



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

AMANDA DE OLIVEIRA ARAÚJO

**ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA E DESENVOLVIMENTO
CEREBRAL: ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS JOVENS**

**RECIFE
2022**

AMANDA DE OLIVEIRA ARAÚJO

**ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA E DESENVOLVIMENTO
CEREBRAL: ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS JOVENS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

**RECIFE
2022**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Araújo, Amanda de Oliveira .

Administração de melatonina e desenvolvimento cerebral: análise de parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos em ratos jovens. / Amanda de Oliveira Araújo. – 2022.

63 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e fisiologia, 2022.

Inclui referências.

1. Ansiedade. 2. Atividade elétrica cerebral. 3. Memória. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo. (orient.). II. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-098

AMANDA DE OLIVEIRA ARAÚJO

ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA E DESENVOLVIMENTO
CEREBRAL: ANÁLISE DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
ELETROFISIOLÓGICOS EM RATOS JOVENS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Ângela Amâncio dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Jailane de Souza Aquino
Universidade Federal da Paraíba

Data: 25/05/2022

Dedico este trabalho a Deus, minha família e todos aqueles que me acompanharam durante esses anos. Mesmo em um momento conturbado e delicado, foi uma experiência enriquecedora para minha formação pessoal e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e perseverança para superar todas as dificuldades, e, por ter me abençoado colocando tantos anjos no meu caminho para me ajudar quando mais precisei.

Ao meu orientador, Rubem Carlos Araújo Guedes, pela paciência, correções e conselhos. Agradeço pelas lições e por compartilhar seus conhecimentos, me guiando com tanta sabedoria.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo incentivo de sempre, por compreender que em certos momentos precisei me ausentar para dar seguimento aos experimentos e, principalmente, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos. O amor de vocês é meu combustível diário.

Ao meu namorado, Ricardo Lemke, por todo suporte que me foi dado durante minha permanência em Recife, pelo seu amor, compreensão, companheirismo e cuidado quando mais precisei.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio, Amanda Brás, Arthur Noya, Danielle Dutra, Fernando Cavalcanti, Luísa Filgueira e Victor Palmares, que sempre estiveram dispostos a me ajudar com tanta dedicação nos protocolos, mesmo durante a pandemia, permitindo a realização desse projeto. E ainda, a UFPE, por proporcionar um ambiente com condições possíveis de ensino e pesquisa.

Agradeço ao biotério de Nutrição, pelo fornecimento dos ratos para a minha pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro para realização do projeto e concessão da bolsa de Pós-Graduação.

E a todos que direta e indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu mais sincero agradecimento.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

A melatonina (MLT) é um hormônio sintetizado a partir do triptofano. Seus efeitos benéficos são bem descritos em algumas doenças neurológicas. Neste estudo, ratos Wistar machos receberam, do 7º ao 27º dia pós-natal (DPN), em dias alternados, solução salina (grupo controle), ou 10 mg/kg/dia ou 40 mg/kg/dia de MLT (grupos MLT-10 e MLT-40), ou nenhum tratamento (grupo intacto). Entre DPN30 e DPN34 os animais foram avaliados no aparato de campo aberto (CA), primeiro para ansiedade (DPN30) e depois para tarefas de memória de reconhecimento de objetos: de posição espacial - RP (DPN31) e reconhecimento de formas - RF (DPN32). No DPN34, foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE). Do DPN36 a 42, registrou-se o fenômeno eletrofisiológico conhecido como depressão alastrante cortical (DAC). O tratamento com MLT não alterou o peso corporal e a glicemia dos animais, mas na menor das duas doses que utilizamos teve um impacto significativo, sobre os testes comportamentais, ANOVA indicou diferenças intergrupos para os parâmetros “entradas na área central” do campo aberto ($F [3, 28] = 8,706; p < 0,001$) e “tempo na área central” ($F [3, 27] = 5,993; p = 0,003$) e no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) indicou diferenças intergrupos para dois parâmetros avaliados: entradas nos braços abertos ($F [3, 25] = 4,200; p = 0,015$) e tempo nos braços abertos ($F [3, 28] = 10,036; p < 0,001$), indicando menor ansiedade. No teste de memória, ANOVA revelou diferenças intergrupos no reconhecimento espacial ($F [3,29] = 7,813; p < 0,001$), mas não no reconhecimento de formas ($F [3,25] = 2,025; p = 0,136$). A dose mais baixa de MLT (10 mg/kg/dia) desacelerou significativamente a DAC ($2,86 \pm 0,14$ mm/min) em comparação com os grupos controle ($3,31 \pm 0,09$ mm/min e $3,25 \pm 0,10$ mm/min; grupo intacto e veículo, respectivamente). No entanto, a dose mais alta (40 mg/kg/dia) acelerou a DAC ($3,96 \pm 0,16$ mm/min; $p < 0,01$). Nossos achados sugerem que a administração de MLT, durante o desenvolvimento cerebral, apresenta potencial para atuar como antioxidante quando administrado em baixas doses, mas como pró-oxidante quando administrado em altas doses, no que se refere a parâmetros comportamentais sugestivos de ansiedade e memória e também a parâmetros eletrofisiológicos (DAC), dando-nos oportunidade para discutir possíveis implicações clínicas para tais efeitos.

Palavras-chave: Ansiedade; Atividade elétrica cerebral; Memória.

ABSTRACT

Melatonin (MLT) is a hormone synthesized from tryptophan. Its beneficial effects are well described in some neurological diseases. In this study, male Wistar rats received, from the 7th to the 27th postnatal day (PND), on alternate days, saline solution (control group), or 10 mg/kg/day or 40 mg/kg/day of MLT (MLT groups). -10 and MLT-40), or no treatment (intact group). Between DPN30 and DPN34, the animals were evaluated in the open field apparatus (OF), first for anxiety (PND30) and then for object recognition memory tasks: spatial position - RP (PND31) and shape recognition - RF (PND32). In DPN34, they were tested in the elevated plus maze (EPM). From PND36 to 42, the electrophysiological phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) was recorded. Treatment with MLT did not change the body weight and blood glucose of the animals, but at the lower of the two doses we used it had a significant impact on behavioral tests, ANOVA indicated intergroup differences for the parameters "entries in the central area" of the OF ($F [3, 28] = 8.706$; $p < 0.001$) and "time in the central area" ($F [3, 27] = 5.993$; $p = 0.003$) and in the EPM indicated intergroup differences for two parameters evaluated: entries in the open arms ($F [3, 25] = 4.200$; $p = 0.015$) and time in the open arms ($F [3, 28] = 10.036$; $p < 0.001$), indicating less anxiety. In the memory test, ANOVA revealed intergroup differences in spatial recognition ($F [3.29] = 7.813$; $p < 0.001$), but not in shape recognition ($F [3.25] = 2.025$; $p = 0.136$). The lowest dose of MLT (10 mg/kg/day) significantly decelerated CSD (2.86 ± 0.14 mm/min) compared to the control groups (3.31 ± 0.09 mm/min and $3, 25 \pm 0.10$ mm/min; intact and vehicle group, respectively). However, the highest dose (40 mg/kg/day) accelerated CSD (3.96 ± 0.16 mm/min; $p < 0.01$). Our findings suggest that the administration of MLT, during brain development, has the potential to act as an antioxidant when administered in low doses, but as a pro-oxidant when administered in high doses, with regard to behavioral parameters suggestive of anxiety and memory and also to electrophysiological parameters (CSD), giving us the opportunity to discuss possible clinical implications for such effects.

Key words: Anxiety; Brain electrical activity; Memory.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal e distribuição de macronutrientes por 100g de ração comercial padrão para roedores Nuvilab®	28
Tabela 2 - Teste T-pareado para diferenças de glicemia antes e depois da administração de MLT no DNP27.....	34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Síntese da melatonina (MLT) pela glândula pineal em sincronização com o ciclo claro/escuro.....16
- Figura 2** - Potenciais mecanismos e efeitos benéficos da MLT no SNC.....21
- Figura 3** - Imagens da primeira e segunda sessão do teste de reconhecimento de uma nova localização espacial no campo aberto.....31
- Figura 4** - Imagens da primeira e segunda sessão do teste de reconhecimento de uma nova forma no campo aberto.....32
- Figura 5** - Esquema experimental de acordo com a idade dos animais.....33
- Figura 6** - Pesos corporais médios dos dois grupos controle (INTACTO e VEÍCULO) e dos dois grupos tratados com 10mg/kg/dia e 40mg/kg/dia de MLT (grupos MLT-10 e MLT-40, respectivamente). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Os animais foram pesados nos dias 7, 14, 21 e 28 de vida pós-natal. O tratamento com MLT não influenciou o ganho de peso.....34
- Figura 7** - Glicemia dos grupos controle (intacto e veículo) e tratados com MLT (MLT-10 com 10mg/kg/dia e MLT-40 com 40mg/kg/dia). A glicemia foi aferida no DPN27 4 horas antes e 4 horas após a administração de MLT; nessas condições, o tratamento com MLT não influenciou na glicemia dos animais tratados e não tratados.35
- Figura 8** - **(A)** Parâmetros comportamentais avaliados no aparelho de campo aberto (CA), medidos quando os ratos atingiram 30 dias de idade. **(B)** Atividade comportamental no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), em ratos de 34 dias de idade. Em ambos os testes, os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os grupos marcados, acima das barras, com letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA mais teste de Holm-Sidak).36
- Figura 9** - Índices de discriminação de ratos submetidos ao teste de memória de reconhecimento de objetos. O gráfico superior desta figura refere-se ao reconhecimento de uma nova posição espacial (DPN 31) de um objeto já conhecido (ou familiar). O gráfico inferior representa o reconhecimento de um objeto com uma forma nova (DPN 32), mas numa posição espacial

familiar. Os grupos marcados com letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Holm-Sidak).36

Figura 10 - Em **(A)** mostra-se o eletrocorticograma (E) e o registro da variação lenta de potencial (P) em dois pontos da superfície do hemisfério direito, mostrando a passagem da DAC. O diagrama do crânio mostra as posições 1 e 2 do registro, a posição do eletrodo de referência comum (R), nos ossos nasais, e o ponto de aplicação do estímulo eliciador da DAC (KCl). As linhas verticais tracejadas indicam a latência da DAC para cruzar a distância entre os eletrodos. Latências respectivamente mais longas e mais curtas do que as dos grupos controle podem ser observadas nos grupos tratados com 10 mg/kg e 40 mg/kg de MLT. **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, a velocidade da DAC (em mm/min), a sua amplitude (em mV) e a duração (em s), em ratos machos com 36-42 dias de idade, não-tratados (grupo intacto), ou previamente tratados com solução veículo, ou 10 mg/kg/dia ou 40 mg/kg/dia de MLT. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de 12 episódios da DAC por rato, que foram registrados a intervalos de 20 minutos em uma sessão de 4 horas. A administração de veículo e MLT ocorreu do dia 7 ao 27 pós-natal. Nos gráficos de barras, grupos com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA mais teste de Holm-Sidak).....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	3,5-monofosfato cíclico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
DAC	Depressão alastrante cortical
ECoG	Eletrocorticograma
EEG	Eletroencefalograma
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HSA	Hemorragia subaracnoidea
i.p.	Intraperitoneal
I/R	Isquemia/Reperusão
INTAC	Grupo Intacto
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MLT	Melatonina
MLT-10	Grupo Experimental tratado com 10 mg/kg de MLT
MLT-40	Grupo Experimental tratado com 40 mg/kg de MLT
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PKA	Proteína quinase A
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TCE	Traumatismo cranioencefálico
VEIC	Grupo Veículo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 MELATONINA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	15
2.2 MELATONINA, COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E MEMÓRIA	21
2.3 MELATONINA E DAC	23
3. OBJETIVOS	27
3.1 GERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS	27
4. METODOLOGIA	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 TRATAMENTO COM MLT	28
4.3 PESOS CORPORAIS	29
4.4 ANÁLISE DA GLICEMIA	29
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	29
4.5.1 Comportamento indicativo de ansiedade: testes no aparelho de campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE)	30
4.5.2 Comportamento indicativo de memória: testes de reconhecimento de objetos	31
4.6 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC)	33
5. RESULTADOS	34
5.1 PESOS CORPORAIS	34
5.2 GLICEMIA	34
Tabela 2 – Teste T-pareado para diferenças de glicemia antes e depois da administração de MLT no DNP27	34
5.3 REAÇÕES COMPORTAMENTAIS	35
5.3.1 Comportamento sugestivo de ansiedade	35
5.3.2 Comportamento no teste de memória de reconhecimento de objetos	36
5.4 CARACTERÍSTICAS DA DEPRESSÃO ATRASTANTE CORTICAL	37
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

A melatonina (MLT) foi descoberta em 1958 por Lerner e colaboradores, sendo definida como “hormônio de contração do melanóforo”. Em 1993, a MLT foi reconhecida como um antioxidante (POEGGELER *et al.*, 1993). Richard Wurtman sugeriu que esse antioxidante poderia tratar muitas doenças, quando usado em baixas dosagens (ARENDT, 2005).

A MLT é sintetizada a partir do triptofano nos pinealócitos. No entanto, sugere-se que outros órgãos e tecidos também podem produzi-la como, por exemplo, retina, glândulas de Harder, intestino, ovário, testículos e medula óssea (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014; FAVERO *et al.*, 2018; GALANO *et al.*, 2018; GALANO e REITER, 2018; MAJIDINIA *et al.*, 2018; PETERS *et al.*, 2005; REITER *et al.*, 2016).

Na glândula pineal a síntese de MLT está sob o controle do relógio circadiano mestre, o núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado no hipotálamo. Por meio dessa via, a produção de MLT possui um ritmo circadiano que está estreitamente sincronizado com o ciclo claro/escuro. O controle circadiano é tal que a produção de MLT é predominantemente circunscrita à noite, independente do hábito comportamental e da atividade/descanso das diferentes espécies de mamíferos (diurnas, noturnas ou crepusculares), ou seja, é considerada a expressão química da escuridão (CIPOLLA-NETO *et al.*, 2014; REITER, 1991). A MLT sintetizada endogenamente é de grande importância e a deterioração do seu ritmo circadiano, associada à redução da sua secreção, é a causa de inúmeras doenças (GUNATA *et al.*, 2020).

A natureza anfipática da MLT facilita sua passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) e possibilita seu efeito no sistema nervoso, que pode ser de forma independente ou mediado por receptores (GUNATA *et al.*, 2020). O tecido cerebral é particularmente suscetível ao estresse oxidativo e a alteração do equilíbrio redox no cérebro pode causar neuroinflamação e danos ao tecido nervoso. Além disso, o desequilíbrio redox tem sido considerado, entre outras, a base de doenças localizadas nessa parte do corpo (MARTÍNEZ LEO e SEGURA CAMPO, 2019).

São bem relatados na literatura os efeitos benéficos da MLT em doenças neurológicas. O estudo de revisão feito por Gunata e colaboradores (2020) menciona ser a MLT um poderoso antioxidante, eliminador de radicais livres, regulador do sistema imunológico, anti-inflamatório e regulador do ritmo circadiano.

