



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ANNA CAROLINA LOPES DE LIRA

**ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
MORFOMÉTRICA DO CÉREBRO DE RATOS JOVENS
SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE E TRATADOS COM
MELATONINA**

Recife
2023

ANNA CAROLINA LOPES DE LIRA

**ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
MORFOMÉTRICA DO CÉREBRO DE RATOS JOVENS
SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE E TRATADOS COM
MELATONINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Fernanda das Chagas Angelo
Mendes Tenório

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lira, Anna Carolina Lopes de.

Análise eletrofisiológica, morfológica e morfométrica do cérebro de ratos jovens submetidos ao desmame precoce e tratados com melatonina / Anna Carolina Lopes de Lira. - Recife, 2023.

67 : il., tab.

Orientador(a): Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Melatonina. 2. Desmame precoce. 3. Desnutrição. 4. Ratos. 5. Cérebro. I. Tenório, Fernanda das Chagas Angelo Mendes . (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

ANNA CAROLINA LOPES DE LIRA

**ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA, MORFOLÓGICA E
MORFOMÉTRICA DO CÉREBRO DE RATOS JOVENS SUBMETIDOS
AO DESMAME PRECOCE E TRATADOS COM MELATONINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 24/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

Prof. Dr. Bruno Mendes Tenório
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

Dedico este trabalho a Deus, minha família, meu noivo e a todos que me acolheram e deram a mão nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar e cuidar todos os dias, desde os pequenos aos maiores detalhes. A Ele sou grata por cada fase e por ter me dado forças para continuar, da mesma forma também, por me permitir realizar esta conquista que por muitas vezes foi tão sonhada.

Agradeço à minha querida orientadora, Dra. Fernanda Tenório, por compartilhar seus conhecimentos, pela parceria, paciência e por ter acreditado no meu potencial; assim como por toda a orientação durante estes anos de trabalho juntas. Ao Professor Dr. Bruno Tenório, por seus ensinamentos e disponibilidade para ajudar sempre que necessário. O Professor Dr. Rubem Guedes também foi parte muito importante quando aceitou fazer uma parceria, entre os laboratórios, para a execução deste projeto. Agradeço ao CNPq e a UFPE pelo investimento financeiro neste projeto, por meio do PIBIC/UFPE/CNPq 2021-2022.

A todos os colegas do Laboratório de Morfotecnologia; em especial Marcos Aurélio, José Anderson, Jennyfer Carvalho, Ana Vitória, Giovanna Borba e Ryan Cristia; meu muito obrigada por cada contribuição que vocês deram a este trabalho e à minha experiência com pesquisa. Sou grata particularmente à Maria Luísa Figueira, por toda a parceria e ensinamentos que me incentivam e inspiram mais do que imagina. À Liga de Histologia e Embriologia da UFPE (LAHE), por ter surgido e me abraçado como uma oportunidade ímpar de desenvolvimento de conhecimento e habilidades, além de ter sido um meio para conhecer muitas outras pessoas da área.

Aos meus colegas de curso e às minhas amigas da graduação Derly Rodrigues, Eloiza Lessa, Rayanne Brenda e Stefany Santana, que me acompanharam nesta caminhada e desde o primeiro dia de aula fizeram os dias mais leves e mais felizes.

A todos os meus professores da graduação em Biomedicina do Centro de Biociências-CB/UFPE, por terem contribuído com a minha formação acadêmica e profissional. Assim como a todos os profissionais Biomédicos e técnicos que me receberam tão bem no Hospital Otávio de Freitas (HOF), em Recife-PE, por toda paciência e ensinamentos importantes que levarei pra vida.

Aos meus pais, Zélia e Gilberto, pelo apoio e imensuráveis esforços feitos para que eu chegasse até aqui hoje; assim como meus irmãos Clarisse, Miguel e Catarinna, que se fizeram bem presentes, cada um bem à sua maneira, em todo o processo.

Ao meu companheiro de vida, Levi Filho, por todo apoio e por segurar minhas mãos (mesmo que distantes) em momentos difíceis, além de vibrar comigo em cada bom momento e pequena conquista.

Aos meus familiares, que em Recife me acolheram e compartilharam tantos momentos, me fazendo sentir em casa, e os que em Petrolina estavam torcendo pelo meu sucesso. Em especial, meu avô Luiz, minha tia-avó Pedrina e minha avó Adelaide.

Aos meus amigos, que por tantas vezes compreenderam minha ausência e distância, mas se alegraram com minhas conquistas também.

À todos que, de alguma forma contribuíram no processo desta caminhada, meu muito obrigada!

"O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; Ele nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo! Não se desanime!" (Deuteronômio 31:8)

LIRA, Anna Carolina Lopes de. **Análise eletrofisiológica, morfológica e morfométrica do cérebro de ratos jovens submetidos ao desmame precoce e tratados com melatonina**. 2023. 67. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A nutrição apropriada no período crítico do desenvolvimento, correspondente às fases pré-natal e da lactação, exerce profundo impacto no amadurecimento das estruturas e funções cerebrais de mamíferos. O desmame precoce, por sua vez, é uma das causas que induz na prole um quadro de desequilíbrio nutricional, desencadeando uma condição de estresse metabólico. A terapia nutricional é um método utilizado para corrigir os efeitos desencadeados pela desnutrição, associando também elementos que tenham a capacidade de auxiliar na correção do desequilíbrio redox. A associação terapêutica acelera o processo da normalização das taxas fisiológicas desreguladas pelo déficit nutricional. O objetivo da atual pesquisa é investigar as alterações eletrofisiológicas, morfológicas e morfométricas do cérebro de ratos jovens submetidos ao desmame precoce e tratados com melatonina. Os filhotes de ratas Wistar (n=40) foram divididos igualmente em quatro grupos, sendo um deles usado como Controle e os outros três submetidos ao desmame precoce, sendo DP (desmame precoce), DP+Mel (desmame precoce associado à melatonina) e DP+Veículo (desmame precoce associado ao uso de um veículo). A melatonina foi aplicada na dosagem de 200 µg/100g de peso corporal do animal, por via subcutânea. Quando os filhotes chegaram aos 45º dias de vida, foram submetidos a testes comportamentais, seguidos do registro eletrofisiológico da depressão alastrante cortical (DAC), registro de massa corporal e do cérebro, análise histológica e morfométrica, análise fractal, teste de apoptose e análise estatística. Através destas metodologias, verificou-se que o grupo DP+Mel demonstrou resultados semelhantes aos do grupo Controle, com diminuição da ansiedade, DAC mais eficiente, menor concentração lipídica, menor apoptose, entre outros, quando comparados com os resultados do grupo DP e DP+Veículo. Os resultados deste trabalho oferecem informações importantes sobre o papel modulador do desmame precoce e do uso da melatonina no desenvolvimento do sistema nervoso central da prole.

Palavras-chave: Melatonina. Desmame precoce. Desnutrição. Ratos. Cérebro.

LIRA, Anna Carolina Lopes de. **Electrophysiological, morphological and morphometric analysis of the brain of young rats submitted to early weaning and treated with melatonin.** 2023. 67. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Appropriate nutrition in the critical period of development, corresponding to the prenatal and lactation phases, has a profound impact on the maturation of brain structures and functions in mammals. Early weaning, in turn, is one of the causes that induce a nutritional imbalance in the offspring, triggering a condition of metabolic stress. Nutritional therapy is a method used to correct the effects triggered by malnutrition, also associating elements that have the ability to help correct the redox imbalance. The therapeutic association accelerates the process of normalization of physiological rates deregulated by nutritional deficit. The objective of the current research is to investigate the electrophysiological, morphological and morphometric changes in the brain of young rats submitted to early weaning and treated with melatonin. Wistar rat pups (n=40) were equally divided into four groups, one of which was used as a Control and the other three underwent early weaning, namely DP (early weaning), DP+Honey (early weaning associated with melatonin) and PD+Vehicle (early weaning associated with the use of a vehicle). Melatonin was applied at a dosage of 200 µg/100g of the animal's body weight, subcutaneously. When the pups reached the 45th day of life, they were submitted to behavioral tests, followed by electrophysiological recording of cortical spreading depression (CAD), body and brain mass recording, histological and morphometric analysis, fractal analysis, apoptosis test and statistical analysis. Through these methodologies, it was verified that the DP+Honey group showed results similar to those of the Control group, with a decrease in anxiety, more efficient CAD, lower lipid concentration, less apoptosis, among others, when compared with the results of the DP and PD groups +Vehicle. The results of this work provide important information about the modulating role of early weaning and the use of melatonin in the development of the offspring's central nervous system.

