. A Figura 16 mostra as atividades enzimáticas de GST frente à variação do substrato 4-hidroxinonenal (4-HNE) em citosol hepático de pacus mantidos em diferentes tensões de oxigênio na água. Podemos observar na Figura 16 e na Tabela 2 que não houve variação da velocidade máxima entre os diferentes grupos. A KM da GST de fígado de pacus na hiperoxia foi o dobro da encontrada nos animais em normoxia e em reoxigenação, mas apenas 1,7 vezes maior do que a dos pacus em hipoxia.



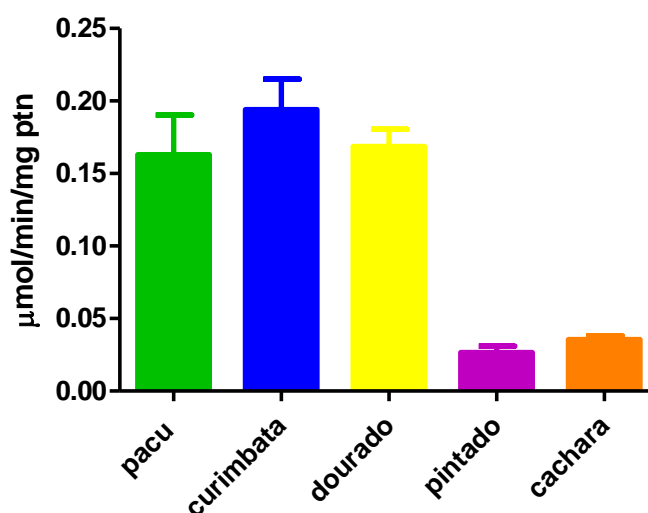
**Figura 16.** Efeito da concentração de substrato (4-hidroxinonenal) sobre a atividade de GST de citosol hepático de pacus submetidos a diferentes concentrações de oxigênio na água. Os resultados representam a média aritmética de três determinações feitas com amostra *pool* de cinco peixes. O desvio padrão foi inferior a 5% em todos os experimentos.

**Tabela 2:** Valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_M$  da GST sobre o 4-HNE.

Grupo	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg ptn}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )
Normoxia	$0,1160 \pm 0,001$	17
Hipoxia	$0,1289 \pm 0,006$	25
Reoxigenação	$0,1136 \pm 0,008$	17
Hiperoxia	$0,1337 \pm 0,005$	43

#### 4.2. Níveis de atividade de GST com 4-HNE na fração pós-mitochondrial de fígado de peixes coletados no Pantanal.

Uma vez que o pacu resiste bem a mudanças bruscas de oxigênio dissolvido na água, resolvemos comparar os níveis de atividade de GST com 4-HNE com outras espécies de peixes capturados nas mesmas águas e na mesma época do ano. Na Figura 17 podemos observar que os pacus, os curimatás e os dourados apresentaram os maiores níveis de GST com 4-HNE na fração pós-mitochondrial se comparados aos níveis das atividades dos pintados e das cacharas.

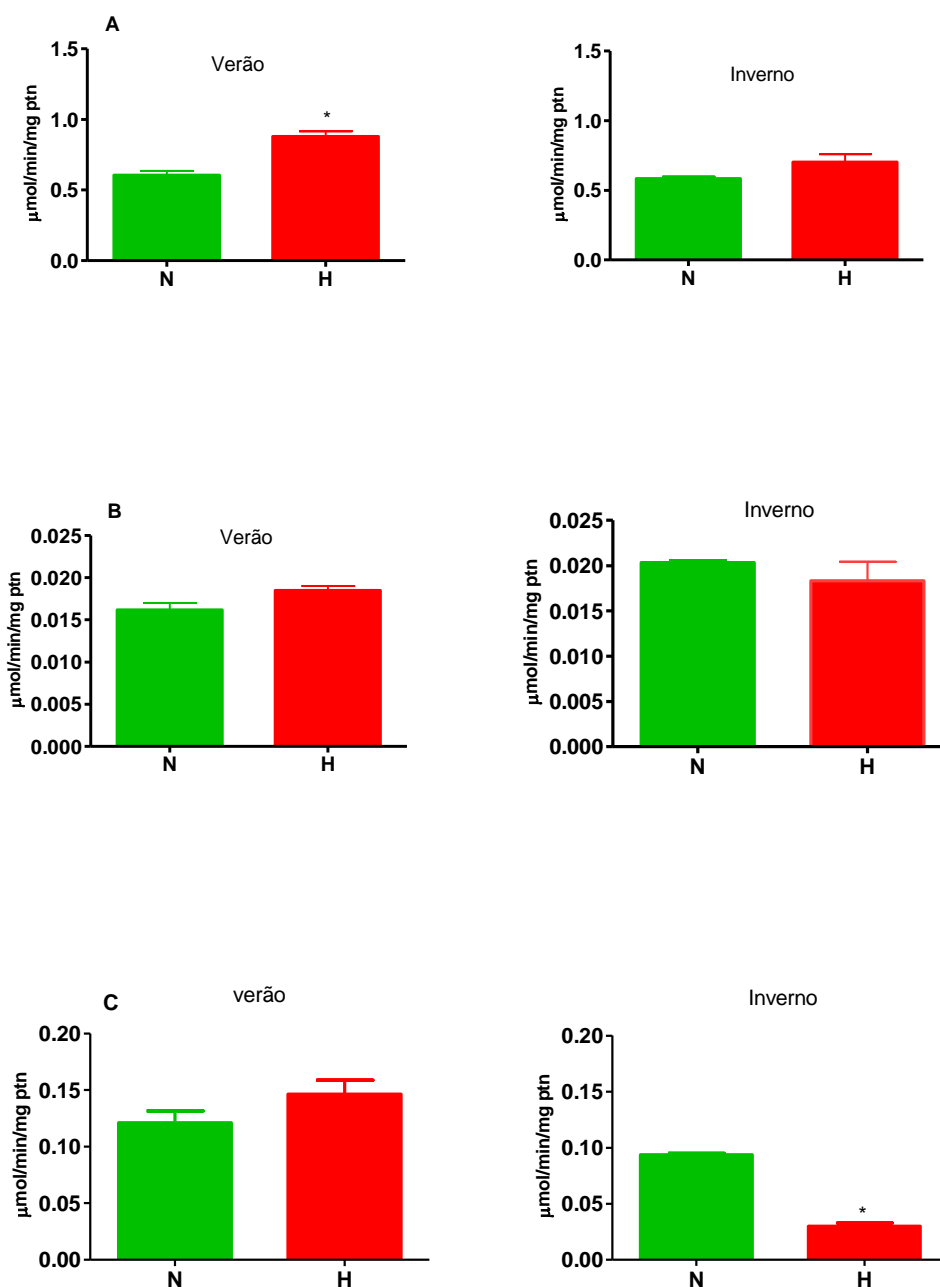


**Figura 17.** Atividade de GST com 4-HNE em fração pós-mitochondrial de fígado de peixes coletados em janeiro de 2009 no Parque Nacional do Pantanal Mato-grossense. Os resultados representam a média aritmética e os desvios padrões de três determinações realizadas em amostra *pool* de cinco peixes de cada espécie.

#### 4.3. Níveis das atividades de GST de pacu em normoxia e em hipoxia no verão e no inverno.

Para sabermos se as atividades de GST podem variar nos pacus sazonalmente fizemos três experimentos no verão e dois no inverno e ensaiamos a atividade de GST com CDNB, com ETHA e com 4-HNE em pacus em normoxia e em hipoxia (Figura 18). A atividade com CDNB foi maior ( $p < 0,001$ ) nos animais em hipoxia durante o verão. A atividade

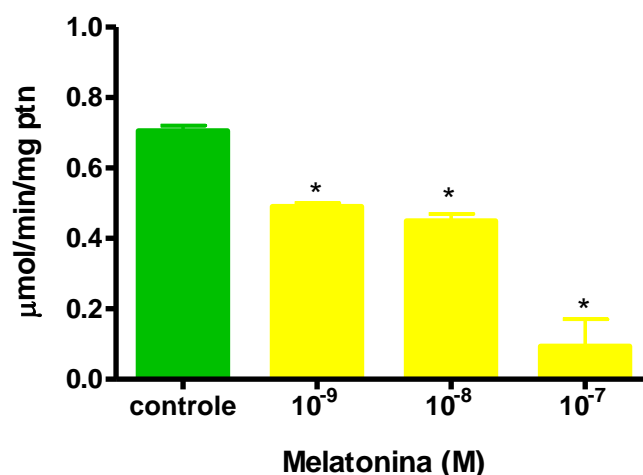
sobre 4-HNE nos pacus em hipoxia durante o verão também pareceu maior, mesmo que não significativamente. Ao contrário, encontramos baixa atividade ( $p < 0,001$ ) com 4-HNE em pacus colhidos no inverno. A atividade com ETHA não apresentou diferença significativa, quer fosse verão, ou inverno.



**Figura 18.** Atividade com CDNB (A), com ETHA (B) e com 4-HNE (C) de GST de pacus em normoxia (N) ou em hipoxia (H) no verão e no inverno. Os resultados representam médias aritméticas e desvios padrões de três determinações feitas em cada uma das frações solúveis de cada peixe ( $n = 5$ ). As diferenças significativas estão indicadas por um asterisco ( $p < 0,001$ , teste *t* de Student).

#### 4.4. Efeito *in vitro* da melatonina sobre a atividade de GST solúvel de fígado de pacu com CDNB.

Para verificarmos se a melatonina em doses altas, não fisiológicas, teria influência sobre o nível de atividade da GST, ensaiamos a atividade geral (com CDNB) de GST de pacus em normoxia durante o inverno na presença de concentrações de  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  M de melatonina. No gráfico da Figura 19 podemos observar que quanto maior é a concentração de melatonina menor é a atividade geral de GST, evidenciando que a melatonina *in vitro*, a partir concentrações nanomolares, inibe a atividade da GST que conjuga CDNB com GSH.



**Figura 19.** Efeito *in vitro* de melatonina sobre a atividade da GST citosólica de fígado de pacu com CDNB. Os resultados representam as médias aritméticas e os desvios padrões de três ensaios feitos em cada uma das concentrações de melatonina com *pool* de frações solúveis obtidas de cinco peixes em normoxia (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Níveis de melatonina no plasma em pacus inoculados com 3 e 0,3 mg de melatonina / kg de peso.