Esse hormônio neutraliza as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as converte enzimaticamente em espécies menos prejudiciais (REITER *et al.*, 2018). No entanto, não se sabe ainda se, no Sistema Nervoso Central (SNC), a sua administração em doses altas teria efeito contrário (pró-oxidante) sobre parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos, como já demonstrado para outras moléculas antioxidantes (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014).

Os níveis de MLT são baixos em pacientes com doenças neurológicas, como acontece na epilepsia (SANCHEZ-BARCELO *et al.*, 2017). Esse hormônio pode ter um efeito protetor na epilepsia por meio de suas propriedades antioxidantes, antiexcitotóxicas e de eliminação de radicais livres no SNC (AKYUZ *et al.*, 2021).

Além de seu papel fundamental na eliminação de radicais livres, a MLT é capaz de melhorar déficits neurocomportamentais (KOCIC *et al.*, 2017; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). A MLT pode interagir com outros sistemas fisiológicos e/ou neurotransmissores para controlar comportamentos como ansiedade e depressão, conforme demonstrado anteriormente em vários trabalhos (LAMTAI *et al.*, 2021; OUAKKI *et al.*, 2013; ZAHRA *et al.*, 2012).

Em modelos animais, a MLT demonstrou ser altamente eficaz na redução da perda neuronal e na melhoria de processos cognitivos. Portanto, mostra que pode ser usada tanto no tratamento quanto na profilaxia de doenças neurodegenerativas, como DA, DP e epilepsia, que incluem inflamação e produção de EROs em sua patogênese (GUNATA *et al.*, 2020).

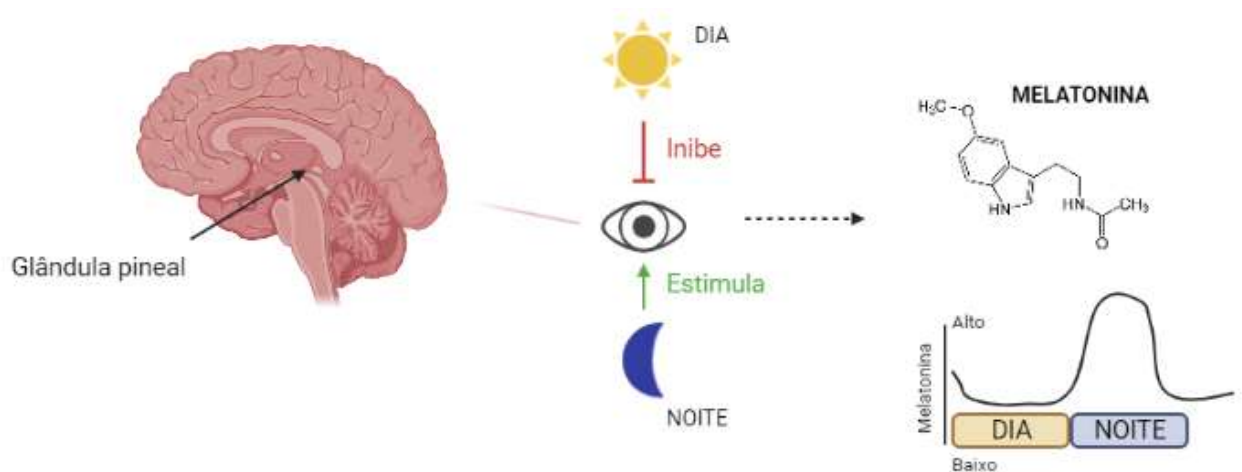
Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da administração crônica da MLT, sobre parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos, como será descrito mais adiante.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MELATONINA E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Em complementação ao que já foi dito acima, pode-se afirmar que a MLT é um hormônio versátil, que é secretado principalmente pela glândula pineal no cérebro humano e é conhecida por regular vários processos fisiológicos por fotoperiodicidade. Além da glândula pineal, a MLT é produzida em vários locais no SNC, incluindo o núcleo grácil, a ponte, a medula espinhal, o cerebelo e o córtex cerebral (JIMENEZ-JORGE *et al.*, 2007). Evidências experimentais demonstraram que tanto neurônios quanto astrócitos podem sintetizar a MLT, que é crítica para manter a homeostase celular e a sobrevivência após uma lesão cerebral (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2007, 2012; WU *et al.*, 2017).

Figura 1. Síntese da melatonina (MLT) pela glândula pineal em sincronização com o ciclo claro/escuro.



FONTE: Próprio autor baseado no trabalho de Gurunathan e colaboradores (2020).

A síntese de MLT acontece através de uma mensagem relacionada ao ambiente de luz que é transferida para o relógio biológico central, o núcleo supraquiasmático (NSQ), no hipotálamo através do trato retino-hipotalâmico, que está embutido no nervo óptico. O NSQ é um centro de retransmissão crítico que transmite um sinal neural para a glândula pineal (OWENS *et al.*, 2012; REITER *et al.*, 2014). A mensagem neural chega aos pinealócitos através do sistema nervoso simpático central e periférico, liberando norepinefrina exclusivamente durante a fase escura da noite, desencadeando a conversão enzimática do triptofano em MLT. A triptofano-5-hidroxilase converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano, que é convertido em serotonina pela 5-hidroxitriptofano-descarboxilase, que, por sua vez, é acetilada em N-acetilserotonina pela arilalquilamina-N-acetiltransferase (enzima limitante) e N-

acetilserotonina é convertida em MLT pela acetilserotonina-O-metiltransferase (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018; DRIJFHOUT *et al.*, 1996; KAPPERS, 1960)

A norepinefrina ativa os receptores adrenérgicos β_1 e α_{1b} que aumentam a atividade da adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC) e da proteína quinase A (PKA), aumentando a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP (CREB) e a atividade de arilalquilamina-N-acetiltransferase, entre outros mecanismos, levando à ativação da síntese de MLT (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018; KLEIN *et al.*, 1992; MARONDE *et al.*, 1999).

Uma vez sintetizada, a MLT não é armazenada, rapidamente é liberada na circulação sistêmica sanguínea (onde se liga à albumina) e para o líquido cefalorraquidiano (LCR), atingindo diversas áreas do SNC e todos os órgãos periféricos. A meia-vida da MLT no sangue é de aproximadamente 40 minutos em humanos, pois é convertida em 6-hidroximelatonina e conjugada com 6-sulfatoximelatonina no fígado e rins para posterior excreção urinária (MA *et al.*, 2005). No SNC, a MLT é metabolizada em N-1-acetil-N-2-formil-5-metoxiquinuramina que é convertida em N-acetil-5-metoxiquinuramina (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018; HARDELAND, 2017; HIRATA *et al.*, 1974).

Os receptores da MLT, MT1 e o MT2, são acoplados à proteína G de alta afinidade e foram encontrados em várias áreas do SNC, incluindo o hipotálamo mediobasal, tálamo, córtex temporal, parietal e frontal, hipocampo, a área pré-óptica, gânglios da base, área postrema, retina, cerebelo e *pars tuberalis* (DUBOCOVICH *et al.*, 2010; JOCKERS *et al.*, 2016).

A MLT pode realizar algumas de suas atividades por interação com um grupo de receptores nucleares referidos como receptores órfãos de retinóides (ROR). Esses receptores nucleares contêm um domínio terminal NH₂, um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ligação ao ligante (no terminal COOH), um dedo duplo de zinco e uma região de dobradiça (REITER *et al.*, 2014).

Além de suas ações mediadas por seus múltiplos receptores descritos anteriormente, a MLT também pode agir diretamente nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), ou seja, por meios não mediados por receptores (REITER *et al.*, 2009). Como alguns outros sequestradores de radicais clássicos, os principais mecanismos químicos pelos quais a MLT captura os radicais incluem a transferência de um único elétron e a transferência de

hidrogênio, mas outros processos ainda a serem definidos podem estar envolvidos (GALANO, 2011).

Além disso, os metabólitos da MLT (cíclico-3-hidroxi-melatonina, N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina e N¹-acetil-5-metoxiquinuramina) fornecem proteção adicional contra danos oxidativos pelos mesmos mecanismos descritos acima para a MLT. (GALANO *et al.*, 2013; 2014; REITER *et al.*, 2014; RESSMEYER *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 1999; 2014).

As concentrações séricas de MLT variam consideravelmente com a idade, e os bebês secretam níveis muito baixos de MLT antes dos 3 meses de idade. A secreção de MLT aumenta e se torna circadiana com o desenvolvimento infantil (TORDJMAN *et al.*, 2017). No entanto, estudos mais recentes sugerem que o ritmo da MLT é estabelecido por volta dos 3 meses de idade no desenvolvimento típico, ao mesmo tempo em que os bebês começam a ter ciclos de sono-vigília mais regulares associados ao sono noturno com duração de 6-8 h (JOSEPH *et al.*, 2014).

Os efeitos imediatos em mamíferos noturnos (por exemplo, ratos, camundongos, morcegos) causados pela presença real da MLT, são a sensibilização do organismo à ação da insulina, potencializando as vias de transdução do receptor de insulina ou sua ação periférica, aumentando principalmente GLUT4 e a captação de glicose nos tecidos muscular e adiposo. Também é demonstrado que a ausência ou redução da produção de MLT durante a noite induz resistência à insulina e intolerância à glicose. Os mesmos efeitos foram demonstrados em camundongos knockout para MT1 e/ou MT2. De fato, a produção noturna de MLT é um dos principais determinantes da sensibilidade fisiológica à insulina durante o dia em humanos e durante a noite em roedores noturnos (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018).

A sua baixa toxicidade (WANG, 2009) e elevada capacidade de cruzar a BHE (BARS *et al.*, 1991) possibilita que a MLT se ligue a seus receptores no SNC (SHEKLETON *et al.*, 2007). As estruturas neurais do cérebro podem captar a MLT rapidamente, e o SNC pode utiliza-la em altas concentrações para se proteger contra danos induzidos por estresse oxidativo (CUZZOCREA e REITER, 2001; GURUNATHAN *et al.*, 2020; REITER *et al.*, 2005).

A MLT exibe várias atividades benéficas no organismo e a ausência de secreção, redução da expressão dos seus receptores ou diminuição no seu nível sérico, levam a inúmeras disfunções e doenças. Estudos pré-clínicos demonstraram

que a MLT reduz lesões, sintomas e aspectos funcionais de vários distúrbios no SNC (GURUNATHAN *et al.*, 2020; ROSALES-CORRAL *et al.*, 2011)

Estudos utilizando diversos modelos de distúrbio do SNC, incluindo doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, trauma neural e lesão de isquemia/Reperusão demonstraram que a MLT pode proteger o cérebro de vários tipos de toxicidade (ESPOSITO e CUZZOCREA, 2010; LEE *et al.*, 2005; 2006; PAREDES *et al.*, 2015; REITER, 1995). A MLT protege contra a perda morfológica neural e destruição funcional, além de proporcionar proteção cerebral ao induzir a suprarregulação de fatores antiapoptóticos e redução do fator pró-apoptótico na lesão isquêmica (GURUNATHAN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014).

A supressão de sinais pró-inflamatórios pela MLT tem sido documentada repetidamente. Os achados respectivos dizem respeito principalmente à regulação negativa da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) (DENG *et al.*, 2006; ESCAMES *et al.*, 2006; LEÓN *et al.*, 2006; LÓPEZ *et al.*, 2006) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (DENG *et al.*, 2006; MAYO *et al.*, 2005); a supressão da ativação do inflamassoma, especialmente do NLRP3; o antagonismo de NF- κ B vs. Nrf2; e a redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, conforme resumido em revisões pertinentes (FAVERO *et al.*, 2017; HARDELAND, 2017; 2018; 2019; 2021; HARDELAND *et al.*, 2015).

Evidências adicionais realizadas por Sharma *et al.* (2006) e Singhal *et al.* (2011) mostraram a ação da MLT na neuroproteção por meio do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes. Assim, existem evidências suficientes que chamam a atenção para o fato de que a secreção prejudicada de MLT pode estar relacionada com o desenvolvimento e/ou com o progresso de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington.

A concentração de MLT está pode estar associada à gravidade de distúrbios neurológicos, como aqueles que ocorrem no traumatismo cranioencefálico (TCE) (SEIFMAN *et al.*, 2008), em distúrbios de humor (BUMB *et al.*, 2016) e delírios (ANGELES-CASTELLANOS *et al.*, 2016). A desregulação da sinalização de MLT no cérebro constitui um fator de risco causal para doenças neurodegenerativas e transtornos de humor. A MLT é efetivamente usada para tratar distúrbios de sono, alterações de ritmos circadianos, distúrbios depressivos, além de melhorar o aprendizado e a memória (GURUNATHAN *et al.*, 2020).

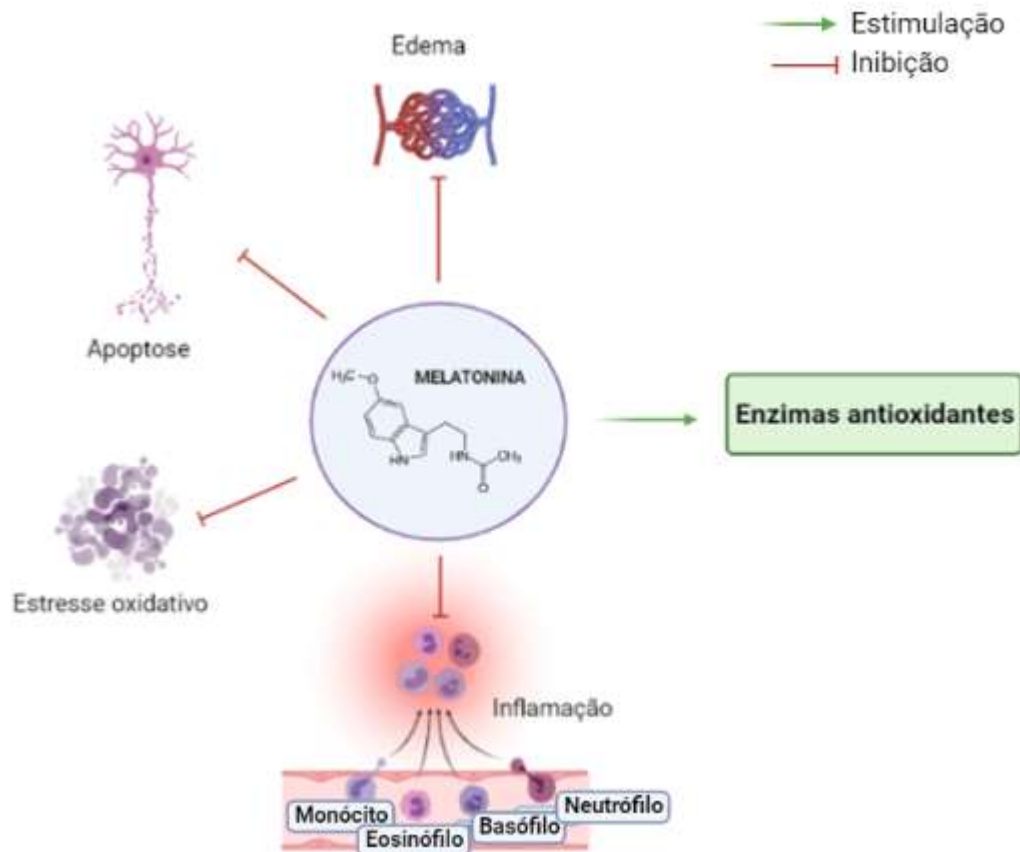
Alguns eventos que acontecem no período de desenvolvimento podem influenciar a função cerebral durante o envelhecimento. Em um estudo com recém-nascidos, observou-se menos episódios de convulsão e anomalias cerebrais em recém-nascidos que receberam MLT na dose de 10 mg/kg, 5 vezes ao dia (ARTEAGA *et al.*, 2017). A expectativa de vida foi aumentada sem qualquer deterioração neurológica ao longo de um período de 6 meses. Por esta razão, acredita-se que a MLT possa exercer uma ação protetora contra danos cerebrais observados em bebês recém-nascidos.