Keywords: Melatonin. Early weaning. Malnutrition. Rats. Brain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da Depressão alastrante cortical (DAC)	30
Figura 2 – Representação do teste de comportamento Labirinto em cruz elevada	31
Figura 3 – Representação do teste de comportamento em Campo aberto	31
Figura 4 – Eletrocorticografia das ondas de Depressão alastrante cortical (DAC)	38
Figura 5 – Fotomicrografia da região cortical do cérebro dos animais corados com sudan black	41
Figura 6 – Fotomicrografia do teste de apoptose dos cérebros dos animais	42
Figura 7 – Gráfico da dimensão fractal (índice estatístico racional de detalhes de complexidade em um padrão)	43
Figura 8 – Gráfico da lacunaridade (descreve a textura de um fractal)	44
Figura 9 – Fotomicrografia do cérebro dos animais dos grupos experimentais, após o uso do programa ImageJ, para análise morfométrica.	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Análise do teste de comportamento Campo Aberto	36
Quadro 2 - Análise do teste de comportamento Labirinto em Cruz Elevada	37
Quadro 3 - Registro eletrofisiológico da Depressão Alastrante Cortical (DAC)	39
Quadro 4 - Peso dos animais e Índice organossomático	40
Quadro 5 – Análise morfométrica da contagem de intensidade de coloração com o Sudan Black	41
Quadro 6: Análise fractal das fotomicrografias no ImageJ	43
Quadro 7: Análise morfométrica das fotomicrografias no ImageJ	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE	Barreira Hematoencefálica
DAC	Depressão Alastrante Cortical
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desmame Precoce
EEG	Eletroencefalograma
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
IOS	Índice Organossomático
MEL	Melatonina
NSQ	Núcleos Supraquiasmáticos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
SN	Sistema Nervoso
TCE	Traumatismo Cranioencefálico
TGI	Trato Gastrointestinal
VLV	Variação Lenta de Voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LEITE MATERNO E SUA IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO

2.2 DESMAME PRECOCE E ESTRESSE OXIDATIVO

2.3 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO

2.4 MELATONINA

2.5 MELATONINA E SUA ATUAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO

2.6 MELATONINA E COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE

2.7 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

2.8 ANÁLISE FRACTAL

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

4.2 DESMAME PRECOCE

4.3 TRATAMENTO COM MELATONINA

4.4 REGISTRO DA MASSA CORPORAL

4.5 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC)

4.6 PESO DO CÉREBRO E ÍNDICE ORGANOSSOMÁTICO

4.7 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

4. 8 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

4. 9 TESTE DE APOPTOSE (PROTOCOLO DE TUNEL)

4. 10 ANÁLISE FRACTAL

4. 11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5 RESULTADOS

- 5.1. ANÁLISE DO TESTE DE COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO
- 5.2. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA
- 5.3. ANÁLISE DA DEPRESSÃO ALASTRANTE
- 5.4. ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS E ÍNDICE ORGANOSSOMÁTICO
- 5.5. ANÁLISE DO SUDAN BLACK
- 5.6. TESTE DE APOPTOSE
- 5.7. ANÁLISE MORFOMÉTRICA E FRACTAL

6 DISCUSSÃO

7 CONCLUSÃO

8 REFERÊNCIAS

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de aprovação de comitê de ética no uso de Animal (CEUA) da UFPE

1. INTRODUÇÃO

A demanda nutricional do lactente é prontamente atendida pelo aleitamento materno exclusivo, ele reúne características nutricionais consideradas ideais, além de contribuir para a formação imunológica e psicológica do lactente (VITOLLO, 2003). Quando este é interrompido subitamente, se considera que houve um desmame precoce (DP) (OLIVEIRA, 201). Quando o desmame acontece precocemente, há, consecutivamente, uma oferta inadequada de nutrientes, havendo carência nutricional e sendo esta considerada crítica nos primeiros anos de vida, pois a capacidade de utilizar os nutrientes de maneira efetiva é limitada, devido sua imaturidade fisiológica (ALVES, 2004). Caracterizados como sendo de ordem adaptativa, compensatória, homeostática, de programação ou reprogramação, os efeitos do desmame precoce sobre o sistema nervoso central são evidenciados também sob os aspectos de caráter de longo prazo, permanente ou ainda multigeracional (SCHWEIGERT, 2009).

Investigações anteriores elucidaram que a ingestão insuficiente de nutrientes, assim como a suplementação com antioxidantes, é capaz de interferir no desenvolvimento do sistema nervoso (SN). Alterando a velocidade da Depressão Alastrante Cortical (DAC) e sendo também possível encontrar alterações na morfologia e morfometria das células do cérebro afetado. Mesmo que o organismo possua defesas antioxidantes endógenas efetivas para o combate ao excesso de radicais livres, os antioxidantes obtidos por meio de suplementação exógena são indispensáveis para a defesa apropriada contra o desequilíbrio redox, portanto, possuem importante papel na manutenção da saúde (MENDES-DA-SILVA, 2014; SOUSA, 2018.).

Dessa forma, a carência nutricional ou desnutrição, ainda é considerada um alarmante problema de saúde pública, pois os efeitos deletérios decorrentes deste quadro influenciam de forma negativa na dinâmica do sistema fisiológico, principalmente em crianças (DOS SANTOS, 2017). Insultos nutricionais podem ocasionar a produção excessiva de radicais livres (RL) no tecido cerebral e dano

oxidativo a macromoléculas nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo, bem como alterações eletrofisiológicas permanentes (GUEDES, 1996).

Para a recuperação do estado nutricional, é feita usualmente a terapia nutricional, a fim de restaurar a dinâmica fisiológica (BOTO, 2019). Para que esta recuperação nutricional possa acontecer de forma mais acelerada, é feita a associação com a suplementação de componentes que possam reduzir o desequilíbrio redox (BAGANHA, 2018). Como no caso da melatonina (MEL), que pode atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável, protegendo as células sadias do organismo contra a ação oxidante dos RL, que se apresenta elevada em condições de estresse metabólico (ZIMMERMANN, 2016).

A MEL, neuro-hormônio sintetizado pela glândula pineal, é responsável por modular os ritmos endógenos sincronizados, como os ciclos circadianos e sazonais (REITER, 2001). Esta é uma molécula anfifílica com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), atuando como agente neuroprotetor durante o período neonatal e em condições de neurodegeneração, interferindo nos processos da histogênese (BAYDAS, 2007).

Com isso, sabendo-se que a MEL tem a capacidade de atravessar a BHE, além de possuir influência neuroprotetora, e que existem poucos estudos a respeito dos efeitos da melatonina no desmame precoce. O presente estudo buscou analisar a hipótese de que a suplementação com melatonina no período inicial da vida interfere na atividade eletrofisiológica, morfológica e morfométrica de células do córtex cerebral durante o desenvolvimento neuronal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LEITE MATERNO E SUA IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO

O leite materno contém inúmeros fatores imunológicos que protegem o recém-nascido contra infecções (VIEIRA, 2009), como por exemplo imunoglobulinas, proteínas, e fatores tróficos importantes para o desenvolvimento do corpo (WEAVER, 1986). Os lactentes, durante os primeiros meses de vida, são desprovidos de parte significativa dos fatores fisiológicos de proteção, apresentando vulnerabilidade durante este período crítico da existência para enfrentar a vida pós-natal, portanto, o aleitamento se faz necessário para suprir todas as necessidades do lactente (BRASIL, 2012).

Em mamíferos, os períodos iniciais da vida (gestação, lactação e primeira infância) são considerados críticos para o desenvolvimento dos diversos sistemas orgânicos devido à rápida proliferação e diferenciação celular (MORGANE, 1993). Nestes períodos, o organismo fica mais suscetível a estímulos ambientais gerando respostas adaptativas que se refletem em alterações morfológicas, fisiológicas e/ou comportamentais (GUEDES, 2004). Com isto, uma nutrição equilibrada, principalmente durante os períodos críticos para o desenvolvimento, é indispensável para um amadurecimento adequado.

O aleitamento materno é a mais sábia estratégia natural de vínculo, afeto, proteção e nutrição para a criança e constitui a mais sensível, econômica e eficaz intervenção para redução da morbimortalidade infantil. Permite ainda um grandioso impacto na promoção da saúde integral da dupla mãe/bebê e regozijo de toda a sociedade (BRASIL, 2015).