Ao analisarmos a Tabela 3, observamos que pacus apresentam melatonina plasmática na ordem de picomolar ( $10^{-12}$  M) e que 3 e 0,3 mg de melatonina por quilograma de pacu já são doses que, se injetadas

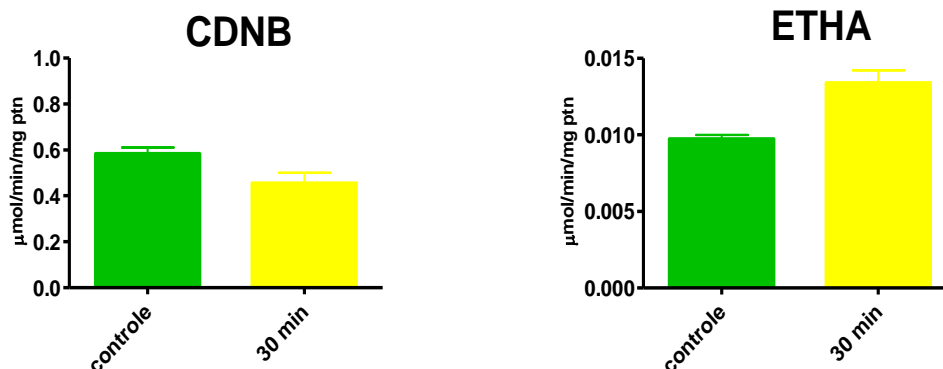
nos pacus, via intracelomática, refletirão níveis fisiológicos de melatonina encontrados no plasma do pacu 4 horas depois da injeção.

**Tabela 3.** Concentração de melatonina no plasma de pacu injetados com melatonina.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Melatonina (3 mg/kg de pacu)</b>	<b>Melatonina (0,3 mg/kg de pacu)</b>
<b>0</b>	$1,2 \times 10^{-12} \text{ M}$	$1,25 \times 10^{-12} \text{ M}$
<b>30</b>	$22.000 \times 10^{-12} \text{ M}$	$2,96 \times 10^{-12} \text{ M}$
<b>90</b>	$2.800 \times 10^{-12} \text{ M}$	$4,45 \times 10^{-12} \text{ M}$
<b>180</b>	$292 \times 10^{-12} \text{ M}$	$3,40 \times 10^{-12} \text{ M}$

#### **4.6. Efeito *in vivo* da melatonina sobre as atividades de GST de fígado de pacu com CDNB e com ETHA.**

Para verificarmos possível ação *in vivo* da melatonina sobre os níveis de atividade de GST, dez pacus foram injetados com 0,3 mg de melatonina por kg de peso na cavidade celomática e sacrificados 30 minutos depois. A melatonina inoculada na cavidade celomática do pacu não provocou variação significativa na atividade geral de GST hepática com CDNB (Figura 20). A atividade das isoenzimas que conjugam ETHA com GSH tendeu a aumentar, mas o aumento não foi significativo.



**Figura 20.** Efeito *in vivo* de dose fisiológica (0,3 mg/kg de peixe) de melatonina sobre as atividades de GST citosólica de fígado de pacu com CDNB e com ETHA. Os resultados representam as médias aritméticas e os desvios padrões de ensaios feitos em triplicata em cada uma das frações obtidas de cada cinco peixes. As diferenças significativas estão indicadas por um asterisco ( $p < 0,05$ ), teste *t* de Student.

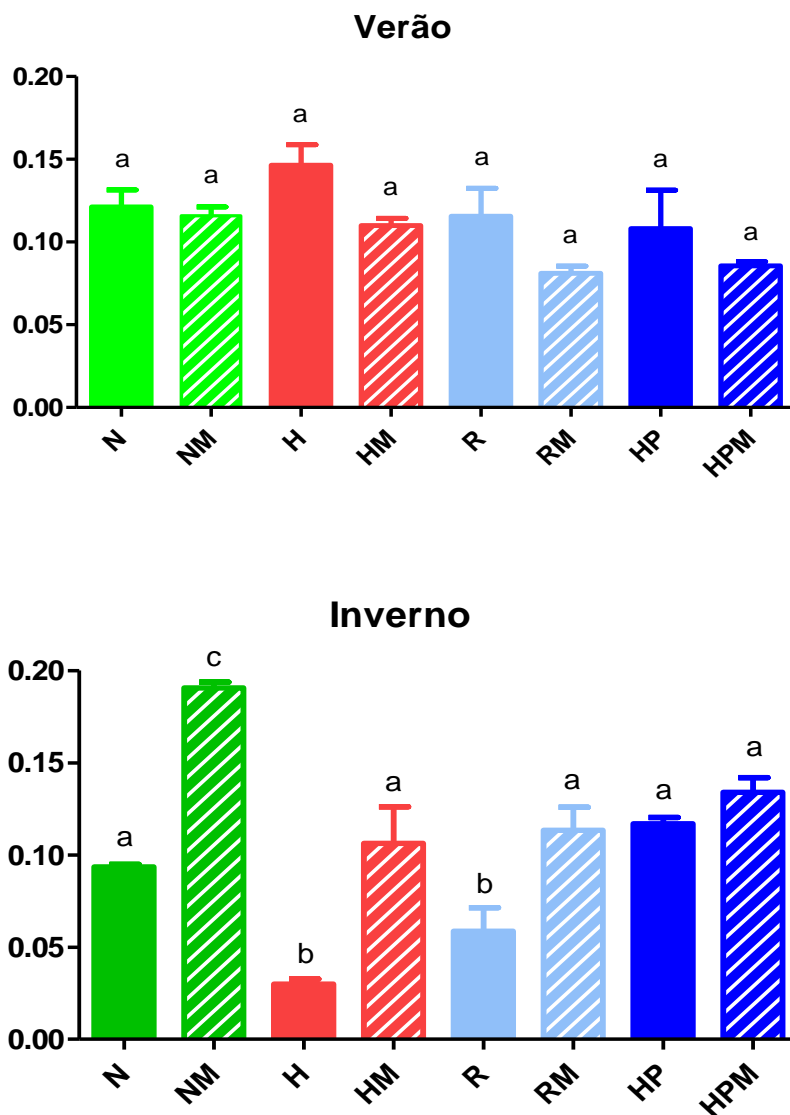
#### 4.7. Efeito dos níveis de oxigenação sobre a atividade de conjugação da GST com o 4-HNE em pacus tratados ou não com melatonina, no inverno e no verão.

Para verificarmos se a atividade de conjugação do 4-HNE com a GSH pela GST variava com os níveis de oxigenação dos pacus e se a melatonina tinha efeito sobre essas atividades, foram realizados três experimentos no verão e dois no inverno. Os pacus foram inoculados com melatonina na cavidade celomática e submetidos à hipoxia, hipoxia seguida de rápida oxigenação (reperfusão) e hipoxia seguida de hiperoxia.

Na Figura 21 podemos observar que, no verão, o grupo normoxia apresentou níveis mais elevados de atividade de GST com 4-HNE que o grupo normoxia no inverno. Constatamos também que, no verão, os grupos de pacus sob hipoxia, reoxigenação e hiperoxia, inoculados com doses fisiológicas de melatonina (0,3 mg/kg), não apresentaram mudanças significativas de seus níveis de atividade em relação aos mesmos grupos sem melatonina, mas que houve uma tendência a diminuição dos níveis em presença de melatonina.



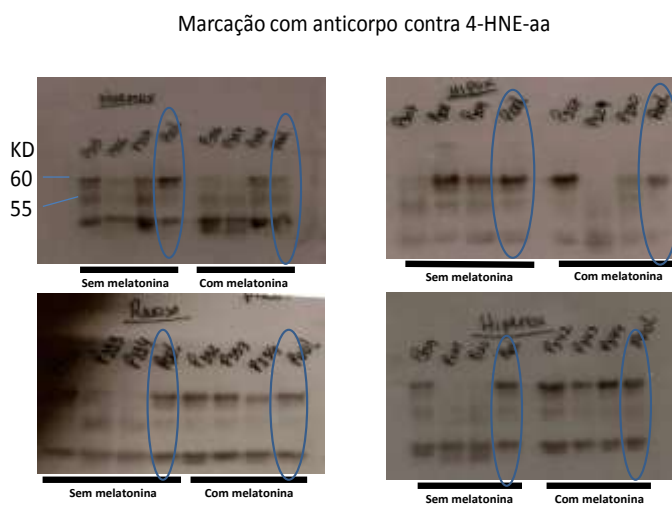
No inverno observamos uma queda significativa na conjugação de 4-HNE em pacus submetidos à hipoxia e reoxigenação, mas com maiores níveis da atividade nos animais em hiperoxia. Vimos que os grupos de pacus em normoxia, hipoxia e reoxigenação que receberam doses fisiológicas de melatonina (0,3 mg/kg), tiveram um aumento dos níveis de atividade se comparadas as atividade do grupo normoxia, hipoxia e reoxigenação que não receberam melatonina. A melatonina em doses fisiológicas não aumentou de modo significativo as atividades de GST com 4-HNE nos animais do grupo em hiperoxia. Ainda no inverno, o grupo normoxia com melatonina (NM, na Figura 21), apresentou o dobro de atividade que o grupo normoxia sem melatonina. As atividades dos demais grupos tratados com melatonina no inverno alcançaram as atividades destes mesmos grupos no verão.



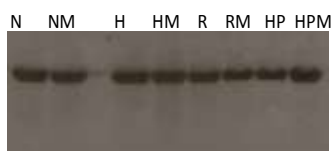
**Figura 21.** Atividades de GST com 4-HNE do citosol hepático de pacu, no verão e no inverno, em normoxia (N), em hipoxia (H), em reoxigenação (R), em hiperoxia (HP) e injetados com melatonina em normoxia (NM), em hipoxia (HM), em reoxigenação (RM) e em hiperoxia (HPM). Os resultados representam as médias aritméticas e os desvios padrões de ensaios feitos em triplicata em cada uma das frações obtidas de cada cinco peixes. Letras diferentes indicam diferença significativa (b =>  $p < 0,05$  ; c =>  $p < 0,001$ ).

#### **4.8. Carbonilação de proteínas por 4-HNE em fração citosólica hepática de pacus injetados ou não com melatonina em normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia.**

Para verificarmos a eficiência da conjugação do 4-HNE pela GST, o que diminuiria a taxa de carbonilação de proteínas, fizemos *immunoblot* de proteínas solúveis ligadas a 4-HNE em animais injetados ou não com melatonina em normoxia, hipoxia, reoxigenação ou em hiperoxia, durante o inverno (Figura 22). Pudemos observar que os animais não inoculados com melatonina tiveram uma quantidade maior de proteínas ligadas a 4-HNE em comparação aos animais que foram inoculados com melatonina (melhor visualizado no *pool* das frações solúveis dos fígados dos animais). Este padrão ficou mais claro no grupo hipoxia, mostrando-se também mais visível nos grupos normoxia e reoxigenação.