A MLT pode ter um papel benéfico no mecanismo de neuroproteção contra a epilepsia não tratada. O seu uso em pacientes com epilepsia é devido às suas fortes propriedades antioxidantes. Estudos demonstraram que a administração de MLT em pacientes com epilepsia recebendo a medicação anticonvulsivante carbamazepina resulta em forte efeito terapêutico (GUNATA *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2004; MOLINA-CARBALLO *et al.*, 1997).

A hemorragia subaracnóidea (HSA) é uma doença que se acompanha de alta morbidade e mortalidade. Foi demonstrado que a MLT ajuda a reduzir a lesão cerebral precoce com suas propriedades neuroprotetoras, anti-inflamatórias e de regulação endotelial, contribuindo para aumentar a qualidade de vida (KAVAKLI *et al.*, 2004). Estudo em ratos realizado por Ersahin e colaboradores (2009) investigou a inflamação no tecido cerebral após a injeção de MLT (10 mg/kg, i.p.) na cisterna magna. Como resultado, obteve-se redução da produção de peroxidação lipídica, a liberação de glutatona no cérebro de ratos e a infiltração de neutrófilos nos tecidos, tendo a MLT também contribuído para a proteção do sistema neurológico 48 horas após a HSA.

Outro estudo realizado por Chen e colegas em 2014 confirmou que as propriedades antiapoptóticas e anti-inflamatórias da MLT reduziram a mortalidade por edema cerebral e sangramentos, contribuindo para a melhora do desenvolvimento neurológico.

Figura 2. Potenciais mecanismos e efeitos benéficos da MLT no SNC.



FONTE: Próprio autor baseado no trabalho de Gurunathan e colaboradores (2020).

2.2 MELATONINA, COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E MEMÓRIA

O tratamento com MLT foi inicialmente utilizado para modulação do relógio biológico e reprodução sazonal em organismos vivos. No entanto, outros estudos revelaram diversos efeitos farmacológicos, incluindo efeito antioxidante (OLAYAKI *et al.*, 2018; REITER *et al.*, 2016; ROMERO *et al.*, 2014; SRINIVASAN, 2002), anti-inflamatório (CHIBOWSKA *et al.*, 2020; PERMPOONPUTTANA e GOVITRAPONG, 2013; YU *et al.*, 2017), ansiolítico (HUANG *et al.*, 2017; NARANJO-RODRIGUEZ *et al.*, 2000), antidepressivo (RAMÍREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2020; SINGH e JADHAV, 2014), anticonvulsivante (MOLINA-CARBALLO *et al.*, 2007; MUÑOZ-HOYOS *et al.*, 1998) e atividade antiapoptótica (HE *et al.*, 2010).

Estudo realizado por Lamtai e colaboradores (2021) mostrou que a administração crônica de MLT produz um potente efeito do tipo ansiolítico e antidepressivo em ratos. Entre os mecanismos pelos quais se supõe que a MLT produz esses efeitos está a modulação de sistemas neurotransmissores (5-hidroxitriptamina e a dopamina) ligados a processos emocionais, embora o mecanismo exato ainda esteja em debate.

Outro benefício da MLT é a sua influência para a formação da memória no hipocampo, uma estrutura límbica no cérebro conhecida por ser responsável pela formação de certos tipos de memória (EL-SHERIF *et al.*, 2003; NEELY *et al.*, 2019). A estimulação nos níveis de mRNA da enzima superóxido dismutase (SOD) após injeções de MLT (50 e 500 µg/kg) foi confirmada por Kotler *et al.* (1998) em cérebro de rato. Tais efeitos protegem e melhoram a neurotransmissão e a função neuronal, levando assim a uma melhora gradual na função da memória e evolução dos transtornos de humor. A MLT demonstrou ser protetora contra danos neuronais no hipocampo, resultando em melhora do aprendizado e da memória devido à sua forte propriedade antioxidante (SOLEIMANI *et al.*, 2017).

Vários trabalhos demonstraram uma relação entre estresse oxidativo e a etiologia das disfunções afetivas e cognitivas (MAES *et al.*, 2011; RAHMAN *et al.*, 2009), sendo o hipocampo uma região muito suscetível ao estresse oxidativo (TANIGUTI *et al.*, 2018). Sítios de ligação e receptores de MLT (MT1 e MT2) foram encontrados no hipocampo de vários animais, sugerindo que a MLT atua por meio de receptores específicos em várias funções neuronais das células do hipocampo (LAUDON *et al.*, 1988; MAZZUCHELLI *et al.*, 1996; , MUSSHOFF *et al.*, 2002; NONNO *et al.*, 1995; WAN *et al.*, 1999).

Estudo realizado em 2021 observou que a administração de 4mg/kg de MLT em ratos de ambos os sexos com 8-9 semanas de idade por 8 semanas protegeu de disfunções afetivas e cognitivas geradas pela administração de cobre. No presente estudo, a MLT reduziu o nível de TBARS no hipocampo, aliviou o efeito neurotóxico do óxido nítrico causado pelo cobre, aumentou a expressão gênica de enzimas antioxidantes e reduziu alterações na região CA3 do hipocampo, que desempenha um papel crítico no humor e na função da memória, preservando o número normal de neurônios (LAMTAI *et al.*, 2021b).

Em um estudo duplo-cego controlado por placebo, o consumo de MLT atenuou a epilepsia em crianças (GUPTA *et al.*, 2004). Acredita-se que a melhora no funcionamento físico, emocional e comportamental dependam da MLT. Isso indica que esse hormônio pode ser usado para esses fins em pacientes com epilepsia. Os benefícios da MLT nos distúrbios de sono e os efeitos reguladores no ritmo circadiano são mencionados acima, e a epilepsia está intimamente relacionada ao sono. A redução dos problemas de sono causa efeitos positivos na epilepsia (GUNATA *et al.*, 2020).

Em um estudo realizado por Hampshire e colegas (2020), pessoas que se recuperaram do COVID-19, incluindo aquelas que não relataram mais os sintomas, exibiram déficits cognitivos significativos. "Névoa do cérebro", ou seja, um quadro com confusão, esquecimento, incapacidade de se concentrar, fadiga e baixa energia mental (RAJ *et al.*, 2018; WELLS *et al.*, 2020) pode ser, portanto, uma grande sequela emergente de infecção por COVID-19. Neste contexto, as propriedades neuroprotetoras da MLT merecem consideração (CARDINALI, 2019). Dados publicados usando MLT nos estágios iniciais do declínio cognitivo mostrou que a administração desse hormônio, todas as noites antes de dormir, é benéfica para doenças que afetam o desempenho cognitivo (CARDINALI *et al.*, 2014; CARDINALI *et al.*, 2020).

Diante disso, os dados clínicos e experimentais revelam um quadro complexo de mecanismos e alvos biológicos que podem ser influenciados pela MLT no cérebro. Isso apoia o papel compartilhado e evolutivamente conservado da MLT na regulação de processos neurocomportamentais.

2.3 MELATONINA E DAC

A depressão alastrante cortical (DAC) foi descrita pela primeira vez pelo cientista Brasileiro Aristides A. P. Leão em 1944 como uma "onda" de redução da atividade cortical espontânea, que se propaga por toda a superfície do cérebro, em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química em um ponto do tecido cortical (LEÃO, 1944a). Essa depressão dura alguns minutos e se propaga de forma concêntrica, com uma velocidade de 2 a 5 mm/min (GUEDES, 2011). O fenômeno é totalmente reversível; a atividade elétrica cortical é completamente recuperada 5 a 10 minutos após a deflagração da DAC, começando a recuperar-se a partir do ponto estimulado e deixando-o pronto para receber um segundo estímulo.

Simultaneamente à depressão da atividade elétrica espontânea, ocorre uma variação lenta de voltagem na superfície cortical, tornando-se o ponto sob a ação da DAC mais negativo do que na situação basal. Essa variação negativa, cuja amplitude situa-se entre -5 e -20 mV, é em geral seguida, e ocasionalmente precedida, de uma fase positiva de menor amplitude (LEÃO, 1947).

Os estudos originais de Leão mostraram que a DAC pode ocorrer em quase todas as regiões do córtex e que é acompanhada de uma dilatação seguida de constrição dos vasos sanguíneos piais, influenciado pela hipóxia (LEÃO, 1944b; 1945; 1947). A depressão da atividade observada no eletroencefalograma (EEG) é

causada por uma falha aguda da homeostase dos íons cerebrais e efluxo de aminoácidos dos neurônios, que é de alguma forma semelhante à penumbra isquêmica (IFTIKHAR *et al.*, 2020; STRONG *et al.*, 1983; VYSKOCIL *et al.*, 1972)

Durante a DAC, ocorre um aumento na concentração de íons potássio no líquido extracelular, de 3 mmol/L (em média) para até 60 mmol/L. Por outro lado, a concentração de íons cálcio diminui de 1 mmol/L para 0,1 mmol/L, assim como a concentração de cloreto diminui de 120 mmol/L para 70 mmol/L. Ao mesmo tempo, há um declínio no pH de 7,3 para ~ 6,9, enquanto também há uma diminuição de 50% nas dimensões do espaço extracelular para ajudar a regular o movimento da água para os neurônios (KRAIG e NICHOLSON, 1978; MUTCH e HANSEN, 1984; PUSIC *et al.*, 2015)

O movimento da água para os dendritos resulta em intumescimento (edema) reversível dos neurônios e alteração das espinhas dendríticas, enquanto o volume dos astrócitos permanece constante. Isso está de acordo com o envolvimento dos neurônios na DAC. Ocorre a normalização espontânea da concentração de íons e dimensões do espaço extracelular após 30 segundos a um minuto, mas a concentração de íons cálcio e o pH extracelular demoram mais para se recuperar (IFTIKHAR *et al.*, 2020).

Em 1956, Grafstein observou, em gatos, que regiões corticais que foram estimuladas repetidamente para produzir a DAC acabariam por produzir potenciais de menor amplitude, sugerindo a liberação de uma substância intracelular. Essa fadigabilidade dos neurônios poderia ser regenerada pela suplementação do meio com cloreto de potássio, levando Grafstein a postular que o íon chave para a propagação da DAC deve ser o potássio. A DAC é deflagrada experimentalmente com substâncias como o potássio, acetilcolina e glutamato, bem como em condições de hipóxia, hipoglicemia, acidente vascular cerebral (AVC), HSA, TCE e convulsões (BOSCHE *et al.*, 2010; DOHMEN *et al.*, 2008; DREIER *et al.*, 2002; 2011; 2013; EICKHOFF *et al.*, 2014; HARTINGS *et al.*, 2011; PETZOLD, 2008; SOMJEN, 2005; TEIVE *et al.*, 2005). Ainda não está claro o mecanismo pelo qual a DAC é iniciada. No entanto, uma ligeira elevação no nível de íons potássio e alguns neurotransmissores são suficientes para iniciar a sua propagação (ROGERS *et al.*, 2017).

Quanto à sua ocorrência, a DAC tem sido demonstrada não só no cérebro de mamíferos, incluindo o homem, mas em todas as espécies de vertebrados

investigadas até agora, incluindo aves, répteis, anfíbios e peixes (ver Guedes e Abadie-Guedes, 2019, para uma pequena revisão). Por último, a DAC foi também descrita no sistema nervoso de invertebrados (*Locusta migratória*) e insetos (*Drosophyla melanogaster*) (SPONG *et al.*, 2016). Em vertebrados, o fenômeno já foi evidenciado em várias estruturas do SNC como núcleo caudado, tubérculo quadrigêmeo, bulbo olfatório, córtex cerebelar, teto óptico e medula espinhal (BERGER *et al.*, 2008; FIFKOVA *et al.*, 1961; GORJI e SPERCKMANN, 2004; GUEDES *et al.*, 2005; STREIT *et al.*, 1995).

Alguns distúrbios neurológicos importantes são postulados como tendo a DAC participando de sua patogênese. Este é o caso da migrânea (antigamente denominada de enxaqueca), lesão cerebral traumática (LAURITZEN, 1987; HARTINGS *et al.*, 2009, 2011; SADEGHIAN *et al.*, 2018; TORRENTE *et al.*, 2014; VINOGRADOVA, 2018), HSA (DREIER *et al.*, 2006, 2009) epilepsia (GUEDES e CAVALHEIRO, 1997; MESGARI *et al.*, 2017) e AVC (TAKANO *et al.*, 1996; ver LAURITZEN e STRONG, 2017 para uma visão geral). Modelos murinos atuais são mais refinados do que aqueles do passado. Além disso, o registro da atividade elétrica tornou-se mais viável nos estudos modernos. Isso inclui o uso de eletrocorticograma (ECoG), bem como imagens de sinais ópticos intrínsecos. A imagem do sinal óptico intrínseco mede as alterações da refletância cortical em resposta às alterações hemodinâmicas e é capaz de visualizar a indução, propagação e término da DAC comparativamente ao ECoG (SOLDOZY *et al.*, 2020).

Em estudo feito por Ebert e colaboradores (1999), verificou-se que a administração de MLT no evento da DAC em retina de galinhas desfavoreceu a propagação da onda, assim como também mostrou ter uma recuperação mais rápida do tecido. O estudo realizado por Le Grand e colaboradores (2006), mostrou que, além de seu papel na condição fisiológica normal, a MLT também é eficaz na atenuação da hiperemia induzida pela DAC. Esse mesmo estudo revela um impacto substancial da DAC nas células endoteliais: um aumento no número de vesículas pinocíticas e microvilosidades pode refletir aumento no transporte transendotelial.

O efeito da MLT na prevenção de alterações estruturais do tecido cerebral foi relatado anteriormente em várias condições, incluindo HSA, infarto cerebral, etc. Os mecanismos subjacentes a esse efeito preventivo podem envolver a antioxição e manutenção e/ou aumento da atividade do gene da enzima ciclooxigenase-1 (AYDIN *et al.*, 2005; ZOU *et al.*, 2006).

Diante do cenário acima descrito, que justifica o presente estudo, a hipótese é que a MLT possa exercer atividade antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar em ratos jovens os efeitos da administração precoce de MLT sobre parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos cerebrais.