Os principais benefícios do Aleitamento Materno (em curto, médio e longo prazo) são para a mulher: menor sangramento pós-parto e, conseqüentemente, menor incidência de anemias; recuperação mais rápida do peso pré-gestacional; menor prevalência de câncer de ovário, endométrio e mama; melhor homeostase da glicose em mulheres que amamentam, trazendo proteção contra diabetes para ela e para o bebê; menos fraturas ósseas por osteoporose. Assim como para a criança são: redução da mortalidade na infância; proteção contra diarreia; proteção contra infecções respiratórias; proteção contra alergias; proteção contra hipertensão,

hipercolesterolemia e diabetes; proteção contra obesidade; promoção do crescimento; promoção do desenvolvimento cognitivo; promoção do desenvolvimento da cavidade bucal; promoção do vínculo afetivo entre mãe e filho (CAPUTO NETO, 2013).

Grande parte do leite é produzida, enquanto a criança mama, sob o estímulo da prolactina. A ocitocina, liberada principalmente pelo estímulo provocado pela sucção da criança, também é disponibilizada em resposta a estímulos condicionados, tais como visão, cheiro e choro da criança, e a fatores de ordem emocional como motivação, autoconfiança e tranquilidade. Por outro lado, a dor, o desconforto, o estresse, a ansiedade, o medo, a insegurança e a falta de autoconfiança podem inibir a liberação da ocitocina, prejudicando a saída de leite da mama (CAPUTO NETO, 2013).

2.2 DESMAME PRECOCE E ESTRESSE OXIDATIVO

O desmame é uma etapa natural na vida dos mamíferos, quando o período do aleitamento materno é interrompido abruptamente, se considera que houve um desmame precoce (DP) (OLIVEIRA, 2011). Consequentemente, com a oferta inadequada de nutrientes, há uma carência nutricional, considerada alarmante nos primeiros anos de vida, pois a capacidade de utilizar os nutrientes de maneira efetiva é limitada, devido à imaturidade fisiológica da prole, podendo levar a um quadro de desnutrição (ALVES, 2004).

A desnutrição é um estado anormal que é provocado pelo consumo inadequado de macronutrientes, como proteínas, carboidratos e lipídios, ou de micronutrientes, como vitaminas e minerais (FAO, 2012). Mesmo contando, atualmente, com tecnologia, informações e numerosos avanços no ambiente de cuidados com a saúde, a desnutrição continua sendo um dos principais problemas de saúde pública do século, principalmente em regiões em desenvolvimento, sendo, ainda hoje, uma causa expressiva de mortalidade infantil no Brasil (FAO; WHO, 2018).

O período mais crítico para a desnutrição é compreendido entre os seis meses de vida aos dois anos de idade. O estado nutricional infantil retrata, além do consumo alimentar, o estado de saúde e, quando a desnutrição acomete a criança de forma grave, todos os seus órgãos são comprometidos, havendo a possibilidade de óbito, caso não seja aplicado o tratamento de forma correta. A desnutrição infantil possui o desmame precoce como um de seus multifatores, sendo fortemente enraizada pela inversão de valores culturais relacionados ao aleitamento materno, fundamental para o desenvolvimento do organismo (FAO, 2012).

Mesmo que, atualmente, haja o empenho de órgãos como a Organização Mundial da Saúde (OMS) em reduzir os índices dos casos de desnutrição, as taxas dessa doença de natureza clínico-social multifatorial ainda são preocupantes, sendo responsável por cerca de 55% das mortes de crianças até os cinco anos de idade em todo o mundo (SAWAYA, 2006). Dessa forma, torna-se importante investigar metodologias que possam auxiliar na abordagem adequada da recuperação nutricional.

Sabe-se que Insultos nutricionais ocasionam a produção excessiva de radicais livres e a depleção acentuada de defesas antioxidantes (TOYOKUNI, 2006). Nessas situações, há a agressão celular, tecidual e apoptose, que são decorrentes da atividade de compostos como o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), assim como outros radicais de oxigênio; além disso, também são produzidas citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, interleucinas e prostaglandinas (TSANTES, 2006). Este quadro dinâmico causa deficiências no sistema imunológico, aumenta os riscos de desenvolvimento de infecções e eleva a predisposição ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ALBERDA, 2006).

O desequilíbrio redox pode causar danos celulares ao atacar membranas, ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos, levando a alterações funcionais e ao desenvolvimento de diversas doenças. Alguns sintomas característicos da desnutrição, tais como a perda de massa muscular e de gordura, anemia e alterações ósseas e psicológicas, podem estar diretamente relacionados à condição

do desequilíbrio das reações de oxirredução do organismo (BIRBEN, 2012; SAWAYA, 2006; UTTARA, 2009).

Mesmo que o organismo possua defesas antioxidantes endógenas efetivas para o combate ao excesso de radicais livres, os antioxidantes obtidos por meio de suplementação exógena são indispensáveis na manutenção da saúde. Pois, quando em quantidade suficiente para uma boa atividade, é capaz de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável, protegendo as células sadias do organismo contra a ação oxidante dos RL. Essa característica pode ser importante para amenizar os efeitos desencadeados pela desnutrição, pois a manifestação destes está relacionada ao processo do desequilíbrio redox (BIRBEN, 2012; SAWAYA, 2006; UTTARA, 2009).

2.3 DESNUTRIÇÃO E SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso é composto basicamente pelo tecido nervoso, sendo ele distribuído por todo o corpo. É formado por neurônios e as células glia ou neuróglia, os quais possuem origem no ectoderma, também é composto por células modificadas do tecido conjuntivo e epitelial. Todas estas células agrupam-se, formando o Sistema Nervoso, que é dividido em Sistema Nervoso Central (SNC) (encéfalo e medula espinhal, protegido pelas meninges) e em Sistema Nervoso Periférico (SNP) (gânglios nervosos e nervos) (NETO, 2017). Os nervos são constituídos principalmente por prolongamentos dos neurônios situados no SNC ou nos gânglios nervosos. O tecido nervoso apresenta dois componentes principais: os neurônios, células geralmente com longos prolongamentos, e vários tipos de células da glia ou neuróglia (astrócitos, células de Schwann, células endodimárias e oligodendrócitos), que sustentam os neurônios e participam de outras funções importantes. A organização macroscópica pode ser vista pela visualização de substância branca (axônios mielinizados), substância cinzenta (corpos e dendritos) e a reticular (intermediária do tronco encefálico). (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013)

O tecido cerebral é alvo dos vários danos oxidativos que acometem as macromoléculas nas regiões do córtex (GUEDES, 1996; EL-BACHÁ, 1998), hipocampo e cerebelo (FEOLI, 2005); este também está suscetível a alterações eletrofisiológicas permanentes (ROCHA-DE-MELO, 2006; FRÍAS, 2010). Desta forma, é importante buscar formas para corrigir o desequilíbrio redox gerado em condições de estresse metabólico (ZIMMERMANN, 2016), como é o caso da desnutrição causada pelo desmame precoce e de suas repercussões.

O papel da nutrição adequada para o desenvolvimento do ser humano é de grande importância, pois esta está diretamente relacionada ao amadurecimento morfofisiológico do organismo (CHEN, 2018). Contudo, os perfis correspondentes aos déficits nutricionais, ainda são notificados com alta frequência atualmente, o que indica que a desnutrição ainda é um significativo problema de saúde pública (FÁVARO-MOREIRA, 2016). A depender da duração, da idade ou do período da vida em que se inicia o quadro de desnutrição, os efeitos podem ser variáveis, podendo manifestar-se como efeitos brandos e possivelmente reversíveis, a efeitos severos e irreversíveis (MORGANE, 1993).

A desnutrição é uma doença, de origem multifatorial, que ainda é relacionada como uma das causas principais, a nível global, de morbidade e de mortalidade entre crianças (BARRERA, 2020). Esta é caracterizada como um estado patológico causado pela não ingestão ou pela não absorção de macro ou de micronutrientes em suas proporções adequadas (MARTORELL, 2001). Este quadro pode ter início de forma prematura, ainda no ambiente intrauterino, e também na infância, devido à interrupção precoce do aleitamento materno exclusivo, além da suplementação alimentar inadequada (RUIZ, 1985). Os efeitos das condições de lactação desfavoráveis no desenvolvimento do SN têm sido cada vez mais investigados, podendo comprometer a saúde em longo prazo (VASONCELOS, 2001; ZIPPEL, 2003; ROCHA-DE-MELO, 2006; TENÓRIO, 2009); sendo alguns duradouros, seguidos por danos à função mental, causando déficits cognitivos (NAHAR, 2009; BATISTA-DE-OLIVEIRA, 2012).