Marcação com anticorpo contra GAPDH

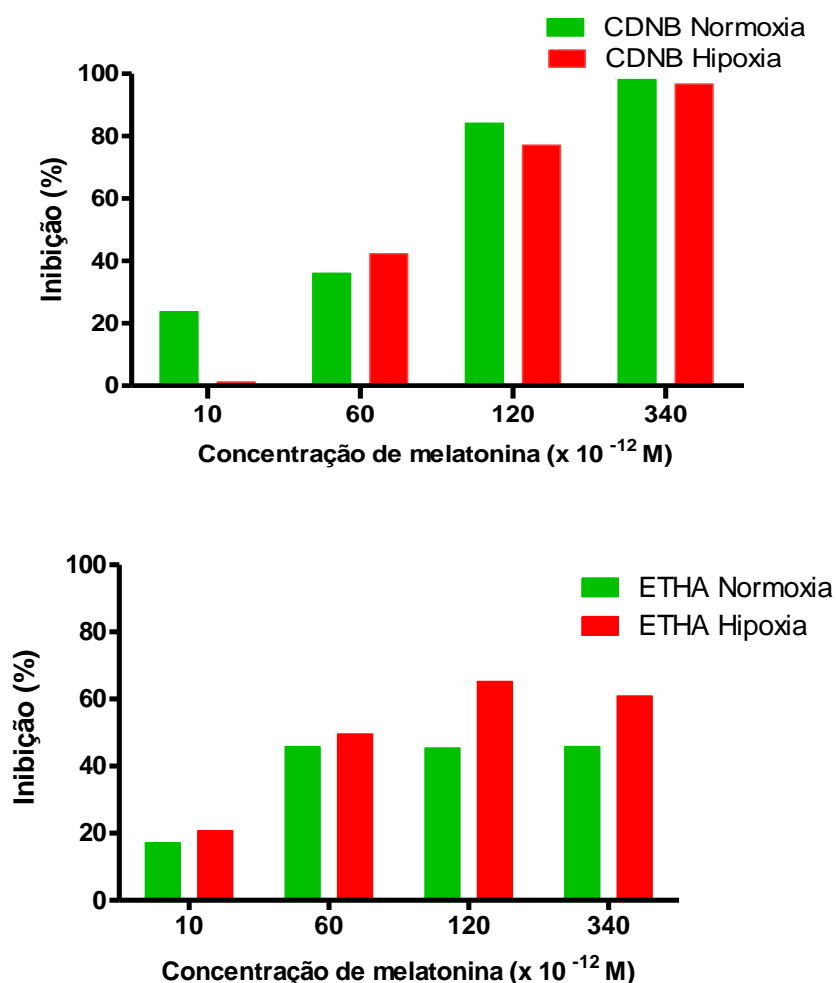


**Figura 22.** Carbonilação de proteínas em pacus injetados ou não com melatonina na dose de 0,3 mg/kg de peixe. Os peixes foram coletados no inverno e submetidos à normoxia (N), normoxia com melatonina (NM), hipoxia (H), hipoxia com melatonina (HM), reoxigenação (R), reoxigenação com melatonina (RM), hiperoxia (H) ou hiperoxia com melatonina (HPM). GAPDH significa gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que serve como padrão positivo da técnica.

#### 4.9. Efeito *in vitro* da melatonina sobre a atividade de GST com CDNB ou com ETHA de fígado de pacus submetidos à normoxia e hipoxia.

Para verificarmos o efeito *in vitro* da melatonina sobre a atividade de GST, usamos um *pool* de fração solúvel de cinco pacus dos experimentos de normoxia e de hipoxia no verão. Na Figura 23 podemos perceber que a atividade geral de GST foi sendo inibida à medida que a concentração de melatonina aumentava no meio de incubação, no entanto, isso não ocorreu na menor concentração de melatonina (10 pM)

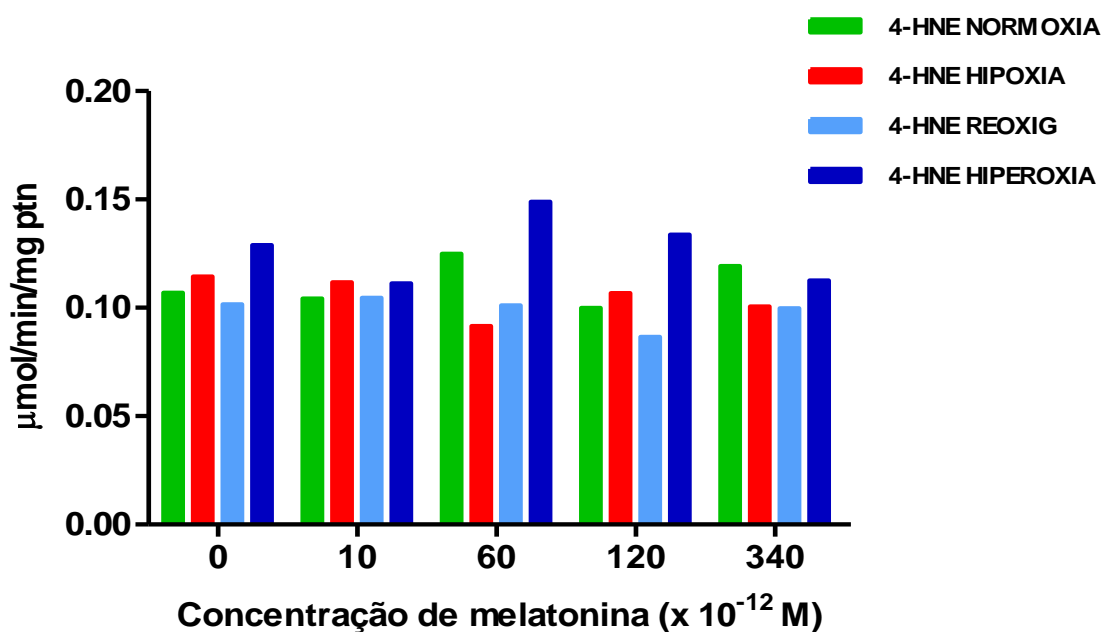
nos pacus em hipoxia. Foi visto também que a dose mais elevada de melatonina (340 pM) inibiu quase que totalmente a atividade geral de GST. As atividades das isoenzimas da classe pi também foram mais inibidas a medida que a concentração de melatonina aumentava no tubo de ensaio, sendo que doses mais elevadas (120 e 340 pM) de melatonina inibiram mais intensamente as atividades dos animais em hipoxia.



**Figura 23.** Efeito *in vitro* da melatonina nas doses fisiológicas de 10, 60, 120 e 340 pM sobre as atividades de GST com CDNB e com ETHA do citosol de fígado de pacus submetidos a normoxia e hipoxia no verão. Os resultados representam a média aritmética de um pool de cinco peixes ensaiados em triplicata.

#### 4.10. Efeito *in vitro* da melatonina na atividade de GST sobre 4-HNE de fígado de pacus submetidos à normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia.

Para esse experimento foram usados peixes do verão. Podemos observar na Figura 24 que não houve diferença significativa entre as atividades dos ensaios sem melatonina e as atividades ensaiadas nas diferentes concentrações de melatonina.



**Figura 24.** Efeito *in vitro* da melatonina nas doses fisiológicas de 10, 60 120 e 340 pM sobre a atividade de GST com 4-HNE em citosol de fígado de pacus coletados no verão e submetidos a normoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia. Os resultados representam a média aritmética de um pool de cinco peixes ensaiados em triplicata.

## 5. Discussão

O ciclo da vida consiste resumidamente em nascer, reproduzir-se para garantir a perpetuação da espécie e morrer. Assim é que se desenvolveram nos animais vários mecanismos de adaptação que lhes permitiram superar as condições adversas à vida, bem como transferir seus genes às gerações seguintes, em suma, evolução.

Mudanças nos níveis de oxigênio ocorrem frequentemente em ambientes aquáticos e são a principal fonte das espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO devem ser mantidas em concentrações adequadas ao bom funcionamento metabólico das células. Quando elas ocorrem acima destas concentrações advém o estresse oxidante, que pode impedir a vida celular. Melatonina, GSH, as vitaminas C e E, juntamente com as enzimas antioxidantes, tais como GST, GPX, SOD e CAT, resultaram de mecanismos evolucionários bem-sucedidos capazes de evitar que os níveis das espécies reativas de oxigênio ultrapassem determinada faixa de concentração intracelular. Foi observado, por exemplo, que cérebros de vertebrados bastante tolerantes a hipoxia e anoxia apresentam níveis elevados de ascorbato, fato que ajuda na neutralização das ERO (Rice, 2000). Alguns organismos aquáticos, incluindo algumas espécies de peixes, apresentam adaptações para suportar anoxia, hipoxia, reoxigenação e hiperoxia, o que lhes garante tolerância às condições de estresse oxidante e constitui uma estratégia indispensável para a sua sobrevivência (Hermes-Lima, 2001).

A capacidade para tolerar mudanças das quantidades de oxigênio na água, diferentes do valor ar-saturado, não é a mesma para todas as espécies de peixes. Isto parece ter sido moldado pelo habitat de cada espécie. Espécies bem adaptadas ao frio, como salmões e trutas, precisam, normalmente, de águas mais ricas em oxigênio, enquanto espécies adaptadas às águas mais quentes, como as carpas, podem superar a anoxia ou a hiperoxia (Lushchak e Bagnyukova, 2006a; Lushchak 2005; Love, 1980; Nikinmaa, 2002). Nossos resultados mostram que peixes do Pantanal de diferentes nichos ecológicos têm níveis de atividade de GST-4HNE bastante diferentes. Pacu, dourado e curimatá, que são peixes de superfície e meia água, apresentam atividades de GST-4HNE (0,17  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  ptn) 5,6 vezes maiores do que os peixes de



hábitos bentônicos ( $0,03 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg ptn}$ ) (Figura 17), como é o caso da cachara e do pintado. Uma explicação para isto pode se dever ao fato de que águas mais profundas sofrem menos influência dos fenômenos de superfície, como a chuva e o vento, os quais provocam variações de oxigênio dissolvido, culminando em formação de ERO nos animais. Sendo assim, parece não ser necessário que peixes de fundo tenham níveis de GST-HNE iguais aos dos peixes de superfície, que estão constantemente expostos à variação do teor de oxigênio.

Foi proposto que em condições de anoxia ou hipoxia a taxa de formação das espécies reativas de oxigênio diminuiria porque a cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias estaria bloqueada ou com quase nenhuma atividade, mas que a situação é invertida quando da reoxigenação, porque, então, a atividade da cadeia transportadora de elétrons excederia àquela da normoxia (Lushchak e Bagnyukova, 2006a). Hermes-Lima e col. (1998) propuseram a teoria da preparação para o estresse oxidante. Segundo eles, em anoxia ou hipoxia não haveria necessidade para um aumento das defesas antioxidantes, mas, como alguns experimentos com peixes mostraram aumento das defesas antioxidantes nas condições de pouco oxigênio (Lushchak e col., 2001), foi preciso formular a hipótese de que tal aumento seria um mecanismo preparatório para superar uma possível situação de estresse oxidante na reoxigenação. Entretanto, surgiram evidências que indicam ser possível a produção de espécies reativas de oxigênio mesmo durante a hipoxia e a anoxia (Lushchak e col., 2001; Turrens, 2003; Ježek e Hlavatá, 2005; Guzy e Schumaker, 2006), porque nestas situações muitos elétrons vazam da cadeia transportadora de elétrons e interagem com  $\text{O}_2$ , o que dá origem aos ânions superóxidos.