3.2 ESPECÍFICOS

No período entre 7 e 27 dias de vida, administrar duas doses de MLT (10 mg/kg/d e 40 mg/kg/d) em dois grupos distintos de animais experimentais; nos animais tratados como acima descrito,

- Avaliar a evolução ponderal e a glicemia dos animais, como indicadores de seu desenvolvimento;
- Detectar alterações comportamentais sugestivas de distúrbios de ansiedade e memória (avaliadas no aparelho de campo aberto e labirinto em cruz elevado) decorrentes do tratamento crônico com as diferentes doses de MLT;
- Identificar se o tratamento crônico com as diferentes doses de MLT altera parâmetros eletrofisiológicos da DAC (velocidade de propagação, amplitude e duração);
- Avaliar se os efeitos comportamentais e eletrofisiológicos da MLT são dependentes da dose administrada.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo de aprovação nº 0006/2020), cujas normas atendem àquelas estabelecidas pelo National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Bethesda, MD, Estados Unidos). Ratos Wistar machos e fêmeas recém-nascidos foram amamentados em ninhadas com oito filhotes. Após o desmame, no dia pós-natal (DPN) 21, os filhotes passaram a ter livre acesso à água e à mesma ração comercial usada na manutenção do biotério que foi previamente oferecida às suas mães (**Tabela 1**). Os filhotes desmamados foram separados por sexo e alojados em gaiolas de polipropileno (51 cm × 35,5 cm × 18,5 cm) sob temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) com um ciclo de 12h de luz: 12h de escuridão (luzes acesas às 20h). Apenas os filhotes machos (N = 40) foram usados neste estudo para evitar a influência dos níveis oscilantes dos hormônios ovarianos.

Tabela 1 – Composição centesimal e distribuição de macronutrientes por 100g de ração comercial padrão para roedores Nuvilab®.

DIETA PADRÃO COMERCIAL

VET (kcal/kg)	3,5
Proteína (g/100g)	25,5
Carboidrato (g/100g)	52,0
Lipídio (g/100g)	4,1
Umidade (g/100g)	9,8
Cinzas (g/100g)	8,5

4.2 TRATAMENTO COM MLT

A MLT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi administrada em dias alternados, sempre às 14h [conforme sugere Cipolla-Neto e Amaral (2018)], do DPN7 ao DPN27, ou seja, onze dias de tratamento. Dois grupos de ratos (n=10 por grupo) receberam em dias alternados, por via intraperitoneal, dosagens de 10 ou 40 mg/kg/dia de MLT (grupos MLT10 e MLT40, respectivamente). A MLT foi dissolvida em 0,1 ml de NaCl contendo 5% de etanol. (REDINS *et al.*, 2001). Esses dois grupos

experimentais foram comparados com dois grupos controle, um dos quais foi tratado com o veículo usado para dissolver a MLT (grupo VEÍCULO; n=10) e o outro grupo não foi tratado (grupo INTACTO; n=10). A escolha das doses foi feita de acordo com pesquisas prévias na literatura.

4.3 PESOS CORPORAIS

O peso corporal foi medido usando-se uma balança digital de precisão (XTRAD, modelo XT-212) no DPN7, DPN14, DPN21, DPN28 e no dia em que foi realizado o registro eletrofisiológico da DAC.

4.4 ANÁLISE DA GLICEMIA

As concentrações plasmáticas de glicose foram determinadas em amostra de sangue (uma gota) da cauda do animal usando glicosímetro (Roche, Accu-Chek Active) duas vezes, sendo a primeira vez 4 horas antes da administração de MLT e a segunda vez 4h após a administração de MLT no DPN27, como sugerido por Cipolla-Neto e Amaral (2018).

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os animais foram testados quanto ao comportamento de ansiedade no aparelho de campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE). No CA, os animais também foram testados quanto à memória de reconhecimento de objetos. Os testes foram realizados em uma sala com atenuação de som e baixa intensidade de luz (luz vermelha). Antes de cada teste, o animal foi introduzido por 20 minutos na sala de teste para se adaptar ao ambiente (período de adaptação). Cada um dos dois testes de comportamento de ansiedade (CA e LCE) consistiu em uma sessão de 5 minutos, enquanto cada um dos testes de memória de reconhecimento (de posição espacial e de formas, RP e RF) consistiu em duas sessões de 5 minutos (designadas como sessão de treino e sessão de teste), separadas por um intervalo de 40 minutos.

Todos os testes comportamentais foram realizados entre DPN30 e DPN34 na seguinte sequência temporal: primeiro, os animais foram testados para ansiedade no CA (DPN30). Nos dois dias seguintes, utilizando o mesmo aparelho de campo aberto, os animais foram testados para as duas tarefas de memória de reconhecimento: de posição espacial - RP (DPN31) e reconhecimento de formas RF (DPN32). Para a tarefa de RP, os objetos escolhidos foram idênticos, do mesmo

material (vidro), com possibilidades de interação semelhantes. Para o RF, um desses objetos foi substituído (na sessão de teste) por um objeto com geometria distinta (diferente forma, altura e cor) que podia ser facilmente discriminada. Acredita-se que isso minimize a influência das preferências naturais (VIANA *et al.*, 2013). O critério para definir a exploração foi baseado na 'operação ativa', ou seja, quando o animal estava tocando objetos pelo menos com o nariz.

4.5.1 Comportamento indicativo de ansiedade: testes no aparelho de campo aberto (CA) e no labirinto em cruz elevado (LCE)

O CA e o LCE têm como objetivo avaliar a capacidade do animal, durante o teste, de reconhecer locais ansiogênicos (braços abertos no LCE e a parte central do CA), onde geralmente passa menos tempo durante o teste (CALZA *et al.*, 2010).

O CA consiste em uma arena circular, feita de madeira, com um diâmetro de 89 cm cercada por uma parede, também de madeira, de 52 cm de altura. Para o teste no CA, após o período de adaptação, a atividade do animal foi avaliada por 5 minutos. O centro do CA foi definido como uma área com diâmetro de 62 cm. Tomamos as seguintes medidas no CA: número de entradas do animal na área central, porcentagem de tempo gasto nessa área central, distância percorrida e tempo de imobilidade. Consideramos que o animal entrou no centro do CA quando suas quatro patas entraram no centro. Este teste foi realizado no DPN30. Em seguida, foram realizados os testes de reconhecimento de uma posição espacial nova (DPN31) e de uma forma nova (DPN32) de objetos colocados no CA. Após um intervalo de 48 horas, os animais foram testados no LCE (DPN34).

Uma câmera de vídeo registrou a atividade comportamental do animal. A atividade registrada foi posteriormente analisada com o software ANYmaze® (versão 4,99 m). O LCE (elevado a 55 cm do chão) foi feito de madeira envernizada, composto por dois braços abertos e dois fechados, sendo esses últimos perpendiculares aos braços abertos (cada um medindo 49 cm × 10 cm), conectados por um quadrado central (10 cm) onde o animal era colocado para iniciar o teste. Após o período de adaptação, o animal foi colocado no quadrado central voltado para um braço aberto. Foram avaliados os seguintes parâmetros no LCE: número de entradas nos braços abertos, tempo gasto nos braços abertos, distância percorrida e tempo de imobilidade. Consideramos que o animal entrou em um dos braços do LCE quando suas quatro patas entraram no braço.

Após cada teste, o aparelho foi higienizado com uma solução 70:30 etanol: água. Os animais foram testados aleatoriamente entre 8h e 13h.

4.5.2 Comportamento indicativo de memória: testes de reconhecimento de objetos

Esses testes têm como objetivo avaliar a capacidade do animal de reconhecer uma forma, ou uma posição espacial desconhecida de um objeto. É baseado na tendência natural do animal, durante o teste, de passar mais tempo explorando um objeto novo em vez de outro objeto que já lhe é familiar, porque foi previamente explorado (FRANCISCO e GUEDES, 2015). Ennaceur e Delacour (1988) e Dere e colaboradores (2005) descreveram esses métodos para os testes de reconhecimento de objetos que são brevemente resumidos a seguir:

(1) Para avaliar o reconhecimento de uma nova localização espacial, inicialmente dois objetos idênticos (A e B) foram colocados no aparelho de campo aberto, e o animal os explorou por 5 minutos. Após um intervalo de 40 minutos, o animal retornou ao campo aberto (segunda sessão) na presença dos mesmos objetos (A e B); entretanto, neste segundo momento, o objeto B foi localizado em uma nova posição espacial. Se o animal identificar a posição desconhecida, ele gastará mais tempo explorando o objeto nesta nova posição.

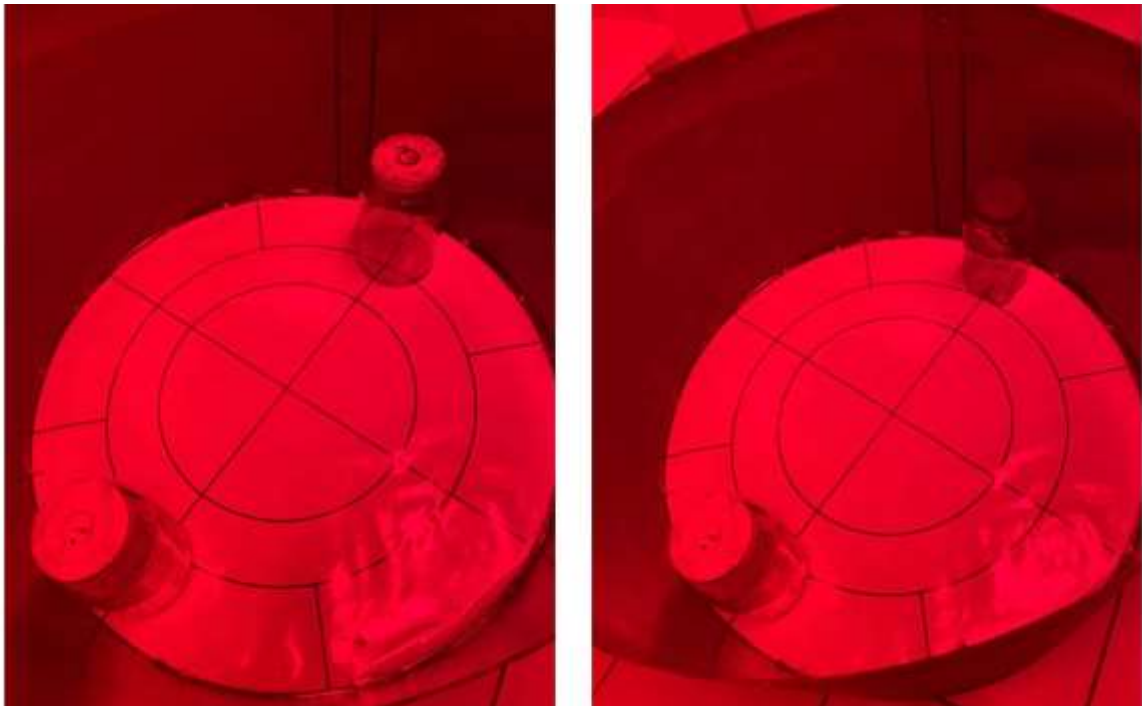
Figura 3. Imagens da primeira e segunda sessão do teste de reconhecimento de uma nova localização espacial no campo aberto.



FONTE: Próprio autor.

(2) Na discriminação de formas, dois objetos idênticos (A e B) foram posicionados na arena para a primeira análise de 5 minutos. Após intervalo de 40 minutos, os animais retornaram à arena (segunda sessão de 5 minutos). Para esta sessão, o objeto B foi substituído por outro, C (desconhecido), com uma forma diferente. O animal demonstrará que pode diferenciar as formas quando, nesta segunda sessão, passar mais tempo explorando o novo objeto. Essa memória pode ser melhor avaliada pelo índice de discriminação (VIANA *et al.*, 2013), que é calculado pela fórmula: $ID = (TN - TF) / (TN + TF)$, em que TN e TF representam, respectivamente, o tempo que o animal gasta explorando o objeto com característica nova e familiar (seja pela forma ou posição espacial).

Figura 4. Imagens da primeira e segunda sessão do teste de reconhecimento de formas no campo aberto.



FONTE: Próprio autor.

Após um intervalo de 48 horas, os animais foram testados no LCE (DPN34). Uma câmera de vídeo registrou a atividade comportamental do animal. A atividade registrada foi posteriormente analisada com o software ANYmaze™ (versão 4,99 m). Após cada teste, o aparelho foi higienizado com uma solução 70:30 etanol: água. Os animais foram testados aleatoriamente entre 8h e 13h.

4.6 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC)

Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da DAC (DPN36-42). Para isso, os animais foram anestesiados com uma mistura de 1g/Kg de uretano e 40mg/Kg de cloralose. Três orifícios trefínicos foram perfurados no lado direito do crânio, alinhados na direção frontal-occipital e paralelos à linha média. Um orifício (2-3 mm de diâmetro) foi posicionado no osso frontal e foi usado para aplicar o estímulo (KCl) e, assim, desencadear a DAC. Outros dois orifícios (3-4 mm de diâmetro), posicionados no osso parietal, foram utilizados para registrar a onda de propagação da DAC. Durante a cirurgia e registro, os animais foram monitorados quanto à temperatura retal ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$) e respiração. Como regra, após a aplicação tópica de 2% de KCl (aproximadamente 270 mM) por 1 minuto em um ponto da superfície cortical exposta, uma única onda de DAC foi eliciada na área frontal. A aplicação de KCl foi repetida a cada 20 minutos por um total de 4 horas. A DAC foi registrada usando eletrodos do tipo Ag-AgCl-ágar-Ringer localizados mais posteriormente (região parietal) no hemisfério estimulado. Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado nos ossos nasais e serviu como uma referência comum para os outros dois eletrodos de registro. A velocidade de propagação da DAC foi calculada a partir do tempo necessário para uma onda de DAC cruzar a distância entre os dois pontos de registro cortical. Nos dois locais de registro, o ponto inicial de cada fase ascendente do componente negativo da variação lenta de voltagem da DAC foi usado como ponto de referência para calcular as velocidades de propagação do fenômeno. Além disso, foram calculadas a amplitude e a duração do componente negativo da DAC, como relatado anteriormente (MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014). Após o registro os animais foram eutanasiados por decapitação.

Figura 5. Esquema experimental de acordo com a idade dos animais.



FONTE: Próprio autor.

5. RESULTADOS

5.1 PESOS CORPORAIS

Conforme ilustrado na **Figura 6**, ANOVA indicou que não houve diferença significativa no peso corporal foi encontrada entre os grupos (para 7 dias $F[3,37] = 0.199$; $p=0.896$; para 14 dias $F[3,33] = 0.352$; $p = 0.788$; para 21 dias $F[3,32] = 0.762$; $p = 0.525$; para 28 dias $F[3,26] = 1.939$; $p = 0.151$). A administração das duas diferentes doses de MLT não alterou o ganho de peso dos animais.

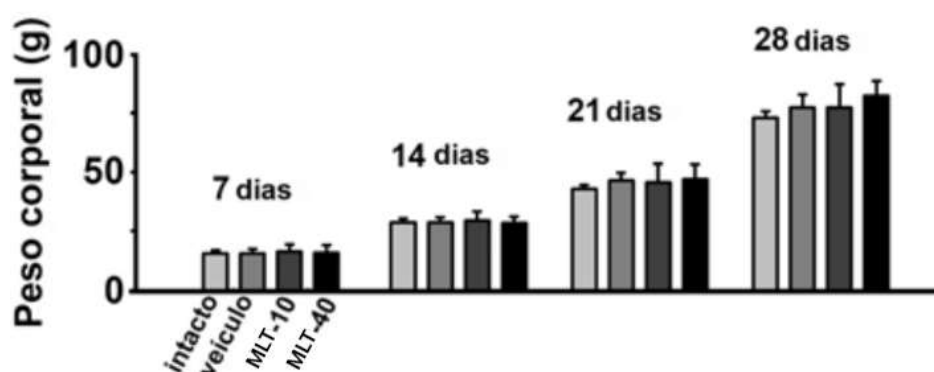


Figura 6. Pesos corporais médios dos dois grupos controle (INTACTO e VEÍCULO) e dos dois grupos tratados com 10mg/kg/dia e 40mg/kg/dia de MLT (grupos MLT-10 e MLT-40, respectivamente). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Os animais foram pesados nos dias 7, 14, 21 e 28 de vida pós-natal. O tratamento com MLT não influenciou o ganho de peso.