Para o SN, os efeitos da desnutrição são muito mais severos quando esta se manifesta nos períodos iniciais da vida (DOBBING, 1968), correspondentes à fase importante do desenvolvimento. Essa fase relaciona-se respectivamente ao período pré-natal e ao período de lactação. Durante estes estágios, os processos envolvidos no desenvolvimento do cérebro acontecem de forma acelerada, fazendo com que este fique mais vulnerável às alterações às quais está exposto (MORGANE, 1993).

O resultado do déficit nutricional leva a adaptações da célula em períodos críticos do crescimento, alterando permanentemente o metabolismo por meio de alterações hormonais, que acontecem na tentativa de adaptação (VICTORA, 2008); como consequência, há o comprometimento do desenvolvimento e no funcionamento de órgãos e sistemas, tendo como exemplo, o tecido cerebral (PASSANHA; CERVATO MANCUSO; SILVA, 2010). Estudos anteriores foram capazes de demonstrar que o DP promove modificações morfofisiológicas e neurocomportamentais na vida adulta (PLOTSKY; MEANEY, 1993). Dentre essas modificações, pode-se citar a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, correspondente a um perfil de estresse (LADD, 2000), redução da massa encefálica (PESSANHA, 2015) e redução na síntese da bainha de mielina (KIKUSUI, 2007). Essas alterações estão relacionadas ao funcionamento desarranjado de funções cerebrais.

Alterações neuroquímicas, estruturais e comportamentais, nesses casos, se tornam significativas no cérebro dos mamíferos (GRANTHAM-McGREGOR, 1990), além de influenciar no desenvolvimento do SN, alterando-o do ponto de vista eletrofisiológico, o que pode ser estudado por meio do fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC). Em estudos laboratoriais utilizando roedores, também submetidos à desnutrição nos períodos iniciais da vida, exibiram da mesma forma que há alterações cerebrais significativas, demonstradas a partir do aumento da velocidade de propagação do fenômeno eletrofisiológico conhecido como DAC (XIMENES-DA-SILVA, 1991).

Além das complicações e das patologias relacionadas à desnutrição no início da vida (GUEDES, 2011), estudos anteriores realizados em animais e em humanos,

evidenciaram uma relação entre a desnutrição e as patologias que estão ligadas à excitabilidade cerebral (CREPIN, 2009). Taboada-Crispi et al., (2018) ao estudar eletroencefalogramas (EEG), foi capaz de evidenciar que crianças de até 10 anos de idade, que sofreram com quadros de desnutrição durante o primeiro ano de vida, apresentaram atividades anormais no padrão do EEG, quando comparadas a crianças que não sofriam com desnutrição.

2.4 MELATONINA

Os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo são os responsáveis por integrar nos mamíferos, a conexão entre a temporalidade externa e a percepção interna. Os NSQ recebem mensagens advindas do ambiente externo, e as transmitem por meio de neurônios eferentes do segmento cervical da medula, até chegar aos gânglios simpáticos cervicais superiores, os quais levam a informação para a glândula pineal (HIRIART, 2012).

A glândula pineal é um órgão endócrino ativo, que se localiza no teto do terceiro ventrículo. Sua constituição inclui células com função neurosecretora, chamadas de pinealócitos, que são responsáveis por secretar produtos bioquimicamente específicos, que são as indolaminas e os peptídeos (KASECKER, 2017). A melatonina (MEL), também conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, por sua vez, é um dos principais produtos da pineal (GUNASEKARAN, 2008). Há evidências de que além da síntese pela pineal, também haja síntese e liberação da MEL nos órgãos do trato gastrointestinal (TGI), nos rins, no fígado, em células do sistema imune e em algumas regiões do SN (LANOIX, 2008).

A MEL é um neuro-hormônio, derivado do triptofano, e é sintetizado de forma natural no corpo dos mamíferos. Esta é transportada no plasma ligado a proteínas, em especial à albumina, tendo sua vida média variando entre 30 e 60 minutos, além de ser responsável por regular os ciclos circadianos; sua secreção ocorre

principalmente no período da noite. A MEL é uma molécula anfifílica, ou seja, tem alta solubilidade em lipídios, e esta característica permite que sua passagem através das membranas celulares seja facilitada, permitindo que esta possa atravessar a BHE sem dificuldade (MAGANHIN, 2008).

A luz é um fator ambiental que regula a secreção da MEL (HEBERT, 2002). A exposição à luz leva à inibição da pineal, por meio da ativação do NSP, um grupo de neurônios do hipotálamo medial, que possui projeções gabaérgicas inibitórias direcionadas à atividade da pineal, impedindo que esta secrete a indolamina (LEWY, 1980). O pico de secreção da melatonina é alcançado na primeira metade da noite, decaindo gradualmente (HIRIAT, 2012). Com isso, a MEL acaba sendo considerada um tipo de sinalizador neuroendócrino do ciclo claro-escuro.

Estudos anteriores evidenciaram que a secreção da MEL também ocorre de forma diferenciada a depender da estação do ano, como é o caso do verão e do inverno (RANDALL, 1995). No inverno, tanto a produção quanto a secreção do neuro-hormônio acontecem em maior proporção, enquanto que durante o verão, essas atividades acontecem de forma contrária (KENNAWAY, 1986). Essas diferenças influenciam diretamente na reprodução, no comportamento e no crescimento da pelagem dos mamíferos (WEHR, 1997), indicando que essa substância atua controlando as atividades secretórias de diferentes substâncias endógenas.

A MEL participa de uma variedade de processos celulares, neuroendócrinos e neurofisiológicos. Além de regular o ciclo sono-vigília, o sistema imunológico e o cardiovascular, também contam com a sua atividade para manterem-se em equilíbrio (BURKHALTER, 2016). Processos como o metabolismo de lipídios e de carboidratos, a regulação da temperatura corporal, processos carcinogênicos, atividade gastrointestinal, e a pressão sanguínea também são regulados pelo neuro-hormônio (HIRIART, 2012; SOARES JR, 2003).

Além das atividades cronobiológica, imunomodulatória, antitumoral, a MEL também se destaca pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Por ser um potente agente antioxidante, e eliminador de radicais livres, a MEL pode atuar a nível mitocondrial evitando danos ao DNA e melhorando a atividade da cadeia transportadora de elétrons (REITER, 2016). Além disso, esse hormônio e seus metabólitos também são capazes de modular a transcrição de genes de enzimas antioxidantes (TOMÁS-ZAPICO, 2005), e se ligar a calmodulina para modular a produção de Óxido Nítrico (ON), reduzindo os RL e consequentemente os danos oxidativos (BOUTIN, 2016).

Tendo em vista que a MEL possui atividade antioxidante e que os níveis deste hormônio no plasma aumentam durante a gestação, atingindo valores elevados no fim desse período (TOMÁS-ZAPICO, 2005), sugere-se que esse desempenhe um importante papel no desenvolvimento do feto. Estudos anteriores indicam que a MEL modula a plasticidade neuronal, evitando atraso na maturação cerebral de ratos com hiperhomocisteinemia induzida (BAYDAS, 2008), sendo capaz de modular interações fisiológicas, principalmente as características hormonais em neonatos (CHEN, 2013).

2.5 MELATONINA E SUA ATUAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO

A MEL também é produzida por outros órgãos, além da glândula pineal (LANOIX, 2008). A produção da indolamina pelo SN pode ser evidenciada em locais como medula, cerebelo, córtex cerebral, ponte e núcleo grácil; as células do SN, como neurônios e astrócitos, também apresentam a habilidade de síntese da MEL, que expressa importância para a manutenção da integridade celular e da dinâmica fisiológica (LIU, 2007, 2012; ACUNA-CASTROVIEJO, 2014; WU, 2017).

Devido à sua atividade antioxidante e à capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), estudos demonstraram que a MEL protege células cerebrais e células nervosas de diferentes tipos de danos (LIN, 2000; LI, 2009; WU,

2016; CARLONI, 2016). Mesenge et al., (1988), por exemplo, demonstraram que a MEL (200 µg/100g de peso corporal do animal) reduz de forma significativa as deficiências funcionais neurológicas, decorrentes de um traumatismo cranioencefálico (TCE) em uma espécie de roedor, e este achado pode ser atribuído às suas propriedades antioxidantes.