Já foi publicado que os níveis de atividade de algumas enzimas antioxidantes de peixes aumentam com o aumento das espécies reativas de oxigênio (Lushchak e Bagnyukova, 2006a, Lushchak e col., 2005; Rodriguez e col., 2004; Hermes-Lima e Savín, 2002; Hermes-Lima e col., 2001). Lushchak e Bagnyukova (2007) encontraram aumento nos níveis das atividades de GST ensaiadas com CDNB em citosol hepático do peixe *Perccottus glenii* submetido a  $0,4 \text{ ppm}$  de  $\text{O}_2$  dissolvido na água. Wilhelm Filho e col. (2005) publicaram que as atividades de GST em citosol hepático de piaparas submetidas à hipoxia

severa (64,68  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de fígado) e moderada (20,10  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de fígado) foram mais altas do que em normoxia (12,24  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de fígado). É muito importante mencionar que algumas das isoenzimas de GST são antioxidantes, mas que parte delas têm um papel importantíssimo no metabolismo de drogas. Períodos prolongados de exposição aos xenobióticos podem provocar lesão do parênquima hepático e impedir que os animais possam responder ao aumento das espécies reativas de oxigênio com a indução de suas enzimas antioxidantes.

O peixe japonês, *Carassius auratus*, é um modelo interessante para estudar estresse oxidante em animais de ambiente aquático, pois tolera bastante as mudanças de oxigênio que ocorrem na água. Esta espécie consegue suportar desde águas totalmente desprovidas de oxigênio até condições extremas de hiperoxia, além de suportar também variações de temperatura na água que vão de 0 a 40 °C (Lushchak e col., 2001, Ford e Beitinger, 2005). Acredita-se que a diminuição drástica da taxa metabólica, os altos níveis de reserva de carboidratos em todos os tecidos, a capacidade de evitar acidose e a transformação do lactato em etanol, que é excretado pelas guelras (Hochachka e Somero, 1984), são mecanismos vitais para que o peixe japonês consiga suportar essas mudanças de oxigênio e temperatura na água (Lushchak e col., 2005). O pacu, peixe utilizado como modelo em nosso laboratório também é um peixe que resiste bastante às variações de oxigênio na água, possivelmente por estar bem adaptado ao ciclo de vida do Pantanal, cujas águas apresentam amplas variações de oxigênio na estação seca ao longo do dia. Experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que pacus conseguem permanecer em hipoxia por mais de 40 horas, serem reoxigenados em apenas 30 minutos e ficarem submetidos a hiperoxia por mais de 6 horas, sem morrer, mesmo em águas com temperaturas acima de 25 °C. Nossos resultados mostram que a atividade geral de GST em citosol hepático de pacu (0,570  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteínas) ensaiada com substrato CDNB (Figura 18) é aproximadamente cinco vezes maior que a atividade geral do fígado de *C. auratus* (0,137  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) encontrada por Lushchak e col. (2005). Outros vertebrados, conhecidos por tolerarem, e muito, o estresse oxidante, exibem no fígado níveis de atividades de GST-CDNB bastante semelhantes aos do pacu. O rato, por exemplo, um animal que vive num

ambiente terrestre e rico em O<sub>2</sub>, apresenta o mesmo nível de atividade de GST-CDNB (0,5 µmol/min/mg ptn) que o nível do citosol hepático de pacu (Figura 18). Comparamos outros estudos com diferentes animais (Pham e col., 2002; Willmore e Storey, 1997a; Lushchak e col., 2001) e constatamos que o nível de atividade GST-CDNB em citosol hepático de pacu (0,5 µmol/min/mg ptn) é um dos mais altos já encontrados dentre todos os vertebrados. O animal que mais tolera o estresse oxidante é uma tartaruga de água doce, a tartaruga de ouvido vermelho (*Trachemys scripta elegans*). Coincidentemente, ela é o vertebrado que apresenta o maior nível de atividade de GST-CDNB no fígado, que varia de 1,9 a 2,3 µmol/min/mg (Willmore e Storey, 1997). Os órgãos das tartarugas são os que apresentam os maiores níveis de atividade de enzimas antioxidantes já descritas, se igualando até mesmo aos dos mamíferos (Hermes-Lima e col., 2001). Já foi observado que algumas espécies mantêm os níveis das defesas antioxidantes sempre elevadas. Estresse oxidante não parece interferir nos níveis das defesas antioxidantes da tartaruga de ouvido vermelho e muito menos no aumento da peroxidação de seus lipídios (Hermes-Lima e col., 1995) porque ela apresenta uma atividade constitutiva já elevada de suas enzimas antioxidantes. Outras espécies elevam a capacidade antioxidante durante a anoxia ou hipoxia com a finalidade de se preparar para o estresse oxidante que ocorrerá quando o nível de oxigênio voltar a subir novamente (Hermes-Lima e Zenteno-Savin, 2002; Lushchak e col., 2001). Assim como nos experimentos de anoxia e hipoxia realizados com certas cobras (*Thamnophis sirtalis*) (Hermes-Lima e Storey, 1993a), que são animais capazes de tolerar condições de hipoxia e anoxia, nós não encontramos diferenças significativas entre as atividades de GST-CDNB de citosol hepático de pacu coletados no verão e no inverno (Figura 18A). Não obstante, houve aumento significativo da atividade em hipoxia no verão em relação à normoxia. Este achado pode ser explicado talvez pelo fato do citosol hepático do pacu apresentar uma alta atividade constitutiva da enzima, assim como observado para a tartaruga de olho vermelho por Willmore e Storey (1997). De fato, Lushchak e col. (2005) afirmaram que o fígado é o órgão que tem maior atividade constitutiva de GST comparada com os demais órgãos. O fígado foi descrito também como o órgão com maior atividade de GST-CDNB dentre todos os órgãos já estudados (Lushchak e col., 2006a). Por outro lado,

Lushchak e col. (2001) observaram que as GST, mas não as atividades de GPX e de catalase do peixe japonês, mudavam de níveis em respostas as variações de oxigênio, e concluiu que possivelmente são estas flutuações nos níveis de GST que fazem com que o peixe japonês consiga suportar as variações de oxigênio no ambiente aquático, apontando então as GST como fundamentais no combate às ERO formadas nas situações de estresse oxidante.

As atividades das isoenzimas ensaiadas com o substrato exógeno ETHA tiveram valores de aproximadamente 0,018  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (Figura 18). Esta atividade foi praticamente igual nos pacus em normoxia e hipoxia, tanto no verão como no inverno (Figura 18B).

Ensaíamos as atividades das isoenzimas de GST com 4-HNE em fração citosol de fígado de pacus nas diferentes concentrações de oxigênio no verão e no inverno. Uma vez que não há referências sobre o ensaio de GST com 4-HNE em órgãos de peixes neotropicais, para ensaiar as atividades das isoenzimas de GST com 4-HNE foi necessário primeiramente descobrir qual seria a concentração ideal de 4-HNE a ser usada no ensaio que garantisse a velocidade inicial máxima da enzima. Foram feitas curvas de substrato para cada grupo de pacus submetidos às diferentes concentrações de oxigênio na água (Figura 16). Acreditávamos que em cada uma das condições estariam expressas isoenzimas diferentes de GST em citosol hepático de pacu. Vimos que as velocidades máximas, em torno de 0,12  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  foram bastante parecidas nas diferentes concentrações de oxigênio (Figura 16, Tabela 2). A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) foi praticamente a mesma no citosol hepático dos pacus que ficaram em normoxia e nos submetidos a reoxigenação (0,17  $\mu\text{M}$ ). Já os pacus que foram submetidos à hipoxia apresentaram uma  $K_M$  de 25  $\mu\text{M}$  e os pacus em hiperoxia uma  $K_M$  de 43  $\mu\text{M}$  (Tabela 2). Essas diferenças na constante de Michaelis-Menten, mesmo que pequenas, demonstram mudanças de afinidade entre as isoenzimas e o substrato 4-HNE de pacus submetidos a variadas concentrações de oxigênio na água. Isto pode ser de importância se lembrarmos que as isoenzimas de GST que reagem com 4-HNE em ratos e humanos são classificadas como classe alfa (Per Ålin e col., 1984), que é a classe de GST capaz de conjugar para eliminação 90% do 4-HNE intracelular (Hubatsch e col., 1998; Dourado e col., 2008) e que condições

de hipoxia, reoxigenação e hiperoxia causam aumento dos níveis de 4-HNE e alteração nos níveis de atividade de GST (Bagnyukova e col., 2006; Völkel e col., 2005). Então, isoenzimas terem mais ou menos afinidade pelo 4-HNE, em determinadas situações de oxigenação, pode permitir que a isoenzima tenha maior ou menor eficiência para eliminá-lo, garantindo assim que o 4-HNE não acumule na célula a ponto de provocar danos aos tecidos e órgãos. É muito importante ressaltar que a maioria dos trabalhos com tecidos de peixes que exibem níveis e atividades de GST não fazem uma padronização prévia para determinar quais concentrações de substrato são as ideais para garantir uma eficiência enzimática máxima. As atividades de GST são ensaiadas com concentrações de substrato previamente descritas para fígado de ratos, o que interfere e mascara, quase sempre, os reais níveis das atividades de GST presente nos peixes.

Padronizado o método, ensaiamos e comparamos as atividades das isoenzimas de GST que conjugam 4-HNE em citosol hepático de pacu e observamos que os níveis das isoenzimas estavam mais altos no verão do que no inverno (Figura 18), possivelmente pelo fato de que no verão os pacus produzam maiores quantidades de melatonina (Iseki e col., 2006) do que no inverno, já que estudos comprovam que a melatonina pode atuar aumentando os níveis de atividade das enzimas antioxidantes (Falcón 2009; Taysi e col., 2005). Pudemos observar que no inverno, os pacus submetidos à hipoxia e a reoxigenação tiveram suas atividades reduzidas (Figura 21) em comparação aos demais grupos. O fato de ser inverno, e os pacus apresentarem os menores níveis de melatonina justamente no inverno, nos faz supor que o rigoroso estresse oxidante foi o responsável pela perda das atividades das GST-4-HNE em citosol hepático de pacu. Dados mostram que as atividades de enzimas antioxidantes podem diminuir quando animais são expostos a condições severas de estresse oxidante devido aos danos causados à maquinaria molecular responsável pelos níveis das enzimas antioxidantes (Gechev e col., 2002; Wey e Lee, 2002; Stadtman e Levine, 2000). Uma situação danosa ocorre quando a taxa de formação das ERO é muito maior que a taxa de neutralização das mesmas. Nestas condições, uma grande quantidade de produtos oriundos do estresse oxidante é formada e se acumula na célula. Então, as enzimas podem ser inativadas de duas maneiras: a

primeira é pela ação direta das ERO sobre as proteínas (Stadtman e col., 1992), a peroxidação de proteínas. A segunda maneira é por meio dos produtos formados a partir da fragmentação dos lipídios de membrana, como o 4-HNE, que pode interagir com grupamentos sulfidrilas (SH) dos aminoácidos das proteínas (Stadtman e Levine 2000) desnaturando-as e causando perda de sua atividade. Enzimas como as GST são proteínas ricas em grupamentos sulfidrilas e podem ser inativadas devido a um estresse oxidante muito intenso. Importante ressaltar que esta perda de atividade drástica das isoenzimas de GST-4-HNE aconteceu no inverno, período no qual os pacus estão mais vulneráveis às ERO, pois nesta época estão com níveis baixos de melatonina, o principal antioxidante celular.