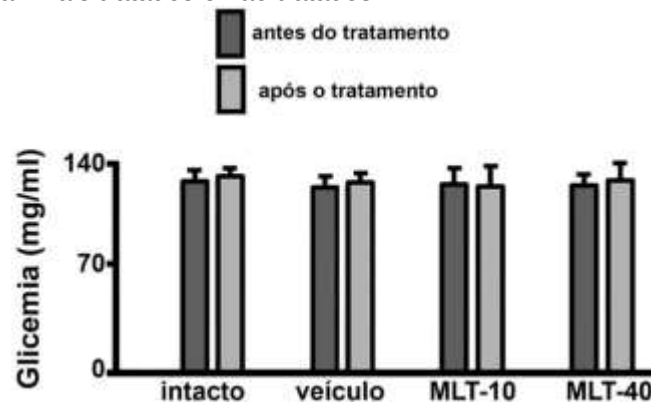
5.2 GLICEMIA

Na **Figura 7** mostra-se que não houve diferença significativa na glicose sanguínea dos animais dos 4 grupos. A MLT não exerceu efeito, de forma crônica, quando se comparou os grupos não tratados com os grupos tratados, no DPN27. Também não exerceu efeito, de forma aguda, quando compara a glicose sanguínea antes e depois da administração de MLT nos dois grupos tratados conforme ilustrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Teste T-pareado para diferenças de glicemia antes e depois da administração de MLT no DNP27.

Grupo	Glicemia 4h antes da MLT	Glicemia 4h depois da MLT	T (paired)
Intacto	126,6 $\pm$ 9,9	129,9 $\pm$ 6,2	0,2301
Veículo	127,4 $\pm$ 11,8	128,9 $\pm$ 9,0	0,7143
MLT-10	124,2 $\pm$ 15,1	121,7 $\pm$ 11,7	0,6326
MLT-40	125,1 $\pm$ 8,5	128,0 $\pm$ 12,1	0,5912

Figura 7. Glicemia dos grupos controle (intacto e veículo) e tratados com MLT (MLT-10 com 10mg/kg/dia e MLT-40 com 40mg/kg/dia). A glicemia foi aferida no DPN27 4 horas antes e 4 horas após a administração de MLT; nessas condições, o tratamento com MLT não influenciou na glicemia dos animais tratados e não tratados.



5.3 REAÇÕES COMPORTAMENTAIS

5.3.1 Comportamento sugestivo de ansiedade

O efeito da administração de MLT na atividade comportamental no teste de campo aberto é mostrado na **Figura 8 - A**. A ANOVA indicou diferenças intergrupos para os parâmetros “entradas na área central” do campo aberto ($F [3, 28] = 8,706$; $p < 0,001$) e “tempo na área central” ($F [3, 27] = 5,993$; $p = 0,003$). O teste “post-hoc” (Holm-Sidak) indicou que os animais do grupo MLT-10 entraram um maior número de vezes na área central e nela permaneceram por mais tempo, em relação aos outros três grupos. Não houve diferenças intergrupos com relação aos parâmetros “distância percorrida” ($F [3,36] = 0,456$; $p = 0,600$) e “tempo de imobilidade” ($F [3,26] = 0,194$; $p = 0,899$).

Os resultados do teste do LCE são mostrados na **Figura 8 - B**. A ANOVA indicou diferenças intergrupos para dois parâmetros avaliados: entradas nos braços abertos ($F [3, 25] = 4,200$; $p = 0,015$) e tempo nos braços abertos ($F [3, 28] = 10,036$; $p < 0,001$). O teste “post-hoc” (Holm-Sidak) indicou que o grupo MLT-10 apresentou maior número de entradas nos braços abertos, bem como maior tempo de permanência nesses mesmos braços abertos, quando comparado com os grupos controle (intacto e veículo). Não houve diferenças intergrupos com referência aos parâmetros “distância percorrida” ($F [3,36] = 0,631$; $p = 0,600$) e “tempo de imobilidade” ($F [3,35] = 0,852$; $p = 0,475$).

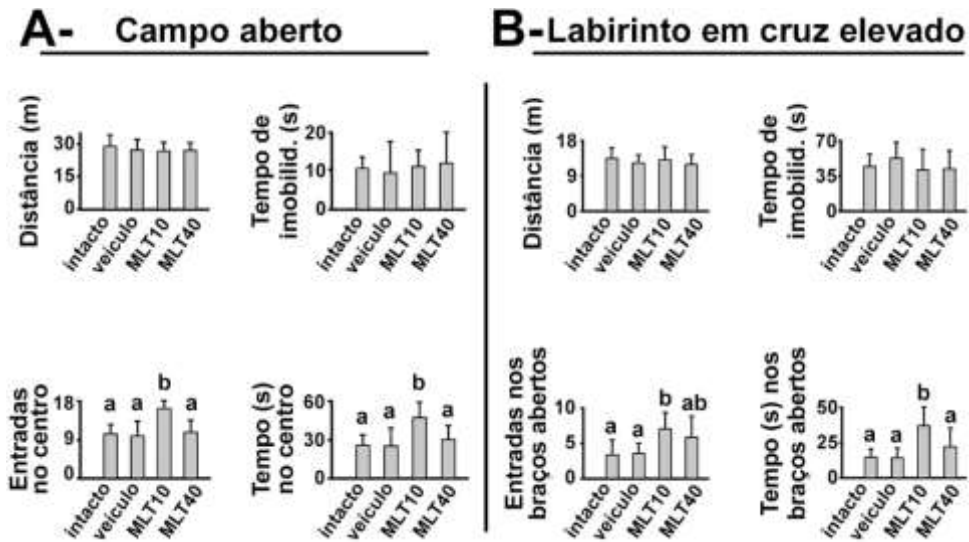


Figura 8. (A) Parâmetros comportamentais avaliados no aparelho de campo aberto (CA), medidos quando os ratos atingiram 30 dias de idade. (B) Atividade comportamental no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), em ratos de 34 dias de idade. Em ambos os testes, os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os grupos marcados, acima das barras, com letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA mais teste de Holm-Sidak).

5.3.2 Comportamento no teste de memória de reconhecimento de objetos

Os resultados dos testes de memória de reconhecimento de objetos (realizados em DPN31 e DPN 32) são mostrados na **Figura 9**. O gráfico superior refere-se aos índices de discriminação, indicativos do reconhecimento de uma nova posição espacial de um objeto familiar (já conhecido). Por sua vez, o gráfico inferior corresponde aos índices de discriminação indicativos do reconhecimento de um novo objeto com formas diferentes daquelas do objeto familiar. A ANOVA revelou diferenças intergrupos no reconhecimento espacial ($F [3,29] = 7,813$; $p < 0,001$), mas não no reconhecimento de formas ($F [3,25] = 2,025$; $p = 0,136$).

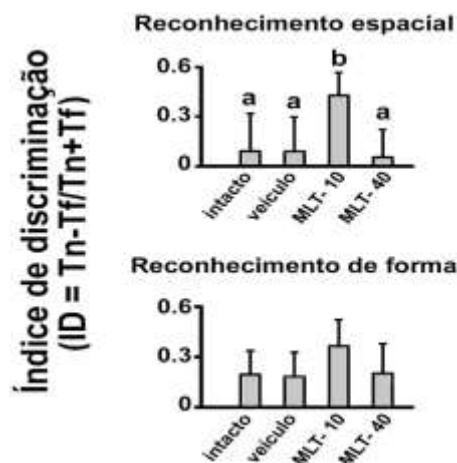


Figura 9. Índices de discriminação de ratos submetidos ao teste de memória de reconhecimento de objetos. O gráfico superior desta figura refere-se ao reconhecimento de uma nova posição espacial (DPN 31) de um objeto já conhecido (ou familiar). O gráfico inferior representa o reconhecimento de um objeto com uma forma nova (DPN 32), mas numa posição espacial

familiar. Os grupos marcados com letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Holm-Sidak).

5.4 CARACTERÍSTICAS DA DEPRESSÃO ATRASTANTE CORTICAL

A aplicação, em um ponto do córtex frontal, de uma bolinha de algodão (1–2 mm de diâmetro) embebida com KCl a 2% (aproximadamente 270mM), por 1 min, em intervalos de 20 min geralmente eliciou um único episódio de DAC, que foi registrado pelos dois eletrodos localizados mais posteriormente no hemisfério estimulado (ver pontos de registro 1 e 2 no diagrama do crânio na **Figura 10**). Um terceiro eletrodo do mesmo tipo foi colocado nos ossos nasais e serviu como uma referência comum (R) para os eletrodos de registro. O registro da variação lenta de voltagem confirmou a presença da DAC após a aplicação de KCl (**Figura 10 - A**).

Com relação à velocidade de propagação da DAC (**Figura 10 - B**), a ANOVA indicou diferenças intergrupos [$F(3,37) = 85,130$; $p < 0,001$]. As comparações do teste post-hoc (Holm-Sidak) mostraram que a dose mais baixa de MLT (10 mg/kg/dia) desacelerou significativamente a DAC ($2,86 \pm 0,14$ mm/min) em comparação com os grupos controle ($3,31 \pm 0,09$ mm/min e $3,25 \pm 0,10$ mm/min; grupo intacto e veículo, respectivamente). No entanto, a dose mais alta (40 mg/kg/dia) acelerou significativamente a DAC ($3,96 \pm 0,16$ mm/min).

A duração e a amplitude do componente negativo da variação lenta de voltagem, que é uma marca registrada da DAC, são apresentadas na **Figura 10 - C** e **D**. A ANOVA indicou o efeito principal do tratamento [$F(3, 38) = 30,570$; $p < 0,001$ para duração e $F(3, 36) = 9,520$; $p < 0,001$ para amplitude]. O teste de Holm-Sidak indicou que o grupo tratado com 10mg/kg de MLT (do DPN7 ao DPN27) apresentou duração maior ($96,5 \pm 9,1$ s), quando comparado com os grupos controle ($83,94 \pm 5,17$ s e $82,08 \pm 4,02$ s para os grupos intacto e veículo). A duração média no grupo MLT-10 foi também significativamente maior ($p \leq 0,05$) do que no grupo MLT-40 ($70,7 \pm 4,0$ s). A amplitude média nos dois grupos controle foi de $8,89 \pm 2,35$ mV e $9,03 \pm 1,68$ mV, respectivamente, para os grupos intacto e veículo. Para os grupos tratados com MLT (MLT-10 e MLT-40) a amplitude foi de $6,78 \pm 1,20$ mV e $13,23 \pm 2,28$ mV, respectivamente, indicando que a menor dose de MLT esteve associada à menor amplitude em relação aos demais grupos.

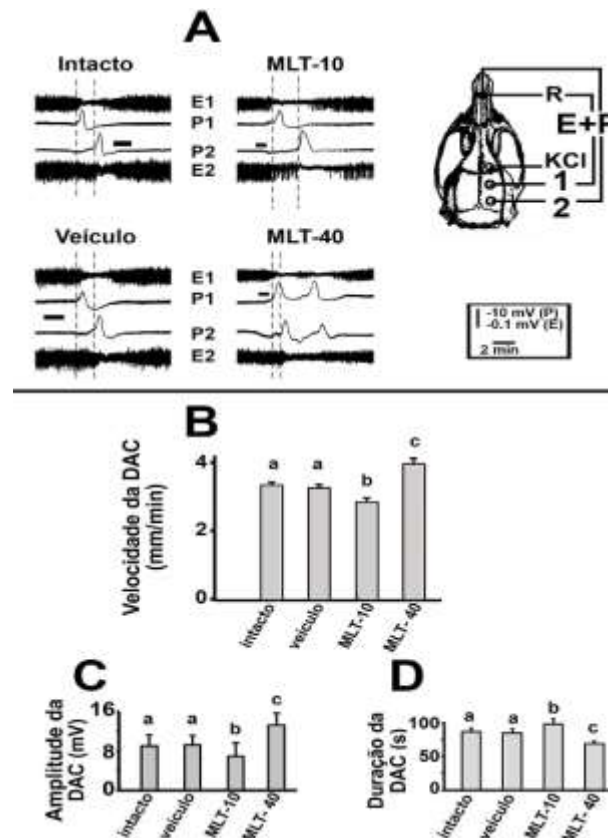


Figura 10. Em (A) mostra-se o eletrocorticograma (E) e o registro da variação lenta de potencial (P) em dois pontos da superfície do hemisfério direito, mostrando a passagem da DAC. O diagrama do crânio mostra as posições 1 e 2 do registro, a posição do eletrodo de referência comum (R), nos ossos nasais, e o ponto de aplicação do estímulo eliciador da DAC (KCl). As linhas verticais tracejadas indicam a latência da DAC para cruzar a distância entre os eletrodos. Latências respectivamente mais longas e mais curtas do que as dos grupos controle podem ser observadas nos grupos tratados com 10 mg/kg e 40 mg/kg de MLT. **B**, **C** e **D** representam, respectivamente, a velocidade da DAC (em mm/min), a sua amplitude (em mV) e a duração (em s), em ratos machos com 36-42 dias de idade, não-tratados (grupo intacto), ou previamente tratados com solução veículo, ou 10 mg/kg/dia ou 40 mg/kg/dia de MLT. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de 12 episódios da DAC por rato, que foram registrados a intervalos de 20 minutos em uma sessão de 4 horas. A administração de veículo e MLT ocorreu do dia 7 ao 27 pós-natal. Nos gráficos de barras, grupos com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA mais teste de Holm-Sidak).

6. DISCUSSÃO

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que documenta, no cérebro de ratos jovens, os efeitos do tratamento crônico com MLT durante o desenvolvimento sobre parâmetros comportamentais (de ansiedade e de memória) e eletrofisiológicos (depressão alastrante) em ratos jovens. Nossos resultados indicam que, além dos efeitos duradouros, as doses baixas e altas de MLT podem atuar respectivamente como antioxidante e pró-oxidante no cérebro, como sugerido pelas velocidades de propagação da DAC correspondentemente mais baixas e mais altas. Embora a maioria dos estudos tenha relatado que a MLT em concentrações fisiológicas protege as mitocôndrias de danos oxidativos, vários estudos relataram que as concentrações farmacológicas (μM a mM) de MLT induziram a geração de EROs em mitocôndrias isoladas de células de fígado de rato, linhagens de células mesangiais humanas e rim de camundongo (MARTINIS *et al.*, 2012; ZHANG¹ *et al.*, 2011; ZHANG² *et al.*, 2011; ZHANG e ZHANG, 2014).