Investigações utilizando a suplementação com melatonina exógena sugeriram que o neuro-hormônio apresenta atividade neuroprotetora. Estudos experimentais utilizando um modelo de isquemia cerebral em roedores, puderam elucidar que a o tratamento com a MEL exógena foi capaz de inibir morte celular, apoptose, além de reduzir espécies reativas de oxigênio (EROs) (LI, 2014); Chung et al., 2003 e Wu et al. 2016, também demonstraram que a peroxidação lipídica e a neurodegeneração do hipocampo puderam ser suprimidas com a aplicação da MEL.

A MEL pode intervir de formas variadas para diminuir os insultos no SN e corrigir a dinâmica homeostática. A indolamina possui benefícios considerados importantes para manter o organismo saudável como, por exemplo, a prevenção da síntese de compostos neurotóxicos, a limitação do desequilíbrio redox, a atividade anti-neuroinflamatória e a desaceleração da neurodegeneração (WU, 2017; BOUTIN, 2016; CARLONI, 2016); além disso, SALES et al. (2019) e colaboradores, apresentaram em seus testes que a MEL demonstrou ausência de toxicidade em mamíferos. Esses dados indicam com clareza que essa substância atua de forma importante no SN, podendo ser utilizada como ferramenta para tratamentos de diversos distúrbios.

2.6 MELATONINA E COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE

O circuito neural da ansiedade envolve a percepção e integração das informações sensoriais dos estímulos sinalizadores de perigo (inatos ou aprendidos) (MARCELO, 2013). Ela é percebida como uma emoção caracterizada por um alerta tenso e fisicamente exaustivo, focalizado em um perigo ou emergência iminente e

inevitável, embora não objetivamente aparente, com uma incerteza dolorosa sobre a possibilidade de se resolver a situação (MARTIN, 1998). Podendo ser revelada em vários momentos da vida do indivíduo, a proporção e a duração da ansiedade depende da ocasião na qual ela se manifestou (GODOY, 2002).

Em muitos estudos clínicos, a MEL foi utilizada como ferramenta para aliviar distúrbios do sono e reduzir desequilíbrios causados por alterações circadianas (UBEROS, 2011; JAIN, 2015; ROCHA, 2017). Isso foi possível porque o neuro-hormônio, além de ser relacionado à regulação do sistema circadiano, das atividades antioxidantes e imunológicas (PINATO, 2015; TAN, 2000; JOSHI, 2015; ASGHARI, 2016), também está ligado à modulação das características comportamentais, principalmente as relacionadas à ansiedade (WEIL, 2006; JONSSON, 2014; COMAI, 2015)

A deleção dos receptores de melatonina induz comportamentos semelhantes a depressão e ansiedade em camundongos. O comportamento de ansiedade é influenciado pela ação de neurotransmissores como dopamina, serotonina, noradrenalina, ocitocina e GABA (SERSON, 2016) Segundo GOMAA et al. 2017, a MEL é capaz de reduzir os níveis séricos do cortisol e de elevar a liberação de serotonina, ocitocina e de norepinefrina no córtex frontal, influenciando, consequentemente, na redução da ansiedade.

O campo aberto é um modelo utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do rato em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo (PRUT e BELZUNG, 2003). Este padrão comportamental permite uma análise do nível de excitabilidade do sistema nervoso central e, consequentemente, a avaliação da atividade locomotora espontânea do animal. Neste caso, foram utilizados para analisar o efeito do desmame precoce e da melatonina sobre o cérebro do roedor.

Já o teste de labirinto em cruz elevada se baseia no conhecimento de que roedores evitam locais elevados e abertos. Uma vez nesta situação, podem demonstrar sinais de medo como micção, defecação e congelamento. Quando

colocado no labirinto, o roedor pode explorar ambos os braços, abertos e fechados, mas comumente permanecerá por mais tempo nos braços fechados como área de maior segurança. Analisando o comportamento, pode-se dizer que quanto mais ansiosos, menos tempo permanecem nos braços abertos e o oposto deste comportamento marca o quão confiante e exploratórios eles estão. Este teste representa um importante instrumento de pesquisa na área experimental para estudos de comportamentos relacionados à ansiedade, em especial na análise do efeito farmacológico de novas drogas (LISTER, 1987).

2.7 DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL

A Depressão Alastrante Cortical (DAC) é um fenômeno utilizado como modelo experimental para analisar as modificações eletrofisiológicas no cérebro, decorrentes das alterações metabólicas (LEÃO, 1951). Este consiste em uma redução da atividade elétrica cerebral em resposta à estimulação elétrica, mecânica ou química de um ponto da superfície cerebral (LEÃO, 1944); essa resposta é acompanhada do aparecimento de uma Variação Lenta de Voltagem (VLV) na região do cérebro invadida. Assim, o fenômeno pode ser de grande utilidade para compreender a influência do desenvolvimento cerebral frente a insultos e tratamentos.

A deflagração da depressão alastrante cortical (DAC) e a velocidade com que ela se propaga no córtex cerebral são influenciados pelo nível de excitabilidade deste órgão (GUEDES, 1984). Tanto a redução da atividade elétrica, quanto a VLV, características da DAC, se propagam (alastram) de forma concêntrica, a partir do ponto estimulado; a recuperação completa do tecido cortical é obtida após cerca de 10 a 15 minutos. A capacidade do cérebro de propagar a DAC pode ser aumentada ou prejudicada através da manipulação experimental da excitabilidade do tecido cortical (GUEDES, 2011).

Vários fatores, já conhecidos e estudados, podem levar à alteração da sua velocidade de propagação (GUEDES, 1992; GUEDES et al, 1996). A velocidade com que a DAC se propaga é maior naquelas situações em que a resistência do tecido nervoso ao fenômeno está diminuída e vice-versa (LEÃO, 1963, 1972; GUEDES, 1984). Condições que alteram a excitabilidade neural em geral modificam também as características da DA no tecido alterado (GUEDES e DO CARMO, 1980; GUEDES, 1984; GUEDES et al, 1996; 2002).

Investigações anteriores elucidaram que a ingestão insuficiente de nutrientes, assim como a suplementação com antioxidantes, é capaz de interferir no desenvolvimento do sistema nervoso (SN), alterando a velocidade da DAC (MENDES-DA-SILVA, 2014; SOUSA, 2018). Tendo em vista que a melatonina possui atividade antioxidante, sugere-se que ela desempenhe um importante papel modulando a plasticidade neuronal, evitando atraso na maturação cerebral de ratos com desmame precoce induzido, sendo capaz de modular interações fisiológicas.

2.8 ANÁLISE FRACTAL

Estudos recentes observaram que modelos matemáticos euclidianos, que há muito estabelecidos e que procuram reproduzir a geometria da natureza, às vezes se apresentam incompletos e, em determinadas situações, inadequados. Especificamente porque muitas das formas encontradas na natureza não são círculos, triângulos, esferas, icosaédros ou retângulos. Uma vez que não são simples curvas, superfícies ou sólidos, conforme definidos na geometria clássica de Euclides (300 a.C), cujos teoremas possuem lugar de destaque nos textos de geometria. O termo fractal aplica-se, em geral, a construções diversas, tanto nas ditas formas abstratas como nas formas inerentes à natureza, que são objeto de estudo da Física, enquanto forma e leis de formação e de escala (ASSIS, 2008).

O conceito de dimensão fractal vem atualmente sendo aplicado e calculado para linhas, figuras ou superfícies em diversos campos. Na medicina, por exemplo,

como método de diagnóstico quantitativo de patologias. Um dos campos onde este procedimento é mais desenvolvido é o diagnóstico do câncer, através da análise de imagens de tumores. As evidências experimentais sugerem que tumores de câncer apresentam uma fronteira com dimensão fractal superior às que ocorrem em agregados de tecidos normais. Um exemplo, nesta linha de investigação, é o da detecção de núcleos atípicos (SEDIVY et al., 1999). Pode-se também verificar aplicações nas mais diversas áreas da ciência, listando-se aplicações na Mineralogia, com o objetivo de medir a densidade dos minerais, a evolução dos terrenos e a descontinuidade das rochas; na indústria com a detecção automática de falhas em produtos têxteis; no solo, na chuva, na economia, na ecologia; na Biologia para a análise da rugosidade dos fungos e de corais (JONES et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a eletrofisiologia, morfologia e morfometria do cérebro de ratos jovens submetidos ao desmame precoce e tratados com melatonina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Submeter os filhotes ao desmame precoce com 15 dias de vida;
- Realizar o tratamento com a aplicação de melatonina por via subcutânea;
- Estudar o comportamento dos animais dos diversos grupos experimentais;
- Analisar os parâmetros eletrofisiológicos do fenômeno da “Depressão Alastrante Cortical” (velocidade de propagação, amplitude e duração);
- Realizar análise do peso dos animais e índice organossomático;
- Fazer análise histológica, histoquímica e morfométrica do cérebro;
- Avaliar o teste apoptótico do cérebro de ratos submetidos ao protocolo de desmame precoce e tratados com melatonina;
- Realizar Análise de fractal no cérebro dos animais estudados;

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL:

O presente trabalho vem de um projeto guarda-chuva que tem aprovação do comitê de ética no uso de animais da UFPE sob número nº 0045/2020. Foram utilizados 40 ratos albinos da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Nutrição, da Universidade Federal de Pernambuco. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água ad libitum, no ciclo claro-escuro invertido. Os animais foram divididos em quatro grupos, cada constituído por 10 animais, a saber:

- Grupo Controle - ratos com desmame normal (21 dias de vida);
- Grupo DP – ratos com desmame precoce (15 dias de vida);
- Grupo DP+Veículo – ratos com desmame precoce (15 dias de vida) e tratados com solução veículo por 30 dias;
- Grupo DP+Mel - ratos com desmame precoce (15 dias de vida) e tratados com melatonina (200 µg/100g de peso corporal do animal) por 30 dias.