Experimentos de *immunoblot* realizados em nosso laboratório (Figura 22) com animais que não receberam melatonina e animais injetados com doses fisiológicas de melatonina mostram que animais que não receberam melatonina tiveram mais proteínas ligadas a 4-HNE. Isto pôde ser observado mais intensamente nos animais em hipoxia. Os "blottings" feitos com animais do inverno, juntamente com os dados das atividades das isoenzimas de GST-4-HNE desses mesmos animais (Figura 21), mostram que os animais submetidos a severa hipoxia (43 horas) e que não foram inoculados com melatonina, foram os animais que justamente tiveram as menores atividades de GST alfa e apresentaram as maiores taxas de carbonilação de proteínas. Estudos feitos por Hermes-Lima (2001) e Lushchak e col. (2005) mostraram relações inversas entre os níveis de atividade de GST e a concentração de produtos do estresse oxidante, principalmente carbonilação proteica. Juntamente com nossos achados, tais fatos nos levam a crer que a atividade GST-4-HNE das células do fígado de pacus é essencial para evitar danos oxidantes às proteínas e que a melatonina é essencial para prevenir uma elevação da concentração intracelular de 4-HNE, que se ocorrer, é capaz de inativar as isoenzimas antioxidantes de GST e permitir danos às células. Nossas evidências corroboram as teorias elaboradas por Gechev e col. (2002) e Stadtman (2000), as quais sugerem que os baixos níveis das atividades das enzimas devem-se a desnaturação das mesmas, acarretando em danos ainda maiores causados pelas ERO, ao DNA, lipídios e proteínas. Vale repetir que estas condições foram observadas no inverno, quando os níveis de melatonina dos animais são

mais baixos que nas demais épocas do ano, o que indica que no inverno o pacu pode ficar mais vulnerável a espécies reativas de oxigênio.

Trabalhos realizados com ratos mostram que os níveis fisiológicos de melatonina no plasma de hamsters são da ordem de  $10^{-12}$  M (Antolin e col., 1996). Estudos realizados com salmões *Oncorhynchus masou* também mostraram concentrações de melatonina em seus plasmas na ordem de  $10^{-12}$  M, com variações das concentrações diferentes durante o dia ( $640 \times 10^{-12}$  M) e de noite ( $1.076 \times 10^{-12}$  M) (Amano, 2003). Bubenik e col. (2000) publicaram um artigo que mostrou que as concentrações médias de melatonina no plasma de porcos são de aproximadamente  $129 \times 10^{-12}$  M de melatonina. Em robalos (*Dicentrarchus labrax*) a concentração de melatonina determinada no cerebelo variou de  $43 \times 10^{-12}$  M durante o dia até  $387 \times 10^{-12}$  M durante a noite (Bayarri e col., 2004). Baseando-nos nas concentrações plasmáticas de melatonina encontradas, realizamos experimentos para verificar o efeito *in vitro* da melatonina sobre as atividades de GST solúveis hepáticas de pacus sacrificados no verão e constatamos que concentrações de  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M e de  $10^{-7}$  M de melatonina provocavam inibição crescente da atividade GST-CDNB solúvel de fígado de pacu (Figura 19). Estudos realizados por Iseki e col. (2006) no Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais (CEPTA), em Pirassununga, SP, também mostraram que os níveis fisiológicos de melatonina no plasma do pacu são da ordem de  $10^{-12}$  M. Eles verificaram que as concentrações fisiológicas de melatonina no plasma eram maiores durante a noite do que durante o dia e que esses níveis mostraram mudanças sazonais significativas; à noite foram bem maiores na primavera ( $249 \times 10^{-12}$  M) e no verão ( $269 \times 10^{-12}$  M) e menores no outono ( $83 \times 10^{-12}$  M) e no inverno ( $86 \times 10^{-12}$  M). Tendo em vista os níveis fisiológicos de melatonina encontrados no plasma de pacu procuramos ensaiar as atividades de GST em citosol hepático de pacu com CDNB, com ETHA e com 4-HNE usando melatonina a  $10 \times 10^{-12}$  M,  $60 \times 10^{-12}$  M,  $120 \times 10^{-12}$  M e  $340 \times 10^{-12}$  M para saber se concentrações fisiológicas inibiriam várias isoenzimas de GST presentes no citosol de fígado de pacu. Verificamos que as atividades de CDNB-GST de fígado de pacu diminuíram com o aumento das concentrações de melatonina *in vitro* de  $60 \times 10^{-12}$  a  $340 \times 10^{-12}$  M (Figura 23). Nos tubos em que as GST foram ensaiadas com as maiores concentrações de melatonina ( $120 \times 10^{-12}$  e  $340 \times 10^{-12}$  M)

foram observadas quedas acentuadas da atividade, tanto nos animais em hipoxia quanto nos animais em normoxia. Constatamos também que as atividades das GST-CDNB dos animais submetidos à hipoxia não apresentaram queda de atividade quando ensaiadas *in vitro* com  $10 \times 10^{-12}$  M melatonina (Figura 23), só podendo ser inibida por concentrações de melatonina maiores do que  $10 \times 10^{-12}$  M. Isto pode ser vantajoso para as células, pois baixos níveis de melatonina não inibem algumas isoenzimas de GST, o que preveniria a célula contra o estresse oxidante. É curioso notar que quando o nível de melatonina aumenta na célula, a melatonina pode passar a combater as espécies reativas de oxigênio como um *scavenger*, não sendo mais necessário que os níveis de certas isoenzimas de GST fiquem aumentados. As atividades de GST-ETHA foram inibidas conforme a concentração de melatonina era aumentada no tubo de ensaio (Figura 23). As atividades de GST-ETHA não apresentaram diferença estatística entre os grupos de pacus em normoxia ou em hipoxia em nenhuma das concentrações presentes nos ensaios. O fato de que o ensaio de GST da fração citosólica hepática dos pacus submetidos à hipoxia com o substrato ETHA, que revela mais a atividade de isoenzimas pi, ter apresentado inibição mesmo pela mais baixa concentração de melatonina (Figura 23) reforça que as isoenzimas que só foram inibidas por concentração de melatonina maior que  $10 \times 10^{-12}$  M quando do ensaio com CDNB devem ser diferentes das isoenzimas pi. Não verificamos mudanças nos níveis das atividades de GST-4-HNE em citosol de fígado de pacu à medida que as concentrações de melatonina *in vitro* aumentavam (Figura 24). Este resultado pode ser explicado pela hipótese de que os níveis de atividade das isoenzimas alfa já serem constitutivamente os maiores em células do fígado de pacu, o que impediria que os seus níveis oscilem, independente de melatonina ou não, pois esta atividade deve ser imprescindível para neutralizar as espécies reativas de oxigênio nos pacus que evoluíram sob a pressão de estresse oxidante nas secas do Pantanal. Na concentração de 60 pM notamos uma diferença entre o grupo hiperoxia e os grupos reoxigenação e hipoxia. Na concentração de 120 pM, vimos uma diferença entre o grupo hiperoxia e reoxigenação.

Decidimos realizar experimentos *in vivo* de melatonina com o pacu, com doses que correspondessem aos níveis fisiológicos encontrados em seu



plasma. Primeiramente, construímos uma curva padrão com concentrações já conhecidas de  $10 \times 10^{-12}$ ,  $60 \times 10^{-12}$ ,  $120 \times 10^{-12}$  e  $340 \times 10^{-12}$  M de melatonina. Feita a curva padrão, passamos o extrato de plasma de pacu pela coluna de HPLC para saber quais eram os níveis de melatonina presentes no plasma dos pacus oriundos de Itaocara. As concentrações de melatonina encontradas no plasma dos pacus sob normoxia ( $1,2 \times 10^{-12}$  M) são da mesma ordem de grandeza que as encontradas na maioria dos outros animais, inclusive nos pacus usados por Iseki e col. (2006). Passada esta etapa, inoculamos os pacus com melatonina nas doses de 3 e 0,3 mg/kg de peixe para observar se estas doses seriam capazes de refletir as concentrações fisiológicas encontradas no extrato de plasma dos pacus de Itaocara. Os animais que receberam doses de 3 mg/kg ficaram esbranquiçados, fenômeno previamente observado por Hafeez (1970). Perda de equilíbrio e diminuição da atividade natatória, reportados anteriormente por López-Olmeda e col. (2006), também puderam ser observados. Nossos resultados (Tabela 3) revelam que passados 30 min após inoculação dos peixes com melatonina, na dose de 3 mg/kg, ocorreu um aumento da concentração de melatonina no plasma de 18 mil vezes ( $22.000 \times 10^{-12}$  M). Transcorridos 90 min, observamos que os níveis de melatonina começaram a baixar ( $2.800 \times 10^{-12}$  M), ou seja, a melatonina estava sendo realmente catabolizada. Depois de 180 minutos da injeção, a concentração no plasma já era de  $292 \times 10^{-12}$  M. Assim, resolvemos tratar os pacus com doses de melatonina de 0,3 mg/kg de peso. Com a dose de 0,3 mg/kg de peso, após 90 min, as concentrações alcançaram  $4,45 \times 10^{-12}$  M. Após 180 minutos os níveis começaram a baixar. Estes resultados indicam que quanto maior a dose com que o pacu é injetado, mais intenso é o catabolismo da melatonina (Tabela 3). O animal que recebeu 3 mg de melatonina acumulou no plasma níveis elevados, que foram prontamente removíveis, desde o começo do experimento, enquanto os que tiveram 0,3 mg/kg injetados passaram ao plasma concentrações menores de melatonina, provavelmente abaixo do limiar que provoque altas velocidades de sua remoção do plasma (Tabela 3). Uma vez realizado este experimento, estávamos certos das doses que deveriam ser injetadas nos animais. É muito importante mencionar que as injeções de melatonina nos pacus foram feitas de modo a garantir, no plasma, níveis de melatonina semelhantes aos níveis plasmáticos encontrados nos pacus da

natureza, e não simplesmente em doses aleatórias. Injetamos 0,3 mg de melatonina por quilograma de peixe, pois determinamos que é a dose que injetada nos pacus, via intracelomática, refletirá os níveis fisiológicos de melatonina encontrados no plasma, após 180 minutos, sem deixá-los com efeitos colaterais. Não é importante que pacus e outros animais sejam inoculados com doses farmacológicas de melatonina a fim de se demonstrar indução ou inibição enzimática, pois na natureza, e muito menos no Pantanal, não existe farmácia, à qual os animais possam recorrer para comprar melatonina em comprimidos.