Em roedores, processos como neurogênese, gliogênese, sinaptogênese e mielinização começam por volta do décimo dia embrionário e se estendem até a terceira semana da vida pós-natal (KHALAF-NAZZAL e FRANCIS, 2013). Como em outros órgãos, a organização bioquímica e morfológica do cérebro pode ser alterada pelo estresse oxidativo subsequente ao desequilíbrio representado pelo aumento da produção de EROs, por um lado, e a diminuição da eficácia dos sistemas antioxidantes, por outro (GUEDES *et al.*, 2012). Quando isso ocorre no início da vida, durante o “período de crescimento rápido do cérebro”, as consequências deletérias para o funcionamento do cérebro podem ser mais graves do que quando ocorrem no cérebro adulto (GRANTHAM-MCGREGOR, 1995; GUEDES *et al.*, 2012; SEIFRIED *et al.*, 2007).

Neste estudo, os animais foram submetidos às mesmas condições de ingestão e gasto calórico; interessante, não mostraram diferenças significativas no ganho de peso, mesmo com a administração de MLT (**Figura 6**). Esta pode induzir a perda de peso corporal tanto por uma diminuição da ingestão alimentar como também por aumento do gasto calórico através da termogênese (XU *et al.*, 2020). Em nosso estudo, embora a ingestão e o gasto calórico não tenham sido calculados, o ganho de peso semelhante em todos os grupos sugere ausência de efeito da MLT, nas condições e na faixa etária dos animais do nosso

experimento. Estudo anterior realizado por Agil e colegas (2011) relatou que a administração de MTL (10mg/kg/dia) em animais foi capaz de reduzir o ganho de peso em ratos ZDF com 6 semanas de idade, sendo atribuído ao aumento do gasto energético, especialmente pelo tecido adiposo marrom. Um estudo de coorte sobre nutrição e estilo de vida realizado por pesquisadores em West Washington (n = 15655), encontrou uma forte relação entre a suplementação com MLT, redução ou controle do peso corporal (NACHTIGAL *et al.*, 2005).

Os animais utilizados neste estudo eram jovens e até onde se pode observar, clinicamente saudáveis; sendo assim, não houve diferença significativa na glicemia entre os grupos tratados e controle. Sabe-se que a homeostase da glicose é rigidamente controlada por meio de uma via complexa de mecanismos reguladores que envolvem vários tecidos e órgãos. As evidências existentes são promissoras em relação ao impacto da MLT no controle glicêmico em pacientes diabéticos (DELPINO *et al.*, 2021). Em modelos animais, a MLT parece regular o nível da glicemia por meio de sua capacidade de se ligar diretamente aos seus receptores nos hepatócitos, além de regular a captação de glicose pelos adipócitos através da modulação da expressão do transportador de glicose (DANESHVAR KAKHAKI *et al.*, 2020; KAMPMANN *et al.*, 2021). Estudos recentes sugerem que existe uma relação entre os distúrbios da produção de MLT e o comprometimento do metabolismo da insulina, glicose, lipídios e capacidade antioxidante (AGAHI *et al.*, 2018; DELPINO *et al.*, 2021; RAYGAN *et al.*, 2019). Nossas especulações nesse sentido são limitadas, pois neste estudo não foram mensurados níveis de insulina, lipídios e enzimas antioxidantes que pudessem comprovar alguma relação com a MLT. Tais mensurações tornam-se altamente desejáveis em experimentos futuros, para auxiliar na compreensão das relações entre MLT e metabolismo energético.

Os dados deste estudo revelaram que o tratamento crônico com MLT teve um impacto sobre os testes comportamentais indicativos de memória de reconhecimento de objetos. Embora menor do que nos testes de ansiedade, esse impacto foi estatisticamente significativo sobre o reconhecimento espacial, mas não sobre o reconhecimento de formas, e apenas na dose menor (10 mg/kg) de MLT (**Figura 9**). Roedores espontaneamente preferem a periferia do aparelho de CA e evitam a atividade na parte central do aparelho, sendo que uma maior atividade na região central indica uma menor ansiedade (PRUT e BELZUNG, 2003). No teste de LCE, os animais que receberam a menor dose de MLT (10 mg/kg) entraram mais vezes e

passaram mais tempo na região aversiva (braços abertos), sugerindo também menor ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985). Com os resultados encontrados no CA e LCE, (**Figura 8**) observamos que em geral houve diferenças na exploração na região aversiva, centro do CA e braços abertos do LCE.

Roedores, como ratos e camundongos, possuem uma aversão natural a novidades, neste caso ao teste de CA, assim como para locais iluminados e abertos (STEIMER e DRISCOLL, 2003). Ao ser confrontado com um ambiente novo, vivenciam o conflito entre o impulso de explorar a área/objeto desconhecida, e a motivação para evitar potenciais perigos (CRUSIO, 2001; STEIMER e DRISCOLL, 2003). Essa relação é um indicativo indireto de ansiedade, em que a exploração é inibida gradualmente pela ansiedade (CRAWLEY e GOODWIN, 1980; PELLOW *et al.*, 1985).

A infância e a adolescência são períodos importantes para o desenvolvimento da aprendizagem, da memória e das respostas emocionais, as quais são iniciadas nesse período (SUN *et al.*, 2021). Tem sido sugerido que a MLT tem propriedades anti-inflamatórias, anti-amiloidogênicas e antioxidantes que fundamentam seu potencial para reduzir danos cerebrais e melhorar os déficits de aprendizado e memória com o tratamento a longo prazo (IWASHITA *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2002; ZAKARIA *et al.*, 2016). Foi relatado anteriormente que a MLT ativa a enzima proteína quinase C e quinases relacionadas a Rho que induz a neuritogênese em estágios iniciais, em células N1E-115 e tem a capacidade de regular processos neuroplásticos (BELLON *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2021).

Estudo realizado por Foster e colaboradores (2014) demonstrou que uma única administração de MLT facilita o desempenho cognitivo em humanos. Uma revisão sistemática realizada por Sumsuzzman e colaboradores (2021) relata que, nos testes em humanos, o tratamento agudo com MLT pode aumentar a sensação subjetiva de fadiga e causar uma redução no desempenho. Essa mesma revisão sugere que é preciso realizar mais pesquisas para saber se diferentes formulações de MLT têm eficácia semelhante na melhoria da cognição.

Neste estudo, a análise de parâmetros eletrofisiológico da DAC é usada para identificar possíveis ações antioxidantes (desaceleração da DAC) e pró-oxidantes (aceleração da DAC). A aparente contradição de que um antioxidante bem conhecido como a MLT possa se comportar como um pró-oxidante na DAC pode ser mais facilmente entendida com a ajuda da descoberta de que alguns antioxidantes

podem, em certas circunstâncias, exercer atividades pró-oxidantes, como mostrado por muitos compostos endógenos ou exógenos, como tocoferol, ascorbato ou ácido gálico (BEJARANO *et al.*, 2010; GOGVADZE *et al.*, 2010; MAELLARO *et al.*, 1996; OTERO *et al.*, 1997; PODMORE *et al.*, 1998). De fato, ratos tratados com doses crescentes do antioxidante ácido ascórbico apresentaram um efeito bifásico desse tratamento sobre a propagação da DAC, com desaceleração do fenômeno na dose menor, e aceleração da DAC com doses maiores (MENDES-da-SILVA *et al.*, 2014).

Conforme detalhado na seção de resultados, este estudo sugere que o tratamento de ratos com MLT na dosagem de 40 mg/kg resultou em uma aceleração significativa da DAC (aumento da velocidade), o que pode ser compatível com um efeito pró-oxidante devido à alta dosagem. Sob certas condições, foi sugerido que a MLT exerceria ação moduladora bifásica sobre fenômenos cerebrais dependentes da excitabilidade (EBERT *et al.*, 1999). Os presentes dados suportam nossa hipótese, pois uma dose menor de MLT (10 mg/kg) reduziu a propagação da DAC, o que é característico de um efeito antioxidante. Por outro lado, o grupo que recebeu a dose de MLT 4 vezes maior (40mg/kg) apresentou aceleração da DAC (ver **Figura 10 - B**).

Estudo realizado por Venegas e colaboradores (2012) defende que do ponto de vista terapêutico, a MLT deve ser usada em altas dosagens para que possa atingir concentrações sub-celulares suficientes e exercer efeitos farmacológicos, propondo uma faixa terapêutica entre 10 e 40 mg/kg em ratos. O mesmo estudo relata que a presença de MLT em altas concentrações nas mitocôndrias cerebrais pode refletir o controle homeostático da função mitocondrial, melhorando sua eficácia bioenergética e reduzindo sua produção de EROs. Os mecanismos pelos quais altas concentrações de MLT estimulam a produção de EROs ainda precisam ser determinados; no entanto, Zhang e Zhang (2014) sugerem que a interação fraca entre a calmodulina e a MLT pode estar envolvida na estimulação de EROs. Uma possível especulação é que diferentes concentrações de MLT podem modular diferencialmente a localização sub-celular da calmodulina, ditando assim seu envolvimento nas atividades pró- versus antioxidantes. A calmodulina é uma proteína de ligação de baixa afinidade da MLT e parece mediar a sua ação pró-oxidante. Além disso, a MLT pode interagir com a mitocôndria para potencialmente promover a geração de EROs. Uma observação interessante para o presente estudo é aquela de Torrão e colaboradores (2002), que demonstraram que a aplicação de

elevada concentração de KCl no córtex do rato (um procedimento que sabidamente deflagra a DAC) influencia a expressão de calmodulina. Estudos futuros deverão mensurar parâmetros que comprovem, nessas condições, o aumento de estresse oxidativo.

A MLT pode inibir o influxo de cálcio nos neurônios e se ligar ao complexo cálcio-calmodulina, inibindo assim a atividade neuronal da óxido nítrico sintase (NOS), diminuindo a produção de óxido nítrico (NO) e, portanto, reduzindo o efeito excitatório do N-metil-D-aspartato (LÉON *et al.*, 2000; MUÑOZ-HOYOS *et al.*, 1998). De acordo com Acuña-Castroviejo (1995), a MLT inibe especificamente o subtipo NMDA de receptores glutamatérgicos excitatórios em estriado de rato. Além disso, a MLT aumenta as concentrações de GABA no cérebro e a afinidade do receptor (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 1986; NILES *et al.*, 1987) e potencializa a transmissão inibitória do cérebro via sinapses GABA-érgicas (STEWART e LEUNG, 2005; WAN *et al.*, 1999). Vários dados sugerem o envolvimento de íons de cálcio nos efeitos dos indóis, e parece que a melatonina atua como antagonista dos canais de cálcio do tipo L (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 1997).

A maioria das evidências indica que a MLT é um potente antioxidante *in vivo*, mesmo em concentrações farmacológicas. A ação pró-oxidante da MLT promove respostas inflamatórias e apoptose *in vitro* (RADOGNA *et al.*, 2010; WOLFLER *et al.*, 2001; ZHANG e ZHANG, 2014). É interessante notar que o aumento de espécies reativas de oxigênio pode resultar na elicitação da DAC *in vitro* (NETTO e MARTINS-FERREIRA, 1989) e *in vivo* (EL-BACHÁ *et al.*, 1998).

A DAC é modulada por mudanças na excitabilidade cerebral (KOROLEVA e BURES, 1980) e é influenciada pela produção de EROs no tecido cerebral (EL-BACHÁ *et al.*, 1998). Diferentes velocidades da DAC ao longo do tecido cortical, que indicam diferentes suscetibilidades do cérebro ao fenômeno, estão associadas à manipulação de condições farmacológicas, ambientais e nutricionais (ver Guedes, 2011 para uma revisão). Nos nossos achados a MLT quando administrada em altas dosagens no início da vida pode exercer ação pró-oxidante no cérebro, acelerando a propagação da DAC conforme foi descrito em estudos com outros antioxidantes, como a vitamina C (MENDES-da-SILVA *et al.*, 2014) e a piridoxina (GONDIM-SILVA *et al.*, 2019). Como já mencionado acima, quando administrada em altas doses, a vitamina C exerceu um efeito pró-oxidante na DAC, que esteve associado a níveis

aumentados de malondialdeído cerebral em comparação com os grupos controle correspondentes (MENDES-da-SILVA *et al.*, 2014).

A MLT também pode exercer efeitos anti-excitotóxicos em dosagem suficiente através da sua ação neuroprotetora envolvendo o ácido gama-aminobutírico (GABA) como mediador (PANDI-PERUMAL *et al.*, 2013). Esta possibilidade é apoiada por estudos que indicam que a MLT protege os neurônios da toxicidade do peptídeo beta-amiloide (a principal neurotoxina envolvida na doença de Alzheimer) por meio da ativação dos receptores GABAérgicos (LOUZADA *et al.*, 2004). Outro estudo mostra que após uma lesão por hipóxia em ratos, a administração de MLT reduziu os níveis de glutamato e os danos estruturais causados pela hipóxia aos neurônios, axônios e dendritos no tronco cerebral, sugerindo que é capaz de melhorar a injúria excitotóxica (KAUR *et al.*, 2011). Esses dois neurotransmissores, ácido gama-aminobutírico e glutamato, estão relacionados à neuroexcitabilidade da DAC (DE LIMA *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2018).

Os resultados deste estudo não podem ser atribuídos ao uso do etanol para dissolver a MLT (quantidade mínima) ou ao estresse relacionado à injeção intraperitoneal, pois os grupos controle (veículo e intacto) apresentaram propagação da DAC semelhante. A via de administração oral é clinicamente a mais utilizada, no caso da MLT. Quando ingerida por via oral, apenas 15% da dose de MLT chegam à circulação sistêmica; os 85% restantes podem sofrer significativa metabolização de primeira passagem (DEMURO *et al.*, 2000). Além disso, a MLT não parece produzir dependência fisiológica nem psicológica (ANDERSEN *et al.*, 2016).

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos achados demonstram que os efeitos do tratamento com MLT depende da dose: em baixa dosagem (10 mg/kg) desacelera a propagação da DAC, enquanto que em alta dosagem (40 mg/kg), aumenta a velocidade da DAC. Esses efeitos diferenciais dependentes da dose também são demonstrados em parâmetros comportamentais sugestivos de ansiedade. Sugerimos que a MLT tem potencial para atuar como antioxidante quando administrado em baixas doses, mas como pró-oxidante quando administrado em altas doses. Ainda é incerto se este novo efeito da MLT pode ser extrapolado do rato para o cérebro humano em desenvolvimento. A possibilidade dessa extrapolação aguarda ser confirmada (ou não) por futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Cell protective role of melatonin in the brain. **Journal of Pineal Research**, v.19, p.57–63, 1995.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. **Neuroendocrinology**, v.43, p.24–31, 1986.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.71, p.2997–3025, 2014.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Interaction between calcium ionophore A-23187 and melatonin in the rat striatum. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.53, p.119, 1997.
- AGAHI, M. et al. Effect of melatonin in reducing second-generation antipsychotic metabolic effects: A double blind controlled clinical trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v.12, p.9-15, 2018.
- AGIL, A. et al. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.207-212, 2011.
- AKYUS, E. et al. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. **Life Sciences**, v.265, p.118826, 2021.
- ANDERSEN, L. P. et al. The Safety of Melatonin in Humans. **Clinical Drug Investigation**, v.3, p.169-75, 2016.
- ANGELES-CASTELLANOS, M. et al. Loss of melatonin daily rhythmicity is associated with delirium development in hospitalized older adults. **Sleep Science**, v.9, p.285–288, 2016.
- ARENDT, J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. **Journal of Biological Rhythms**, v.20, p.291–303, 2005.
- ARTEAGA, O. et al. Role Of Antioxidants In Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: New Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.265, 2017.
- AYDIN, N. V. et al. Effect of melatonin on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage. **Neurological Research**, v.27, p.77–82, 2005.
- BARS, D. et al. PET and plasma pharmacokinetic studies after bolus intravenous administration of [¹¹C]melatonin in humans. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation Part B Nuclear Medicine and Biology**, v.18, p.357–362, 1991.