4.2 DESMAME PRECOCE:

No ser humano, o período crítico de desenvolvimento vai da vida pré-natal até os 18 meses de vida pós-natal, enquanto que no rato, este período corresponde às três primeiras semanas de vida pós-natal (WIGGINS, 1984). Em modelos animais, o DP pode ser induzido através de três formas. A primeira é a intervenção farmacológica, que pode ser induzida por meio da aplicação da bromocriptina, um agonista do receptor de dopamina D2, que atua inibindo a liberação da prolactina, evitando que haja síntese de leite; a segunda pode ser realizada através da ausência materna, que se faz pelo afastamento da mãe de sua ninhada no 14º dia de vida pós natal; e a terceira pode ser realizada por meio da aplicação de bandagens no corpo da fêmea (YOUNES-RAPOZO, 2015). Todos os protocolos impedem que o lactente tenha acesso ao leite. No atual estudo, o método de

desmame escolhido foi a separação dos filhotes e das mães, quando completaram 15 dias de vida, período correspondente ao desmame precoce.

4.3 TRATAMENTO COM MELATONINA:

A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi administrada na dose de 200 µg de melatonina por 100g de peso corporal do animal por meio de injeções por via subcutânea no início do ciclo escuro (08:00h) durante 30 dias, respectivamente. A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina (NaCl a 0,9%).

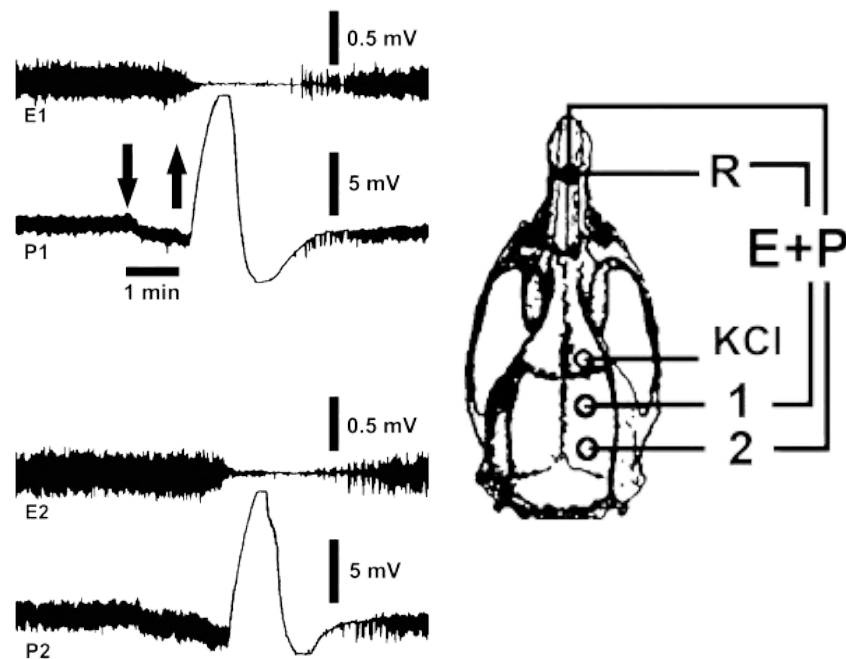
4.4 REGISTRO DA MASSA CORPORAL:

O peso corpóreo dos animais foi registrado a partir do sétimo dia de vida dos mesmos. Desde então, a pesagem foi realizada a cada sete dias, até a data do registro eletrofisiológico.

4.5 REGISTRO DA DEPRESSÃO ALASTRANTE CORTICAL (DAC):

A fim de se obter o registro eletrofisiológico, os animais foram anestesiados (via intraperitoneal) com uma solução de 1g/Kg de uretana acrescido de 40 mg/Kg cloralose. A seguir, foram trepanados, na porção direita do crânio, três orifícios, alinhados na direção anteroposterior, paralelos à linha média, com os centros desses orifícios distantes 4-6 mm um do outro. O orifício anterior, posicionado no osso frontal, foi usado para aplicação do estímulo necessário para deflagrar a DAC. Nos outros dois orifícios, no osso parietal, foram colocados os eletrodos usados para o registro da sua propagação. A temperatura retal foi monitorada e mantida em $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. A DAC foi provocada por estimulação química no orifício frontal, com intervalo de 20 minutos entre cada estimulação; para isto foi aplicada uma pequena

pelota de algodão (1-2 mm de diâmetro) embebida numa solução de KCl a 2% durante 1 minuto.



Fonte: Adaptado de DOGA; HAYRUNNISA, 2023

Figura 01: Representação da Depressão alastrante cortical (DAC). Registros eletrofisiológicos mostrando alterações no EEG e potencial lento registrado durante a depressão alastrante cortical.

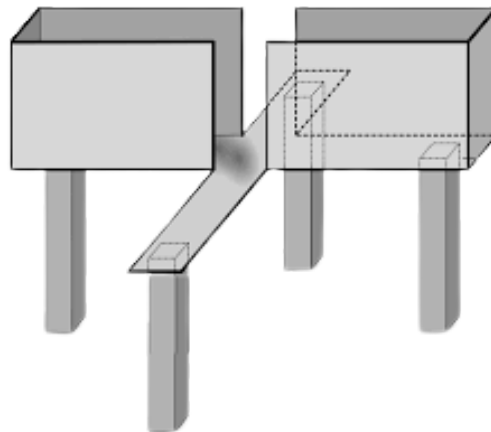
4.6 PESO DO CÉREBRO E ÍNDICE ORGANOSSOMÁTICO:

O peso do cérebro foi obtido por meio de balança analítica de precisão no dia da eutanásia. O Índice Organossomático ($\text{IOS} = \{\text{peso líquido Cérebro/peso corporal}\} \times 100$) foi calculado a partir do peso obtido no dia da eutanásia.

4. 7 ANÁLISE COMPORTAMENTAL:

O animal foi colocado na arena do teste de Campo Aberto, que tem por finalidade avaliar a capacidade exploratória e serve para verificar a ansiedade. Esta tarefa foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) da UFPE . Os animais foram colocados em uma arena de madeira com o assoalho dividido com linhas escuras que delimitam a parte central e a periférica. Foi

realizada somente uma sessão, onde o animal foi exposto ao ambiente novo por um tempo total de 5 minutos e foram medidas as respostas de orientação, os cruzamentos, o número de bolos fecais e o tempo de imobilidade. Nenhuma iluminação foi utilizada durante os testes. Na troca dos animais, o campo foi limpo com álcool 70%. Esta tarefa foi realizada no último dia do experimento.



Fonte: Modificado de <https://images.app.goo.gl/8hCH9EUYA1ufVj549>

Figura 02: Representação do teste de comportamento labirinto em cruz elevada.



Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Circular_Open_Field.jpg

Figura 03: Representação do teste de comportamento em Campo aberto.

4. 8 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA:

Para análise histológica, os animais foram eutanasiados com 45 dias de vida, usando como anestésico uma solução de 1g/Kg de uretana acrescido de 40 mg/Kg cloralose (por via intraperitoneal). O cérebro coletado foi fixado em PFA a 4% de concentração. Em seguida foi desidratado em soluções de álcool etílico com concentrações crescentes de 70, 80, 90 e 100%, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 59 °C e incluídos em parafina histológica purificada (PF 56-58°C). Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo, ajustado para 5 micrômetros (μm). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina, e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C durante 24 horas, para secagem e colagem, e em seguida corados pela Hematoxilina e Eosina para análise de rotina histopatológica, além de coloração por Sudan Black. A quantificação em pixels dos corpos neuronais foi realizada utilizando o programa GIMP.2. As lâminas foram analisadas em Microscópio de Luz e os cortes, fotografados em Microscópio Biológico Trinocular Nikon 50E com videomicroscopia VT 480 com objetiva de 4x, e objetiva de 10x.