Se fizermos uma análise dos níveis de atividade de GST-4-HNE dos animais injetados com melatonina, no verão e no inverno (Figura 21), constataremos uma diferença no perfil dos gráficos. Os resultados mostram que no inverno, as atividades dos peixes submetidos à hipoxia, reoxigenação ou hiperoxia, e que receberam melatonina, aumentaram, se comparada com seu grupo em normoxia sem melatonina. Já no verão, embora não significativamente, ocorreu o inverso, diminuição das atividades. Durante o inverno, o fato que mais chama a atenção, é o aumento das atividades das isoenzimas de GST-4-HNE nos animais que receberam melatonina (Figura 21) em relação às atividades das isoenzimas nos animais que não receberam melatonina. É no inverno que podemos notar que o grupo de pacus em normoxia tratados com melatonina apresentou o dobro de atividade de GST-4-HNE em relação às atividades do grupo de pacus em normoxia que não recebeu melatonina (Figura 21), fenômeno que também foi observado nas isoenzimas de GST-4-HNE de homogeneizados de cérebro de pacu ensaiadas em nosso laboratório. Não foi observada diferença entre os níveis de atividades de GST-CDNB em citosol hepático de pacus controle e pacus inoculados com doses que refletem as doses fisiológicas de melatonina (0,3 mg/kg) do plasma do pacu (Figura 20). Isto pode acontecer se as atividades de algumas isoenzimas de GST estiverem sendo inibidas e outras ativadas na presença de melatonina. Já para as isoenzimas de GST-ETHA, que também são responsáveis por neutralizar ERO em menor escala (REFS), foi observado um pequeno aumento nas atividades dos animais tratados com doses que refletem as doses fisiológicas de melatonina (0,3 mg/kg) encontradas no plasma do pacu (Figura 20).

O fato é que doses fisiológicas de melatonina aumentaram as atividades das isoenzimas de GST que conjugam 4-HNE no inverno. Inúmeros trabalhos com ratos mostram que a melatonina é um dos fatores que regulam os níveis das atividades das enzimas antioxidantes, atuando tanto sobre a transcrição dos genes codificadores destas enzimas como em suas atividades (Falcón 2009; Taysi e col., 2005). Esta regulação dos níveis das enzimas antioxidantes pela melatonina foi proposta por Martin e col. (2003) após observação de que as atividades das enzimas antioxidantes de ratos, tais como SOD e GPX, apresentavam ritmos endógenos bem definidos sob condições de claro e escuro. Isto é verdade tanto para a atividade enzimática como para expressão gênica destas enzimas. Tal ritmo sugeriu que as atividades e as expressões destas enzimas fossem dependentes do ciclo circadiano da melatonina (Falcón, 2009; Albarran e col., 2001; Diaz-Muñoz e col., 1985). Verificou-se que quando os animais eram expostos à iluminação constante, o ciclo endógeno de melatonina não ocorria e o aumento dos níveis e atividades das enzimas antioxidantes SOD e GPX durante a noite também não ocorriam (Martin e col., 2003). Baydas e col. (2002) constataram que a deficiência de melatonina causada por pinealectomia reduziu a atividade da GPX em vários tecidos de ratos. Estudos realizados por Okatani e col. (2000, 2001) mostraram que a administração de melatonina durante a gravidez estimulou a atividade de enzimas antioxidantes em feto de ratos e humanos. Antolin e col. (1996) mostraram que doses de melatonina na quantidade em que existe no soro de ratos causavam aumento dos níveis de RNAm de enzimas antioxidantes em córtex cerebral de hamsters. Estas informações, juntamente com nossos resultados, indicam que níveis fisiológicos de melatonina estão interligados ao desempenho das defesas antioxidantes dos vertebrados, incluindo o pacu.

## 6. CONCLUSÕES

Baseados nos achados enumerados abaixo:

- a) Os níveis de atividade de glutathione S-transferase das células do fígado de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), um peixe do Pantanal, estão entre os mais altos dentre os vertebrados até aqui estudados;
- b) A atividade de glutathione S-transferase das células do fígado do pacu que conjuga 4-hidroxinonenal é pelo menos duas vezes mais baixa no inverno em pacus que suportam hipoxia ou reoxigenação do que no verão.
- c) Concentrações fisiológicas de melatonina (entre 20 e 200 x 10<sup>-12</sup> M no plasma) não inibem *in vitro* a atividade antioxidante da glutathione S-transferase que conjuga o 4-hidroxinonenal com glutathione nas células do fígado do pacu, mas inibem as atividades de conjugação da glutathione com outros substratos;
- d) Quantidades fisiológicas de melatonina (entre 20 e 200 x 10<sup>-12</sup> M no plasma) recompõem, no inverno, injetadas em pacus sob normoxia, hipoxia e reoxigenação, as atividades hepáticas de glutathione S-transferase que conjuga 4-hidroxinonenal para os níveis do verão.
- e) Melatonina em concentrações fisiológicas pode provocar a diminuição da carbonilação de proteínas por 4-hidroxinonenal no fígado de pacus, principalmente nos pacus que resistem à hipoxia no inverno;

Concluimos:

- Que a melatonina é importante para manter em fígado de pacus a atividade antioxidante da glutathione S-transferase que conjuga 4-hidroxinonenal e que, no inverno, quando se formam os lagos isolados dos rios em decorrência da seca do Pantanal, os pacus sob hipoxia estão mais propensos a sofrer danos oxidantes em suas células hepáticas do que no verão, devido ao fato de que no inverno seus níveis circulantes de melatonina são mais baixos de que no verão.
- Que a hiperoxia é um estímulo independente de melatonina para manter os níveis da atividade hepática antioxidante da glutathione S-transferase que conjuga 4-hidroxinonenal, já que os pacus submetidos à hiperoxia, quer no verão, quer no inverno, apresentaram níveis normais desta atividade.

## REFERÊNCIAS

ALBARRAN M.T., LOPEZ-BURRILO S., PABLOS M.I. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *J. Pineal Res.* 30: 227-233, 2001.

AMANO M., LIGO K., IKUTA S., KITAMURA K., YAMAMORI. Daily variations in melatonin binding sites in the masu salmon brain. *Neurosci. Lett.* 350(1): 9-12, 2003.

ANDO K., FUJITA T. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 47: 213-18, 2009.

ANSARI N.H., WANG L., SRIVASTAVA S.K. Role of lipid aldehydes in cataractogenesis: 4-hydroxynonenal-induced cataract. *Biochem. Mol. Med.* 58: 25-30, 1996.

ANTOLIN I., RODRIGUEZ C., SAINZ R.M. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect of gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 10: 882-890, 1996.

AWASTHI Y., SHARMA R., CHENG J.Z., YANG Y., SHARMA A., SINGHAL S.S., AWASTHI S. Role of 4-hidroxinonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.* 24: 219-230, 2003.

AWASTHI Y.C., YANG Y., TIWARI N.K., PATRICK B., SHARMA A., LI S., AWASTHI. S. Regulation of 4-hidroxinonenal-mediated signaling by glutathione S-transferase. *Free Rad. Biol. Med.* 37: 607-619, 2004.

BAGNYUKOVA T. V., CHAHRAK O.I., LUSHCHAK V.I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78: 325-331, 2006.

BAYARRI M.J. LIGO M., MUÑOZ-CUETO J.A., ISORNA E., DELGADO M.J., CHAN P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 2004.

BAYDAS G., GURSU M.F., YILMAZ S. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci. Lett.* 323: 195-198, 2002.

BELL E.L., KLIMOVA T.T., EISENBART J. Site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* 177: 1029-1036, 2007.

BEYER C.E., STEKETEE J.D., SAPHIER D. Antioxidant properties of melatonin - an emerging mystery. *Biochem. Pharmacol.* 56: 1265-1272, 1998.

BITTMAN E.L., DEMSEY R.J., KARSSCH F.J. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the eye. *Endocrinology* 113: 2276-2283, 1983.

BLANCHETTE B., FENG X., SINGH B.R. Marine glutathione S-transferases. *Mar. Biotechnol (NY)*. 9: 513-542, 2007.

BOEUF G., FALCÓN J. Photoperiod and growth in fish. *Vie et Milieu*. 51: 237-246, 2001.

BOGAARDS J.J.P., VAN OMMEN B., VAN BLADEREN P.J. Purification and characterization of eight glutathione S-transferases isoenzymes of hamster – comparison of subunit composition of enzymes from liver, kidney, testis, pancreas and trachea. *Biochem. J.* 286: 383-388, 1992.

BRAHIMI-HORN C., MAZURE N., POUYSSEGUR J. Signalling via the hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  requires multiple post-translational modifications. *Cell Sign* 17: 1-9, 2005.

BRASEN J.H., HAKKINEN T., MALLE E., BEISIEGEL U., YLA-HERTUALA S. Patterns of oxidized epitopes, but not NF- $\kappa$ B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis*. 166: 13-21, 2003.

BUBENIK G.A., PANG S.F., COCKSHUT J.R., SMITH P.S., GROVUM L.W., FRIENDSHIP R.M., HACKER R.R. Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *J. Pineal Res.* 28: 9-15, 2000.

BUONOCORE G., GROENENDAAL A. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal and Neonatal Med.* 12: 287-295, 2007.

CAMACHO L., ALVES M.V., CUNHA BASTOS J., FELZENSZWALB I., CUNHA BASTOS V.L.F. Effects of  $\beta$ -naphthoflavone on the levels of glutathione S-transferase from liver of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 191-196, 2000.

CATALÁ A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyl-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157: 1-11, 2009.

CHANCE B., SIES. H. BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605, 1979.

CHENG J.Z., SHARMA R., YANG Y., SINGHAL S.S. Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 in an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276: 41213-41223, 2001.

CLAUSTRAT B., CHIQUET C., BRUN J., CHAZOT G. Melatonin, Light and migraine. In: Pandi-Perumal S.R., Cardinali D.P., editors. *Melatonin: biological basis of its function in health and disease*. Landes Bioscience. 218-223, 2005.

CLAUSTRAT B., JOCELYNE B., CHAZOT G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med. Rev.* 9: 11-24, 2005.

COMMONER B., TOWNSEND J., PAKE G. Free radical in biological materials. *Nature* 174: 689-691, 1954.

COON S.L., KLEIN D.C. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252: 2-10, 2006.

CORD M., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 224: 6049-6055, 1969.

COSTA V.M.V., AMORIM M.A., MORADAS FERREIRA P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Rad. Biol. Med.* 33: 1507-1515, 2002.

CZECZOT H., SCIBIOR D., SKRZYCKI M., PODSIAD M. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Acta Biochim. Polonica* 53: 237-241, 2006.

DELERIVE P., MONTE D., DUBOIS G., *et al.*, The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO*. 21: 42-48, 2002.