- BEJARANO, I. et al. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.108, p.14-20, 2011.
- BELLON, A. et al. Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.214–21, 2007.
- BERGER, M. et al. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. **Cephalalgia**, v.28, p.558-562, 2008.
- BOSCHE, B. et al. Recurrent spreading depolarizations after subarachnoid hemorrhage decreases oxygen availability in human cerebral cortex. **Annals of Neurology**, v.67, p.607–617, 2010.
- BUMB, J. et al. Differential melatonin alterations in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder and bipolar disorder. **Comprehensive Psychiatry**, v.68, p.34–39, 2016.
- CALZA, A. et al. Neonatal exposure to estradiol in rats influences neuroactive steroid concentrations, GABAA receptor expression, and behavioral sensitivity to anxiolytic drugs. **Journal of Neurochemistry**, v.113, p.1285–95, 2010.
- CARDINALI, D. P. et al. Melatonin therapy in patients with Alzheimer's disease. **Antioxidants**, v.3, p.245–277, 2014.
- CARDINALI, D. P. High doses of melatonin as a potential therapeutic tool for the neurologic sequels of covid-19 infection. **Melatonin Research**, v.3 p.311–317, 2020.
- CARDINALI, D. P. Melatonin: Clinical perspectives in neurodegeneration. **Frontiers in Endocrinology**, v.10, p.480, 2019.
- CHEN, J. et al. Melatonin Attenuates Inflammatory Response-Induced Brain Edema In Early Brain Injury Following A Subarachnoid Hemorrhage: A Possible Role For The Regulation Of Pro-Inflammatory Cytokines. **Journal of Pineal Research**, v.57, p.340–347, 2014.
- CHIBOWSKA, K. et al. Pre-and neonatal exposure to lead (Pb) induces neuroinflammation in the forebrain cortex, hippocampus and cerebellum of rat pups. **International Journal of Molecular Sciences**, n.3, v.21, p.1083, 2020.
- CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. D. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. **Endocrine Reviews**, v.39, p.990-1028, 2018.
- CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of Pineal Research**, v.56, p.371–381, 2014.

- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effect of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.13, p. 399-401, 1980.
- CRUSIO, W. E. Genetic dissection of mouse exploratory behavior. **Behavioural Brain Research**, v.125, p.127-132, 2001.
- CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, v.426, p.1–10, 2001.
- DANESHVAR KAKHAKI, R. et al. Melatonin supplementation and the effects on clinical and metabolic status in Parkinson's disease: a randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v.195, p.105878, 2020.
- DE LIMA, D. S. C. et al. L-Glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v.85, p.241–247, 2009.
- DELPINO, F. M. et al. Effects of melatonin supplementation on diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Clinical Nutrition**, n.7, v.40, p.4595-4605, 2021.
- DEMURO, R. L. et al. The absolute bioavailability of oral melatonin. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.40, p.781-784, 2000.
- DENG, W. G. et al. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. **Blood**, v.108, p.518–524, 2006.
- DERE, E. et al. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.84, p.214–221, 2005.
- DOHMEN, C. et al. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. **Annals of Neurology**, v.63, p.720–728, 2008.
- DREIER, J. P. et al. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Brain**, v.132, p.1866–1881, 2009.
- DREIER, J. P. et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. **Brain**, v.129, p.3224–3237, 2006.
- DREIER, J. P. et al. Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? **Brain**, v.125, p.102–112, 2002.

- DREIER, J. P. et al. Spreading ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Acta Neurochirurgica Supplement**, v.115, p.125–129, 2013.
- DREIER, J. P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. **Nature Medicine**, v.17, p.439–447, 2011.
- DRIJFHOUT, W.J. et al. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.66, p.748–755, 1996.
- DUBOCOVICH, M. L. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. **Pharmacological Reviews**, v.62, p.343-380, 2010.
- EBERT, E. et al. Biphasic effects of melatonin on the propagation of excitation waves in the chicken retina. **Neuroscience Letters**, v.268, p.37-40, 1999.
- EICKHOFF, M. et al. Spreading depression triggers ictal activity in partially disinhibited neuronal tissues. **Experimental Neurology**, v.253, p.11–15, 2014.
- EL-BACHÁ, R. S. et al. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. **Nutritional Neuroscience**, v.1, p.205e212, 1998.
- EL-SHERIF, Y. et al. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. **Journal of Neuroscience Research**, v.72, p.454–460, 2003.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v.31, p.47–59, 1988.
- ERSAHIN, M. et al. Melatonin Reduces Experimental Subarachnoid Hemorrhage-Induced Oxidative Brain Damage And Neurological Symptoms. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.324–32, 2009.
- ESCAMES, G. et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. **Journal of Pineal Research**, v.40, p.71–78, 2006.
- ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Antiinflammatory Activity of Melatonin in Central Nervous System. **Current. Neuropharmacology**, v.8, p.228–242, 2010.
- FAVERO, G. et al. Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation. **International Journal of Endocrinology**, v.2017, p.1835195, 2017.
- FAVERO, G. et al. Promising antineoplastic actions of melatonin. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, p.1086, 2018.

- FIFKOVA, E. et al. Leão's spreading depression in the cerebellum of rat. **Experientia**, v.17, p.572-573, 1961.
- FOSTER, P. S. et al. Administration of exogenous melatonin increases spreading activation in lexical memory networks. **Human Psychopharmacology**, v. 29, p.397-404, 2014.
- FRANCISCO, E. S.; GUEDES, R. C. A. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. **Amino Acids**, v.47, p.2437–2445, 2015.
- GALANO, A. et al. Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxy radical scavenging activity of melatonin. **The Royal Society of Chemistry**, v.4, p.5220–5227, 2014.
- GALANO, A. et al. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage. **Molecules**, v.23, p.E530, 2018.
- GALANO, A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and series of peroxy radicals. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.13, p.7178–7188, 2011.
- GALANO, A. et al. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v.54, p.245–257, 2013.
- GALANO, A.; REITER, R. J. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: from individual actions to collective protection. **Journal of Pineal Research**, v.65, p. e12514, 2018.
- GOGVADZE, V. et al. Involvement of Ca(2+) and ROS in alpha-tocopheryl succinate-induced mitochondrial permeabilization. **International Journal of Cancer**, v.127, p.1823-1832, 2010.
- GORJI, A.; SPECKAMNN, E. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. **European Journal of Neuroscience**, v.19, p.3371-3374, 2004.
- GONDIM-SILVA, K. R. et al. Neonatal pyridoxine administration long lastingly accelerates cortical spreading depression in male rats, without affecting anxiety-like behavior. **Nutritional Neuroscience**, v.24, p.363-370, 2021.
- GRAFSTEIN, B. Mechanism of spreading cortical depression. **Journal of Neurophysiology**, v.19, p.154–171, 1956.
- GRANTHAM-MCGREGOR, S. A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. **Journal of Nutrition**, v.125, p2233S–8S, 1995.

- GUEDES, R. C. A.; ABADIE-GUEDES, R. Brain Aging and Electrophysiological Signaling: Revisiting the Spreading Depression Model. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.11, p.136, 2019.
- GUEDES, R. C. A.; CAVALHEIRO, E. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Research**, v.27, p.33-40, 1997.
- GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression: a model for studying brain consequences of malnutrition. In: Preedy, V.R., Watson, R.R., Martin, C.R. (Eds.), **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. Springer, Berlin, p.2343-2355, 2011.
- GUEDES, R. C. A. et al. Microglial response in aged rats after early undernourishment reduced maternal care and late exercise: stereological analysis of the dentate gyrus. In: 10th **European Meeting on Glial Cells in Health and Disease**, 2011, Prague. **Late Abstract Book. Prague: Czech Neuroscience Society**, v.1, p.19, 2011.
- GUEDES, R. C. A. et al. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v.1036, p.109-114, 2005.
- GUEDES, R. C. A. et al. The use of cortical spreading depression for studying the brain actions of antioxidants. **Nutritional Neuroscience**, v.15, p.111-119, 2012.
- GUNATA, M. et al. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. **Revue neurologique**, n.3, v.176, p.148-165, 2020.
- GUPTA, M. et al. Effects Of Add-On Melatonin Administration On Antioxidant Enzymes I'n Children With Epilepsy Taking Carbamazepine Monotherapy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Epilepsia**, n.12, v.45, p.1636–9, 2004.
- GURUNATHAN, S. et al. Role and Therapeutic Potential of Melatonin in the Central Nervous System and Cancers. **Cancers**, v.12, p.1567, 2020.
- HAMPSHIRE, A. et al. Cognitive deficits in people who have recovered from COVID-19. **EClinicalMedicine**, v.17, p.3, 2021.
- HARDELAND, R. Aging, melatonin and the pro- and anti-inflammatory networks. **Int. International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.1223, 2019.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin and brain inflammaging. **Progress in Neurobiology**, v.127–128, p.46–63, 2015.
- HARDELAND, R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. **J Journal of Pineal Research**, v.65, p.12525, 2018.

- HARDELAND, R. Melatonin and neuroinflammation: Encouraging findings vs. fundamental problems. In: Català A., editor. *Pineal Gland: Research Advances and Clinical Challenges*. Nova Science; Hauppauge, p.163–204, 2017.
- HARDELAND, R. Taxon- and Site-Specific Melatonin Catabolism. **Molecules**, v.22, 2017.
- HARTINGS, J. A. et al. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. **The Lancet Neurology**, v.10, p.1058–1064, 2011.
- HARTINGS, J. A. et al. Spreading depolarizations and late secondary insults after traumatic brain injury. **Jornal of Neurotrauma**, v.26, p.1857-66, 2009.
- HE, H. et al. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease. **Current Neuropharmacology**, n.3, v.8, p.211–217, 2010.
- HIRATA, F. et al. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.1311-1313, 1974.
- HUANG, F. et al. The melatonergic system in anxiety disorders and the role of melatonin in conditional fear. **Vitamins and Hormones**, v.103, p.281–294, 2017.
- IFTIKHAR, W. et al. Migrainous Infarction and Cortical Spreading Depression. **Discoveries (Craiova)**, v.8, p.e112, 2020.
- IWASHITA, H. et al. “The melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine facilitates long-term object memory in young and aging mice.” **Journal of Pineal Research**, v. 70, p.e12703, 2021.
- JIMENEZ-JORGE, S. et al. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.240–246, 2007.
- JOCKERS, R. et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **British Journal of Pharmacology**, v.173, p.2702-2725, 2016.
- JOSEPH, D. et al. Getting rhythm: how do babies do it? **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v.100, p.F50–F54, 2014.
- KAMPMANN, U. et al. Acute metabolic effects of melatonin in a randomized crossover study in healthy young men. **Journal of Pineal Research**, v.70, p.e12706, 2021.
- KAPPERS, J.A. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, v.52, p.163–215, 1960.
- KAUR, C. et al. Hypoxia-induced cellular and vascular changes in the nucleus tractus solitarius and ventrolateral medulla. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.70, p.201–217, 2011.

- KAVAKLI, A. et al. The Effects Of Melatonin On Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Model. **Saudi Medical Journal**, n.11, v.25, p.1751–2, 2004.
- KHALAF-NAZZAL, R.; FRANCIS F. Hippocampal development–old and new findings. **Neuroscience**, v.248, p.225–42, 2013.
- KLEIN, D. C. et al. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Biochemical Society Transactions**, v.20, p.299–304, 1992.
- KOCIC, G. et al. Antioxidative, membrane protective and antiapoptotic effects of melatonin, in silico study of physico-chemical profile and efficiency of nanoliposome delivery compared to betaine. **RSC Advances**, v.7, p.1271–1281, 2017.
- KOROLEVA, V. I.; BURES, J. Blockade of cortical spreading depression in electrically and chemically stimulated areas of cerebral cortex in rats. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v.48, p.1e15, 1980.
- KOTLER, M. et al. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. **Journal of Pineal Research**, v.24, p.83–89, 1998.
- KRAIG, R. P.; NICHOLSON, C. Extracellular ionic variations during spreading depression. **Neuroscience**, v.3, p.1045–1059, 1978.
- LAMTAI, M. et al. Melatonin Ameliorates Cadmium-Induced Affective and Cognitive Impairments and Hippocampal Oxidative Stress in Rat. **Biological Trace Element Research**, v.199, p.1445–1455, 2021.
- LAUDON, M. et al. Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. **Neuroendocrinology**, v.48, p.577–583, 1988.
- LAURITZEN, M. Cortical spreading depression as a putative migraine mechanism. **Trends in Neurosciences**, v.10, p.8-13, 1987.
- LAURITZEN, M.; STRONG, A. J. ‘Spreading depression of Leão’ and its emerging relevance to acute brain injury in humans. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.37, p.1553–1570, 2017.
- LE GRAND, S. M. et al. Melatonin inhibits cortical spreading depression-evoked trigeminal nociception. **Neuroreport**, v.17, p.1709-1713, 2006.
- LEÃO, A. A. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v.10, p.409–414, 1947.
- LEÃO, A. A. Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v.7, p.391–396, 1944b.

- LEÃO, A. A. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v.7, p.359–390, 1944a.
- LEÃO, A. A.; Morison, R. S. Propagation of spreading cortical depression. **Journal of Neurophysiology**, v.8, p.33–45, 1945.
- LEE, E. J. et al. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. **Journal of Pineal Research**, v.38, p.42–52, 2005.
- LEE, S. H. et al. Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. **Journal of Pineal Research**, v.40, p.79–85, 2006.
- LEÓN, J. et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. **Journal of Neurochemistry**, v.98, p.2023–2033, 2006.
- LIU, Y. J. et al. Apolipoprotein E influences melatonin biosynthesis by regulating NAT and MAOA expression in C6 cells. **Journal of Pineal Research**, v.52, p.397–402, 2012.
- LIU, Y. J. et al. Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. **Journal of Pineal Research**, v.43, p.232–238, 2007.
- LÓPEZ, L. C. et al. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: Its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.38, p.267–278, 2006.
- LOUZADA, P. R. et al. Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. **The FASEB Journal**, v.18, p.511–518, 2004.
- MA, X. et al. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. **Drug Metabolism & Disposition**, v.33, p.489–494, 2005.
- MAELLARO, E. et al. Protection by ascorbate against apoptosis of thymocytes: implications of ascorbate-induced nonlethal oxidative stress and poly(ADP-ribosyl)ation. **Experimental Cell Research**, v.226, p.105–113, 1996.
- MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.35, p.676–692, 2011.
- MAJIDINIA, M. et al. The role of melatonin, a multitasking molecule, in retarding the processes of ageing. **Ageing Research Reviews**, v.47, p.198–213, 2018.