Na análise morfométrica foram analisados as seguintes variáveis: quantidade de núcleos, largura, altura, circunferência, diâmetro feret (maior distância entre quaisquer dois pontos ao longo do limite de seleção, também conhecido como calibre máximo), AR (proporção do eixo maior para o menor de um ajuste elíptico), circularidade (Um valor de 1,0 indica um círculo perfeito; à medida que o valor se aproxima de 0,0, indica uma forma cada vez mais alongada), solidez (relação entre a área e a área convexa).

4. 9 TESTE DE APOPTOSE (PROTOCOLO DE TUNEL):

Foi realizado por meio de lâminas silanizadas com o material cortado no micrótomo. Em seguida, essas lâminas passaram pelo processo de desparafinização (Xilol I: 5 minutos, Xilol II: 5 minutos, Xilol III: 5 minutos, Álcool

absoluto I: 5 minutos, Álcool absoluto II: 5 minutos, Álcool 95%: 3 minutos, Álcool 70%: 3 minutos). Após isso, foi iniciado o processo de Marcação das células apoptóticas por meio da Proteinase K obtida pela Sigma Aldrich. As lâminas foram então contra coradas com hematoxilina e analisadas em microscópio.

4.10 ANÁLISE FRACTAL

As imagens microscópicas do cérebro foram usadas para calcular a dimensão fractal pelo método de box counting (Dbox) e dimensão por entropia de informação (Dinf) de acordo com Tenório et al. (2017). Estas imagens foram analisadas usando o software Benoit 1.3 (Fractal Analysis System, Trusoft, St. Petersburg, USA). Em síntese, a dimensão fractal obtida pelo método de box counting foi calculada através da cobertura da imagem com $N(r)$ caixas, onde N é o número de caixas e r é o comprimento de um lado da caixa contendo ao menos um ponto da estrutura analisada. Este processo foi repetido com caixas de diferentes tamanhos e plotados em um gráfico duplo log de $N(r)$ como uma função de r . A inclinação desta relação entre os sinais invertidos é a dimensão fractal por box counting e ε é a menor variação no tamanho das caixas. Isto pode ser formalmente descrito pela fórmula 1:

$$D_{bc} = - \left[\frac{\log \log N(r+\varepsilon) - \log \log N(r)}{\log \log (r+\varepsilon) - \log \log r} \right] \quad (1)$$

Na dimensão fractal por entropia de informação (Dinf) a imagem também é coberta por caixas, mas este método está relacionado a frequência na qual cada caixa está ocupada pela estrutura analisada; formalmente descrito pelas fórmulas 2 e 3:

$$D_{inf} = \left[\frac{-S(r)}{\log \log (r+\varepsilon) - \log \log r} \right] \quad (2)$$

$$S(r) = - \sum_{i=1}^{N(r)} m_i \log(m_i) \quad (3)$$

Onde, $S(r)$ é a entropia de Kolmogorov, $m_i = M_i/M$ (M_i é o número de pontos na caixa i , e M é o número de pontos na estrutura analisada).

A análise da lacunaridade foi realizada usando os procedimentos anteriormente descritos em Tenório et al. (2017). A distribuição das lacunas na estrutura analisada foi descrita pelo valor da lacunaridade obtida usando o software Image J (National Institutes of Health –NIH, USA) com o plug-in FracLac (A. Karperien - Charles Sturt University, Austrália). A imagem foi coberta por uma série de grades, cada grade contendo um número de caixas de diferentes tamanhos (ϵ) e orientações (g). A lacunaridade média (Λ) foi obtida pela fórmula 4:

$$\Lambda = \frac{\left[\sum_g \sum_i (1 + (\mu)^2) \right]}{n} \quad (4)$$

Onde σ é o desvio padrão; μ é valor médio de pixels por caixa de lado ϵ ; n é o número do tamanho das caixas em uma orientação g .

4. 11 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados serão analisados estatisticamente segundo ANOVA, acompanhada de teste “post hoc” (Holm-Sidak), quando indicado, e foram avaliadas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$. A análise estatística de teste de hipótese será realizada para a análise morfométrica com o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com post-hoc de Dunn, considerando p menor que 0,05 como estatisticamente significativa.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DO TESTE DE COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO

Na análise de comportamento em campo aberto, observou-se que os ratos Controle percorrem uma maior distância, quando comparado com o grupo DP e a distância percorrida volta a aumentar para um valor semelhante ao do grupo controle no registro do grupo DP + Mel; tendo o seu $p = 0,0306$ significativamente estatístico. O tempo imóvel segue em um padrão de menor interação com o ambiente no grupo DP, seguido pelo DP + Veículo e Controle; o rato passa a ter maior mobilidade e interação exploradora com o ambiente, que é o seu comportamento esperado, no grupo DP + Mel. Neste caso, a melatonina sugere um efeito reparador dos danos do desmame precoce e estimulador para que ele siga com um desempenho melhor do que o próprio grupo controle, sendo também estatisticamente significativa com $p = 0,0135$ (tabela 1).

O número de entradas do animal no centro do campo aberto tem significado inverso ao número de entradas na área periférica do campo, sabendo-se que a atividade exploratória dele é demonstrada com o maior tempo de permanência e entradas na área periférica. O grupo DP + Mel registrou a maior quantidade de tempo na área central do campo, seguido pelo grupo controle e DP + Veículo, que tiveram uma quantidade semelhante de permanência na área, o grupo DP foi o que mais explorou o ambiente periférico e permaneceu menos tempo na região central do campo (tabela 1).

Quadro 1: Análise do teste de comportamento Campo Aberto

Variáveis do teste de comportamento	Controle	DP	DP + Veículo	DP + Mel	p
Duração total do teste (s)	298,20 ± 4,02	300,00 ± 0,0	284,38 ± 34,42	297,54 ± 3,83	0.2587
Distância (m)	25,32 ± 5,74 ^a	17,88 ± 15,98 ^b	16,82 ± 14,93 ^b	25 ± 2,41 ^a	0,0306 *
Tempo imóvel (s)	16,44 ± 22,78 ^a	43,96 ± 50,41 ^b	48,86 ± 28,99 ^b	19,22 ± 2,63 ^a	0,0135 *
No. de Entradas no centro	11 ± 4,76	7 ± 7,01	12 ± 6,97	11 ± 4,49	0,6564
Tempo no centro (s)	20,26 ± 8,50	285,16 ± 17,09	235,94 ± 17,85	58,28 ± 29,66	0,065
No. de entradas periferia	11 ± 5,03	8 ± 6,65	13 ± 7,25	15 ± 1,58	0,3517
Tempo na periferia (s)	278,08 ± 9,67	285,16 ± 17,09	260,44 ± 27,72	243,26 ± 28,55	0,0422

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste ANOVA, acompanhada de teste “post hoc” (Holm-Sidak), quando indicado, e serão avaliadas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

5.2. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

Na análise de comportamento no labirinto em cruz elevada foi observado que o grupo DP + Veículo percorreu a maior distância entre os grupos observados. Os animais Controle foram os que percorreram menor distância, tiveram maior tempo total de imobilidade entre os grupos e nos braços fechados, assim como na região central do labirinto. O maior número de entradas nos braços fechados e na região central foi registrado pelos animais que sofreram desmame precoce (tabela 2).