DIAZ-MUÑOZ M., HERNANDEZ-MUÑOZ R., SUAREZ J., CHAGOYA DE SANCHEZ V. Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neuroscience*. 16: 859-863, 1985.

DOURADO D.F.A.R., FERNANDES P.A., RAMOS M.J. Mammalian cytosolic glutathione transferases. *Curr. Prot. Pept. Sci.* 9: 325-337, 2008.

DOWNEY J.M. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 487-504, 1990.

EGAAS E., FALLS J.G., DAUTERMAN W.C. A study of gender, strain and age differences in mouse liver glutathione S-transferases. *Comp. Biochem. Physiol.* 110C: 35-40, 1995a.

EGAAS E., FALLS J.G., SVENDSEN N.O., RAMSTAD H., SKAARE, J.U., DAUTERMAN W.C. Strain- and sex-specific differences in the glutathione S-transferase class pi in the mouse examined by gradient elution of the glutathione-affinity matrix and reverse-phase high performance liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* 1243: 256-264, 1995b.

ESTERBAUER H., SCHAUR R.J., ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malonaldehyde, and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-128, 1991.

FALCÓN J. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 8: 121-162, 1999.

FALCÓN J., BESSEAU I., SAUZET S., BOEUF G. Melatonin effects on hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* 18: 81-88, 2007a.

FALCÓN J., BESSEAU I., SAUZET S., BOEUF G. Mélatonine et régulations neuroendocrines chez le poisson. *J. Soc. Biol.* 201: 21-29, 2007b.

FERRY G., UBEAUD C., LAMBERT P. H., BERTIN S., COGÉ F., CHOMARAT P. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: Investigations with both indoleamine 2,3- dioxygenase and myeloperoxydase. *Biochem. J.* 388: 205-215, 2005.

FOLKARD S., ARENDT J., ALDHOUS M. Melatonin stabilizes sleep onset time in a blind men without entrainment of cortisol or temperature rhythm. *Neurosci. Lett.* 113: 193-198, 1990.

FORD T., BEITINGER, T.L. Temperature tolerance in the goldfish, *Carassius Auratus*. *J. Therm. Biol.* 30: 147-142, 2005.

FRIDOVICH I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880, 1978.

GARCIA J.H., LASSEN N.A., WEILLWE C., SPERLING B., NAKAGAWARA, J. Ischemic stroke and incomplete infarctation. *Stroke* 27: 761-765, 1996.



GECHEV T., GADJEV I., VAN BREUSEGEM F., INZÉ D., DUKIANDJIEV S., TONEVA V., MINKOV I. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 708-714, 2002.

GHEZZI P., BONETTO V. Redoxi proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics.* 3(7): 1145-1153, 2003.

GUZY R.D., SCHUMACKER P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91(5): 807-819, 2006.

HABIG W.H., PABST M.J., JACOBY W.B. Glutathione S-transferases: The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.

HAFEEZ M.A. Effect of melatonin on body coloration and spontaneous swimming activity in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 36(4): 639-658, 1970.

HAMILTON D.S., ZHANG X., DING Z., HUBASTSCH I., MANNERVIK B. Mechanism of glutathione transferase catalyzed conversion of antitumor 2-crotonyloxymethyl-2-cycloalkenones to GSH adducts. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 15049-15058, 2003.

HARDLAND R. Antioxidative protection by melatonin. Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27: 119-130, 2005.

HARDLAND R., FUHRBERG B. Ubiquitous melatonin. Presence and effects in unicells, plants and animal. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 2: 25-45, 1996.

HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11(3): 298-300, 1956.

HAYES J.D., FLANAGAN J.U., JOWSEY I.R. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 51-88, 2005.

HAYES J.D., PULFORD D.J. The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(6): 445-600, 1995.

HEE X., LIN G.X., CHEN M.G., MA Q. Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 21(7): 1375-1383, 2008.

HEE X., LIN G.X., CHEN M.G., ZHANG J.X., MA Q. Protection against chromium (VI) induced oxidative stress and apoptosis by Nrf2. Recruiting Nrf2 into the nucleus and disrupting the nuclear Nrf2/Keap1 association. *Toxicol. Sci.* 98(1): 298-309, 2007.

HERMEZ -LIMA M., STOREY K.B. Role of antioxidant in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am J Physiol.* 265: 646-652, 1993.

HERMEZ-LIMA M., WILLMORE W. G., STOREY K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 271-280, 1995.

HERMES-LIMA M., STOREY K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stresses in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*120: 437- 48, 1998.

HERMES-LIMA M., STOREY J.M., STOREY K.B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell Mol. Resp. stress.* 2: 263-287, 2001.

HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVÍN T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 133: 537-56, 2002.

HIRATA F., HAYAISHI O., TOKUYAMA T., SENOH S. *In vitro* and *in vivo* formation of two new metabolites of melatonin. *J. Biol. Chem.* 249: 1311-1313, 1974.

HOCHACHKA P.W. Adaptability of metabolic efficiencies under chronic hypoxia in man. In: HOCHACHKA P.W., LUTZ P.L., SICK T., ROSENTHAL M., Van den THILLART G. (Eds.), *Surviving hypoxia*. CRC Press, Boca Raton, F.L., 127-135, 1993.

HOCHACHKA P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234-241, 1986.

HOCHACHKA P.W., BUCK L.T., DOLL C.J., LAND S.C. Unifying theory of hypoxic tolerance: molecular/ metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 9493-9498, 1996.

HOCHACHKA P.W., SOMERO G.N. *Biochemical adaptation*. Princeton University Press, USA, p.355, 1984.

HOLM P.J., MORGENSTERN R., HERBERT H. The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22<sub>1</sub>2<sub>1</sub> crystals. *Biochem. Biophys. Acta.* 1594: 276-285, 2002.

HUBATSCH I., RIDDERSTRÖM M., MANNERVIK B. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *J. Biochem.* 330: 175-179, 1998.

HURST R., BAO Y., JEMTH P., MANNERVIK B., WILLIAMSON G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferase. *Biochem. J.* 332: 97-100, 1998.

ISEKI K.K., NEGRÃO J.A., CASTRUCCI A.M.L. Seasonal changes on plasma levels in the fresh water teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. Tese de Doutorado defendida no Dep. Fisiologia, IB/USP em 2006.

JAKOBSSON P.J., MORGENSTERN R., MANCINI J., FORD-HUTCHINSON A., PERSSON B. Common structural features of mapeg – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 8: 689-692, 1999.

JAMES S.P., SACK D.A., ROSENTHAL N.E. Melatonin administration and insomnia. *Neuropsychopharmacology* 3: 19-23, 1990.

JEŽEK P., HLAVATÁ L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 2478-2503, 2005.

JONES D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295: C849-C866, 2008.

KERMAN M., CIRAK B., OZGUNER M.F. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? *Exp. Brain Res.* 163 (3): 406-410, 2005.

KIRCHIN M.A., MOORE M.N., DEAN R.T., WINSTON G.W. The role of oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in mussels. *Mar. Environ.* 34: 315-320, 1992.

KIVELA A., KAUPPILA A., YLOSTAO P. Seasonal menstrual and circadian secretions of melatonin, gonadotropins and prolactin in woman. *Acta Physiol. Scand.* 132: 321-327, 1988.

KLASSEN, C.D., AMDUR, M.O., DOULL J. *Toxicology: the Basic Science of Poison.* 5<sup>a</sup> Ed. New York: McGraw Hill, 1996.

LADNER L.J.E., PARSONS J.F., RIFE C.L., DILLILAND G.L., ARMSTRONG R.N. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochem. J.* 43: 352-361, 2004.

LAMÉ M.W., SEGALL H.J. *In vitro* effects of trans-4-hydroxy-2-alkenals on mouse liver cytochrome P-450. *Chem. Biol. Interact.* 62: 59-74, 1987.

LANE E.A., MOSS H.B. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 1214-1216, 1985.

LAURENT A., PERDU-DURAND E., ALARY J., DEBRAUWER L., CRAVEDI J.P. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation in rat precision-cut liver slices. *Toxicol. Lett.* 114: 203-214, 2000.

LEE J.Y., JE J.H., JUNG K.J., WU B.P., CHUNG H.Y. Induction of endothelial iNOS by 4-hydroxyhexenal through NF- $\kappa$ B activation. *Free Rad. Biol. Med.* 37: 539-548, 2004.

LEIERS B., KAMPKÖTTER A., GREVELDING C.G., LINK C.D., JOHNSON T.E., HENKLE D.K. A stress-responsive glutathione S-transferase confers resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 34:1405-1415, 2003.

LERNER A.B., CASE J.D., TAKAHASHI Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2057-2058, 1958.

LEVINE R.L., GARLAND D., OLIVIER C.N., AMICI A., CLIMENT I., LENZ A.G., AHN B. W., SHALTIEL S., STADTMAN E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzimol.* 186: 464-478, 1990.

LI Y-J, OLIVEIRA S.A., XU P., MARTIN E.R., STINGER J.E., SCHERZER C.R., HAUSER M. A., SCOTT W.K., SMALL G.W., NANCE M.A., WATTS R.L. et al. Glutathione S-transferase omega-1 modifies age-at-onset of Alzheimer disease and Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.* 12: 3259-3267, 2003.

LIEN S., LARSSON A.K., MANNERVIK B. The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem. Pharmacol.* 63: 191-197, 2002.

LISA F.D., CANTON M., PETRONILLI V. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochem. Biophys. Acta* 1366: 69-78, 1998.

LÓPEZ-OLMEDA J.F., MADRID A.J., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 144: 180-187, 2006.

LOVE M.R. The Chemical Biology of Fishes, vol. II. Acad. Press, London, 1980.

LOVELL M.A., XIE C., MARKESBERY W. R. Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurology* 51: 1562-1566, 1998.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with Follin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

LUSHCHAK V.I., LUSHCHAK L.P., MOTA A.A., HERMES-LIMA M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280: R100-R107, 2001.

LUSHCHAK V.I., BAGNYUKOVA T.V., LUSHCHAK O.V., STOREY J.M., STOREY, K.B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1319-1330, 2005.

LUSHCHAK V.I., BAGNYUKOVA T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 144B: 283-289, 2006a.

LUSHCHAK V.I., BAGNYUKOVA T.V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148B: 390-397, 2007.

LUTZ P.L., NILSSON G.E. Contrasting strategies for anoxic brain survival - glycolysis up or down. *J. Exp. Biol.* 200: 411-419, 1997.

MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* 125(3): 376-393, 2009.

MALLO C., ZAIDAN R., GALY G. Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38: 297-301, 1990.

MANDA K., UENO M., ANZAI K. AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *J. Pineal Res.* 42: 386-393, 2007.

MANNERVIK B., DANIELSON U.H. Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 23: 283-337, 1988.

MANNERVIK B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzimol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 57: 357-417, 1985.

MANOLESCU B., OPREA E., BUSU C., CERCASOV C. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signaling pathway. *Biochimie* 91: 1347-1358, 2009.