- MARONDE, E. et al. CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. **Journal of Pineal Research**, v.27, p.170–182, 1999.
- MARTÍNEZ LEO, E. E.; SEGURA CAMPOS, M. R. Systemic oxidative stress: a key point in neurodegeneration: a review. **The Journal of Nutrition, Health and Aging**, v.23, p.694–699, 2019.
- MARTINIS, P. Interactions of melatonin with mammalian mitochondria. Reducer of energy capacity and amplifier of permeability transition. **Amino Acids**, v.42, p.1827–1837, 2012.
- MAYO, J. C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v.165, p.139–149, 2005.
- MAZZUCHELLI, C. et al. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. **Molecular Brain Research**, v.39, p.117–126, 1996.
- MENDES-DA-SILVA, R. F. et al . Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: A cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. **Neuropharmacology**, v.86, p.155-160, 2014.
- MESGARI, M. et al. Gabapentin prevents cortical spreading depolarization-induced disinhibition. **Neuroscience**, v.36, p.1–5, 2017.
- MOLINA-CARBALLO, A. et al. Melatonin increases following convulsive seizures may be related to its anticonvulsant properties at physiological concentrations. **Neuropediatrics**, v.38, p.122-125, 2007.
- MOLINA-CARBALLO, A. et al. Utility Of High Doses Of Melatonin As Adjunctive Anticonvulsant Therapy In A Child With Severe Myoclonic Epilepsy: Two Year's Experience. **Journal of Pineal Research**, v.23, p.97–105, 1997.
- MUÑOZ-HOYOS, A. et al. Comparison between tryptophan methoxyindole and kynurenine metabolic pathways in normal and preterm neonates and in neonates with acute fetal distress. **European Journal of Endocrinology**, v.139, p.89–95, 1998.
- MUÑOZ-HOYOS, A. et al. Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: Experimental and clinical evidence. **Journal of Child Neurology**, v.13, p.501–509, 1998.
- MUSSHOFF, U. et al. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. **Hippocampus**, v.12, p.165-73, 2002.

- MUTCH, W. A. C.; HANSEN, A. J. Extracellular Ph changes during spreading depression and cerebral-ischemia—mechanisms of brain Ph regulation. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.4, p.17–27, 1984.
- NACHTIGAL, M. C. et al. Dietary supplements and weight control in a middleage population. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.1, p.909-915, 2005.
- NARANJO-RODRIGUEZ, E. B. et al. Anxiolytic-like actions of melatonin, 5-metoxytryptophol, 5-hydroxytryptophol and benzodiazepines on a conflict procedure. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.24, p.117–129, 2000.
- NEELY, C. L. C. et al. Localization of free and bound metal species through X-Ray synchrotron fluorescence microscopy in the rodent brain and their relation to behavior. **Brain Sciences**, v.9, p.74, 2019.
- NETTO, M.; MARTINS-FERREIRA, H. Elicitation of spreading depression by rose Bengal photodynamic action. **Photochemistry and Photobiology**, v.50, p.229e234, 1989.
- NILES, L. P. et al. Effect of chronic melatonin administration of GABA and diazepam binding in rat brain. **Journal of Neural Transmission**, v.70, p.117–124, 1987.
- NONNO, R. et al. 2-[125I]Iodomelatonin binding sites in the bovine hippocampus are not sensitive to guanine nucleotides. **Neuroscience Letters**, v.194, p.113–116, 1995.
- OLAYAKI, L. A. et al. Melatonin prevents and ameliorates lead-induced gonadotoxicity through antioxidative and hormonal mechanisms. **Toxicology and Industrial Health**, v.34, p.596–608, 2018.
- OTERO, P. et al. Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. **Free Radical Research**, v.27, p.619–626, 1997.
- OUAKKI, S. et al. Conversion of L-Tryptophan into Melatonin Is the Possible Action Pathway Involved in the Effect of L-Tryptophan on Antidepressant-Related Behavior in Female Rats: Analysis of the Influence of Treatment Duration. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v.3, p.362–372, 2013.
- OWENS, L. et al. Effect of circadian clock gene mutations on nonvisual photoreception in the mouse. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.53, p.454–460, 2012.
- PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. **Neurotoxicity Research**, v.23, p.267-300, 2013.

- PAREDES, S. D. et al. Melatonin Counteracts at a Transcriptional Level the Inflammatory and Apoptotic Response Secondary to Ischemic Brain Injury Induced by Middle Cerebral Artery Blockade in Aging Rats. **BioResearch Open Access**, v.4, p.407–416, 2015.
- PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.
- PERMPOONPUTTANA, K.; GOVITRAPONG, P. The anti-inflammatory effect of melatonin on methamphetamine-induced proinflammatory mediators in human neuroblastoma dopamine SH-SY5Y cell lines. **Neurotoxicity Research**, v.23, p.189–199, 2013.
- PETERS, J. L. et al. Melatonin modulates intercellular communication among cultured chick astrocytes. **Brain Research**, v.1031, p.10–19, 2005.
- PETZOLD, G. C. et al. Nitric oxide modulates spreading depolarization threshold in the human and rodent cortex. **Stroke**, v.39, p.1292–1299, 2008.
- PODMORE, I. D. et al. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature**, v.392, p.559, 1998.
- POEGGELER, B. et al. Melatonin, Hydroxyl Radical-Mediated Oxidative Damage, And Aging: A Hypothesis. **Journal of Pineal Research**, v.14, p.151-68, 1993.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p. 3-33, 2003.
- PUSIC, A. D. et al. Spreading depression transiently disrupts myelin via interferon-gamma signaling. **Experimental Neurology**, v.264, p.43-54, 2015.
- RADOGNA, F. et al. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v.80, p.1844–1852, 2010.
- RAHMAN, M. F. et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. **Toxicology Letters**, v.187, p.15–21, 2009.
- RAJ, V. et al. Cognitive and psychological issues in postural tachycardia syndrome. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.215, p.46–55, 2018.
- RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G. B. et al. Melatonin modulates dendrite maturation and complexity in the dorsal-and ventral dentate gyrus concomitantly with its antidepressant-like effect in male balb/c mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.1724, 2020.
- RAYGAN, F. et al. Melatonin administration lowers biomarkers of oxidative stress and cardio-metabolic risk in type 2 diabetic patients with coronary heart

- disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Nutrition**, v.38, p.191e6, 2019.
- REDINS, G. M. et al. The effect of treatment with melatonin upon the ultrastructure of the mouse pineal gland: a quantitative study. **Brazilian Journal of Biology**, v.61, p. 679-684, 2001.
- REITER, R. J. et al. Melatonin: exceeding expectations. **Physiology**, v.29, p.325-33, 2014.
- REITER, R. J. et al. Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. **Nutrition**, v.21, p.920–924, 2005.
- REITER, R. J. et al. Mitochondria: Central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions. **Molecules**, v.23, p.509, 2018.
- REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: Under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v.61, p.253–278, 2016.
- REITER, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.79, p.C153-C158, 1991.
- REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **The FASEB Journal**, v.9, p.526–533, 1995.
- REITER, R. J. et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.44, p.175–200, 2009.
- RESSMEYER, A. R. et al. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. **Redox Report**, v.8, p.205–213, 2003.
- RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.36, p.1–9, 2004.
- ROGERS, M. L. et al. Simultaneous monitoring of potassium, glucose and lactate during spreading depolarization in the injured human brain – Proof of principle of a novel real-time neurochemical analysis system, continuous online microdialysis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.37, p.1883–1895, 2017.
- ROMERO, A., et al. A review of metal-catalyzed molecular damage: Protection by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.56, p.343–370, 2014.
- ROSALES-CORRAL, S. A. et al. Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.52, p.167–202, 2011.

- SADEGHIAN, H. et al. Spreading despolarizations trigger caveolin-1-dependent endothelial transcytosis. **Annals of Neurology**, v.84, p.409-423, 2018.
- SANCHEZ-BARCELO, E. J. et al. Clinical uses of melatonin in neurological diseases and mental and behavioural disorders. **Current Medicinal Chemistry**, v.24, p.3851-3878, 2017.
- SEIFMAN, M. et al. Endogenous Melatonin Increases in Cerebrospinal Fluid of Patients after Severe Traumatic Brain Injury and Correlates with Oxidative Stress and Metabolic Disarray. **British Journal of Pharmacology**, v.28, p.684–696, 2008.
- SEIFRIED, H. E. et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, p.567–579, 2007.
- SHARMA, R. et al. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v.1068, p.230–236, 2006.
- SHEKLETON, J. A. et al. Sleep disturbance and melatonin levels following traumatic brain injury. **Neurology**, v.74, p.1732–1738, 2010.
- SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: functions and ligands. **Drug Discovery Today**, v.19, p.1410-1418, 2014.
- SINGHAL, N. K. et al. Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.97– 109, 2011.
- SOLDOZY, S. et al. Cortical Spreading Depression in the Setting of Traumatic Brain Injury. **World Neurosurgery**, v.134, p.50-57, 2020.
- SOLEIMANI, E. et al. Maternal administration of melatonin prevents spatial learning and memory deficits induced by developmental ethanol and lead co-exposure. **Physiology & Behavior**, v.173, p.200–208, 2017.
- SOMJEN, G. G. Aristides Leão's discovery of cortical spreading depression. **Journal of Neurophysiology**, v.94, p.2–4, 2005.
- SOUSA, M. S. B. et al. Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.33, p.472-482, 2018.
- SPONG, K. E. et al. Mechanisms of spreading depolarization in vertebrate and insect central nervous systems. **Journal of Neurophysiology**, v.116, p.1117–1127, 2016.
- SRINIVASAN, V. Melatonin oxidative stress and neurodegenerative diseases. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.40, p.668–679, 2002.

- STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress**, v.6, p.87-100, 2003.
- STEWART, L. S.; LEUNG, L. S. Hippocampal melatonin receptors modulate seizure threshold. **Epilepsia**, v.46, p.473–480, 2005.
- STREIT, D. S. et al. Spreading Depression in Isolated Spinal Cord **Journal of Neurophysiology**, v.74, p.888-890, 1995.
- STRONG, A. J. et al. The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1. Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.3, p.86–96, 1983.
- SUMSUZZMAN, D. M. et al. Differential role of melatonin in healthy brain aging: a systematic review and meta-analysis of the SAMP8 model. **Aging (Albany NY)**, v.13, p.9373-9397, 2021.
- SUN, Y. et al. Effects of Melatonin on Neurobehavior and Cognition in a Cerebral Palsy Model of *plppr5*^{-/-} Mice. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.22, p.598788, 2021.
- TAKANO, K. et al. The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. **Annals of Neurology**, v.39, p.308–318, 1996.
- TAN, D. X. et al. Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. **Biological Signals and Receptors**, v.8, p.70–74, 1999.
- TAN, D. X. et al. Cyclic-3-hydroxymelatonin (c3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. **Current Medicinal Chemistry**, v.21, p.1557–1565, 2014.
- TAN, D. X. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.181-197, 2002.
- TANIGUTI, E. H. et al. Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v.188, p.270–275, 2018.
- TEIVE, H. A. et al. Leão's cortical spreading depression: from experimental "artifact" to physiological principle. **Neurology**, v.65, p.1455–1459, 2005.
- TORDJMAN, S. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v.15, p.434-443, 2017.

- TORRÃO, A. S. et al. Application of potassium chloride to the surface of the rat visual cortex differentially affects the expression of presumptive neuroprotective molecules. **Journal of Neurocytology**, v.31, p.49-55, 2002.
- TORRENTE, D. et al. Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: Is there a role for astrocytes? **Neuroscience Letters**, v.565, p.2–6, 2014.
- VENEGAS, C. et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v.52, p.217–227, 2012.
- VIANA, L. C. et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v.238, p.280–96, 2013.
- VINOGRADOVA, L. V. Initiation of spreading depression by synaptic and network hyperactivity: Insights into trigger mechanisms of migraine aura. **Cephalalgia**, v.38, p.1177–1187, 2018.
- VYSKOCIL, F. et al. Potassium-selective microelectrodes used for measuring the extracellular brain potassium during spreading depression and anoxic depolarization in rats. **Brain Research**, v.39, p.255–259, 1972.
- XU, Z. et al. Elucidating the Regulatory Role of Melatonin in Brown, White, and Beige Adipocytes. **Advances in Nutrition**, v.11, p.447-460, 2020.
- WAN, Q. et al. Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors. **Nature Neuroscience**, v.2, p.401–403, 1999.
- WANG, F. W. et al. A. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis *in vitro*. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, p.2346–2355, 2013.
- WANG, X. et al. Methazolamide And Melatonin Inhibit Mitochondrial Cytochrome C Release And Are Neuroprotective In Experimental Models Of Ischemic Injury. **Stroke**, v.40, p.1877–1885, 2009.
- WELLS, R. et al. Brain fog in postural tachycardia syndrome: An objective cerebral blood flow and neurocognitive analysis. **Journal of Arrhythmia**, v.36, p.549–552, 2020.
- WOLFLER, A. et al. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. **FEBS Letters**, v.502, p.127– 131, 2001.
- WU, H. J. neuroprotective mechanisms of melatonin in hemorrhagic stroke. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.37, p.1173-1185, 2017.
- YANG, Y. et al. Melatonin prevents cell death and mitochondrial dysfunction via a SIRT1-dependent mechanism during ischemic-stroke in mice. **Journal of Pineal Research**, v.58, p.61–70, 2014.

- YU, G. M. et al. The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells. **PLoS One**, v.12, p.e0178525, 2017.
- ZAHRA E. et al. The influence of gonadectomy on anxiolytic and antidepressant effects of melatonin in male and female Wistar rats: a possible implication of sex hormones. **Neuroscience and Medicine**, v.3, p.162-173, 2012.
- ZAKARIA, R. et al. The potential role of melatonin on memory function: lessons from rodent studies. **Folia Biologica (Czech Republic)**, v. 62, n.5, 181–187, 2016.
- ZHANG, H. M.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v.57, p.131-46, 2014.
- ZHANG¹, H. M. et al. The role of mitochondrial complex III in melatonin-induced ROS production in cultured mesangial cells. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.78–82, 2011.
- ZHANG², H. et al. Impaired mitochondrial complex III and melatonin responsive reactive oxygen species generation in kidney mitochondria of db/db mice. **Journal of Pineal Research**, v.51, p.338–344, 2011.
- ZOU, L. Y. et al. Melatonin reduces infarction volume in a photothrombotic stroke model in the wild-type but not cyclooxygenase-1-gene knockout mice. **Journal of Pineal Research**, v.41, p.150–156, 2006.



**Universidade Federal de
Pernambuco**
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Ofício nº
33/20

Recife, 26 de junho de 2020

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes

Centro de Biociências

Departamento de Nutrição/UFPE

processo nº0006/2020

Certificamos que a proposta intitulada “**Administração de melatonina e desenvolvimento cerebral: análise de parâmetros comportamentais (de ansiedade) e eletrofisiológicos (depressão alastrante) em ratos jovens**”. registrado com o nº0006/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/04/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/07/2020 a 24/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	40
Peso/Idade	13g a 130g/7 a 40 dias
Sexo	macho (40)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente



Prof. Sebastião R. F. Silva
-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691