MARTIN V., SAINZ R.M., MAYO J.C. Daily rhythm of gene expression in rat superoxide dismutases. *Endocr. Res.* 29: 83-95, 2003.

MARTINEZ-LARA E., TORIBIO F., LÓPEZ-BAREA J., BÁRCENA J. A. Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comp. Biochem Physiol.* 113C: 215-220, 1996.

MAURIZ J.L., MOLPECERES V., GARCÍA-MEDIAVILLA, M.V., GONZÁLEZ P., BARRIO J.P., GONZÁLEZ-GALLEGO J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J. Pineal Res.* 42: 222-230, 2007.

MAYER I., BORNSTAF C., BORG B. Melatonin in non-mammalian vertebrates: physiological role in reproduction? *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 515-531, 1997.

MEYER D.J., COLES B., PEMBLE S.E., GILMORE K.S., FRASER G.M., KETTERER B. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274: 409-414, 1991.

MITTAL C.K., MURAD F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3'5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4360-4364, 1977.

NEGRE-SALVAYRE A., COATRIEUX C., INGUENEAU C., SALVAYRE R. Advanced lipid peroxidation and products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 153: 6-20, 2008.

NIKINMAA M. Oxygen-dependent cellular functions – why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A: 1-16, 2002.

NIKINMAA M., REES B.B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R1079-1090, 2005.

NILSSON G., RENSHAW G.M.C. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J. Exp. Biol.* 207: 3131-3139, 2004.

NORDBERG, J., ARNÉR E.J.A. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. Med.* 31:1287-1312, 2001.

OKATANI Y., WAKATSUKI A., KANEDA C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J. Pineal Res.* 28: 89-96, 2000.

OKATANI Y., WAKATSUKI A., SHINIHARA K. Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J. Pineal Res.* 30: 199-205, 2001.

OLMEDA-LÓPEZ J.F., MADRID J.F., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comp. Biochem Physiol. Part A.* 144: 180-187, 2006.

ONU: Water for people water for life; The United Nations, World Water Development Report. 2005.

OTTO D.M.E., MOON T.W. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 141-147, 1996.

PANDI-PERUMAL S.R., SRINIVASAN V., MAESTRONI G.L., CARDINALI D.P., POEGGELER B., Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal?. *FEBS J.* 273: 1813-1838, 2006.

PARVEZ M.A.S., PANDEY F.A., KAUR M., REHMAN H., RAISUDDIN S. Fly ash leachate induces oxidative stress in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environm. Inter.* 30: 933-938, 2004.

PER ÅLIN U., DANIELSON H., MANNERVIK B. 4 – Hydroxyalk – 2 – enals are substrates for glutathione transferases. *FEBS.* 179(2): 267-277, 1985.

PETERSON, G.L. A simplification of protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 246- 356, 1977.

PHAM R.T., GARDNER J.L., GALLAGHER E.P. Conjugation of 4-hydroxynonenal by largemouth bass (*Micropterus salmoides*) glutathione S-transferases. *Mar. Environ. Res.* 54: 291-295, 2002.

PIALOUX V., MOUNIER R., BROWN A.D. Relationship between oxidative stress and HIF-1 alfa mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 46: 321-326, 2009.

POEGGELER B., REITER R.J., TAN D.X. Melatonin hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: A hypothesis. *J. Pineal Res.* 14: 151-168, 1993.

POEGGELER B., THUERMAN S., DOSE A., SCHOENKE M., BURKHARDT S., HARLAND R. Melatonin's unique radical scavenging properties - Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* 33: 20-30, 2002.

POLI G., SCHAUR R.J., SIEMS W.G., LEONARDUZZI G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med. Res. Reviews* 28: 569-631. 2008a.

POLI G., BIASI F., LEONARDUZZI G. 4-hydroxynonenal-protein adducts: a reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol. Aspects Med.* 29: 67-71, 2008b.

POTTER V.R. Tissue homogenates. In: Hirs, C.H W. Ed. *Methods in Enzymology: General Preparation Producers-part II.* New York. Academic Press 1: 10-15, 1955.

RABEK J.P., BOYLSTON W.H., PAPACONSTANTINO J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:566-572, 2003.

RAZA H., AHAMED I., JOHN A. Tissue specific expression and immunohistochemical localization of glutathione S-transferase in streptozotocin induce diabetic rats: modulation by *Momordica charantia* (karela) extract. *Life Sci.* 74: 1503-1511, 2004.

REITER R.J. Reactive oxygen intermediaries, molecular damage, and aging: Relation to melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854: 410-424, 1998.

REITER R.J. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664, 1993.

RICE M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23: 209-216, 2000.

RODRIGUEZ C., MAYO R.C., SAINSZ R.M., ANTOLIN I., HERRERA F., REITER R.J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36: 1-9, 2004.

ROTH S., DRÖGE W. Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell. Immunol.* 108: 417-424, 1987.

RUUGE E.K., LEDENEV A.N., LAKOMKIN V.L., KONSTANTINOV A.A., KSENZENKO, M.Y. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Suppl.* 261: 81-86, 1991.

SANDHU S.K., KAUR G. Alterations of oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology* 3: 161-173, 2002.



SACK R.L., LEWY A.J., ERB D.L. Human melatonin production decreases with age. *J. Pineal. Res.* 3: 379-388, 1986.

SCHAEFER M., HARDELAND R. The melatonin metabolite *N*<sup>1</sup>-acetyl-methoxykynuramine is a potent singlet oxygen scavenger. *J. Pineal Res.* 46: 49-52, 2009.

SCHMIDT H., KAMP G. The Pasteur effect in facultative anaerobic metazoan. *Experimentia* 52: 440-448, 1996.

SCHRECK R., BAEUERLE P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- $\kappa$ B transcriptional factor and HIV-1. *Trends Cell Biol.* 1: 30-42, 1991.

SÉBERT M.E., LEGROS C., WELTZIEN F.A., *et al.* Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *J. Neuroendocrinol.* 20: 917-929, 2008.

SHARMA M., GUPTA Y.K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in brain and cognitive impairment. *Life Sci.* 68 (9): 1021-1029, 2001.

SHARMA R., BROWN D., AWASTHY S., YANG Y., SHARMA A., PATRICK B. *et al.* Transfection with 4-hydroxynonenal metabolizing glutathione S-transferases isoenzymes leads to phenotypic transformation and immortalization of adherent cells. *Eur. J. Biochem.* 271: 1690-1701, 2004a.

SHARMA R., YANG Y., SHARMA A., AWASTHI S., AWASTHI Y.C. Antioxidant role of glutathione S-transferase: Protections against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox. Signal.* 6: 289-300, 2004b.

SHEEHAN D., MEADE G., FOLEY V.M., DOWD C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360: 1-16, 2001.

SIEMS W., GRUNE T. Intracellular metabolism of 4-HNE. *Mol. Aspects Med.* 24: 167-175, 2003.

SPRENGER J., HARDELAND R., FUHRBERG B., HAN S.Z. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytology* 64: 209-213, 1999.

SRINIVASAN V., PANDI-PERUMAL S.R., MAESTRONI G.J.M., ESQUIFINO A.I., HARDLAND R., CARDINALI D.P. Role of melatonin in neurodegenerative disease. *Neurotox. Res.* 7: 293-318, 2005.

STADTMAN E.R. Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224, 1992.

STADTMAN E.R., LEVINE R.L. Protein oxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899:191-208, 2000.

STEINBACK M.J., KHAN A.U., KARNOSVISKY M.J. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem.* 268: 15649-15664, 1993.

SULTANA R., BUTTERFIELD A. Oxidatively modified GST and MRP1 in Alzheimer disease brain: implications for accumulation of reactive lipid peroxidation products. *Neurochem. Res.* 29: 2215-2220, 2004.

TAN D.X., MANCHESTER L.C., BURKHARDT S., SAINZ R.M., MAYO J.C., KOHEN R, SHOHAMI E., HUO Y.S., HARDELAND R., REITER R.J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15, 2294–2296, 2001.

TAYSI S., UCUNCU H., ELMASTAS M., AKTAN B., BUYUKOKUROGLU M.E. Effect of melatonin on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with effusion in guinea pigs. *J. Pineal Res.* 39: 283-286, 2005.

TOUITOU F., FEVRE M., BOGDAN A. Patterns of plasma melatonin with ageing and mental condition: Stability of nyctohemeral rhythms and difference in seasonal variations. *Acta Endocrin.*106: 145-151, 1984.

TRICOIRE H., LOCATELLI A., CHEMINEAU P., MALPAUX B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143: 84-90, 2002.

TURRENS J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552: 335-344, 2003.

VERA L.M., PEDRO N., GÓMEZ-MILAN E., DELGADO M.J., SÁNCHEZ-MUROS M.J. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol. Behav.* 90: 518-524, 2007.

VIJAYALAXMI J., REITER R.J., TAN D.M.D., HERMAN T.S., THOMAS C.R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys.* 59: 639-653, 2004.

VLIES D.V.D., PAP E. H.W., POST P.J.A., CELIS J.E., WIRTZ K.W.A. Endoplasmic reticulum resident proteins of normal human dermal fibroblasts are the major targets for oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 366: 825-830, 2002.

VÖLKEL W., ALVAREZ-SÁNCHEZ R., WEICK I., MALLY A., DEKANT W., PÁHLER A. Glutathione conjugates of 4-hydroxy-2(E)-nonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress induced lipid peroxidation in rats. *Free Rad. Biol. Med.* 38: 1526-1536, 2005.

WALDHAUSER F., DIETZEL M. Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: Role in puberty control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 453: 205-214, 1985.

WALKER S.T., MANLE D., BYTHELL J.C., THOMASON J.C. Oxidative-stress: comparison of species specific and tissue specific effects in the marine bivalves *Mytilus edulitos* and *Dosinia lupinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127(B): 347-355, 2000.

WEI Y.H., LEE H.C. Oxidative stresses, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* 227: 671-682, 2002.

WILLMORE W.G., STOREY K.B. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273: R219-25, 1997.

WEIGEL A.L., HANDA J.T., HJELMELAND L.M. Microarray analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HNE, or tBH treated ARPE-19 cells. *Free Rad. Biol. Med.* 33: 1419-1432, 2002.

WHEATLEY R.A. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends Analyt. Chem.* 19: 617-628, 2000.

WILHELM FILHO D., TORRES M.A., ZANIBONI-FILHO E., PEDROSA R.C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 224: 349-357, 2005.

WU D., CEDERBAUM A.I. Alcohol oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Res. Health* 27: 277-284, 2003.

YANG Y., SHARMA A., PATRICK B., SINGHAL S.S., ZIMNIAK P., AWATHI S., AWASTHI Y.C. Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA irradiation mediated signaling for apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 41380-41388, 2003.

ZARKOVIC N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.* 24: 281-291, 2003.

ZISAPEL N. The use of melatonin for the treatment of insomnia. *Biol. Signals* 8: 84-89, 1999.