Quadro 2: Análise do teste de comportamento Labirinto em Cruz Elevada

Variáveis do teste de comportamento		Controle	DP	DP + Veículo	DP + Mel	p
Duração (S)		297,00 ± 6,70	299,98 ± 0,04	300,00 ± 0,0	300,00 ± 0,0	0.5487
Distância (cm)		4,62 ± 2,28	5,86 ± 1,35	6,55 ± 0,53	5,72 ± 1,66	0.4896
Tempo imóvel (s)	Total	71,56 ± 60,71	39,48 ± 33,06	40,28 ± 18,59	43,72 ± 18,34	0.8806
	Braço aberto	0	0	0,8 ± 1,78	5,22 ± 4,85	0.0510
	Braço fechado	44,40 ± 29,47	33,68 ± 34,46	34,38 ± 15,33	27,38 ± 16,32	0.8095
	Centro	27,16 ± 55,25	5,74 ± 7,89	5,10 ± 8,79	11,10 ± 20,02	0.9453
Número de entradas	Braço aberto	4 ± 3,91	4 ± 1,51	7 ± 3,19	7 ± 2,60	0.1805
	Braço fechado	8 ± 5,41	18 ± 10,13	10 ± 2,40	13 ± 2,55	0.1759
	Centro	11 ± 8,52	20 ± 7,90	17 ± 2,86	20 ± 3,97	0.1871
Tempo (s)	Braço aberto	11,3 ± 10,57 A	9,76 ± 7,39	50,76 ± 31,72 B	18,1 ± 11,55	0.0060 S
	Braço fechado	238,72 ± 47,62	218,92 ± 40,16	196,44 ± 57,59	113,4 ± 44,09	0.1958
	Centro	47,02 ± 50,04	62,36 ± 24,32	52,40 ± 27,01	168,50 ± 46,60	0.1939

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste ANOVA, acompanhada de teste “post hoc” (Holm-Sidak), quando indicado, e serão avaliadas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

5.3. ANÁLISE DA DEPRESSÃO ALAISTRANTE

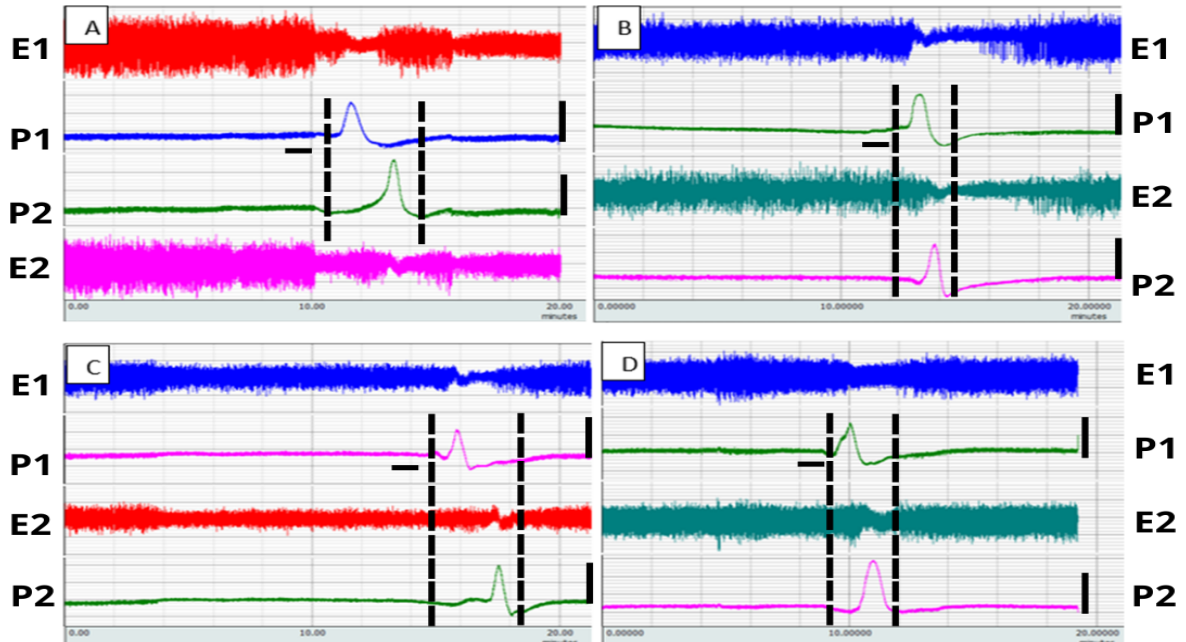


Figura 4: Propagação da depressão alaistrante cortical (DAC). A imagem documenta o eletrocorticograma da redução e aparecimento de mudança lenta de potencial, em dois pontos da superfície do hemisfério direito dos ratos alocados nos seguintes grupos: Grupo Controle (A), Desmame precoce (B), Desmame precoce + Melatonina (C) e Desmame + Veículo (D). As barras de calibração na vertical à direita, após os traços, são iguais a 0,5 mv para os traços E e 10 mV para os traços P (negativo para cima). As barras horizontais, sob cada 1 traço, indica o tempo (1 min) de aplicação de KCl para provocar a DAC. As linhas verticais tracejadas indicam a delimitação referente à velocidade do fenômeno da DAC.

Com base na análise dos resultados estatísticos dos animais experimentais, houveram diferenças significativas na velocidade média da DAC entre os grupos estudados: Controle, DP, DP+Veículo e DP+Mel; sendo $p = 0,0018$ (Tabela 3 e Figura 4).

A duração da propagação da DAC é diretamente proporcional à neuroproteção, já a amplitude é inversamente proporcional à mesma. Analisando a duração da propagação da DAC, o grupo controle e o DP + Mel tiveram resultados

semelhantes, demonstrando maior neuroproteção quando comparados aos grupos DP e DP + Veículo, que também possuem valores semelhantes (tabela 3 e Figura 4).

A amplitude das ondas de propagação da DAC foi registrada menor no grupo Controle e DP+Mel, tendo resultados semelhantes e revelando maior neuroproteção que nos grupos DP e DP+Veículo. Todos os valores relacionados à DAC que foram analisados são estatisticamente significativos (Tabela 3).

Quadro 3: Registro eletrofisiológico da Depressão Alastrante Cortical (DAC)

Variáveis da DAC	Controle	DP	DP + Veículo	DP + Mel	p
Velocidade de propagação da DAC (mm/min)	3,50 ± 0,15 a	6,28 ± 0,15 b	6,45 ± 0,14 b	3,52 ± 0,22 a	0.0018*
Duração da propagação da DAC (s) - Onda rápida	60,98 ± 7,72 a	43,56 ± 1,40 b	44,06 ± 3,62 b	58,59 ± 3,75 a	0.0025*
Duração da propagação da DAC (s) - Onda lenta	60,80 ± 8,38 a	43,15 ± 2,55 b	43,53 ± 3,32 b	59,80 ± 4,17 a	0.0025*
Amplitude da propagação da DAC - Onda rápida	8,15 ± 0,45 a	11,55 ± 0,25b	11,95 ± 0,65 b	8,34 ± 0,64 a	0.0021*
Amplitude da propagação da DAC - Onda lenta	8,04 ± 0,23 a	11,96 ± 0,66 b	12 ± 0,54 b	8,42 ± 0,40a	0.0017*

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste ANOVA, acompanhada de teste "post hoc" (Holm-Sidak), quando indicado, e serão avaliadas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

5.4. ANÁLISE DO PESO DOS ANIMAIS E ÍNDICE ORGANOSSOMÁTICO

Com relação à massa corpórea dos animais, houve aumento significativo no peso dos animais do grupo desmame precoce quando comparado com o controle, bem como, com o grupo desmame precoce tratado com melatonina (Tabela 4). O índice organossomático não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (tabela 4).

Quadro 4: Peso dos cérebros, animais e Índice organossomático (IOS)

Variáveis do IOS	Controle	DP	DP + Mel	DP + Veículo
Peso dos cérebros	1,37 ± 0,14	1,44 ± 0,01*	1,41 ± 0,17	1,52 ± 0,03*
Peso do animal	165,25 ± 25,01 ^a	193,7 5± 26,70 ^b	153,5 ± 16,31 ^a	189,75 ± 26,25 ^b
Índice Organossomático	0,81 ± 0,17 ^a	0,95 ± 0,11 ^a	0,75 ± 0,18 ^b	0,74 ± 0,14 ^b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste ANOVA, acompanhada de teste “post hoc” (Holm-Sidak), quando indicado, e serão avaliadas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

5.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA PARA SUDAN BLACK

Entre os corantes lipossolúveis, o Sudan Black foi escolhido, uma vez que mostra o acúmulo anormal de gorduras e óleos nos tecidos. Já na lâmina pronta, o corante fica em solução com os lípideos do tecido. A presença destes lípideos sugere alterações degenerativas. Com base na análise dos resultados estatísticos dos animais experimentais houveram diferenças extremamente significativas entre o grupo DP, DP + Veículo e DP + Mel, com $p < 0,0001$ (tabela 5 e Figura 2).

Quadro 5: Análise morfométrica da contagem de intensidade de coloração com o Sudan Black

Variáveis da contagem de intensidade	Controle	DP	DP + Veículo	DP + Mel
Contagem	214.704,96 ± 167936 a	373.778,8 ± 269533 b	314.704,96 ± 167936 b	119.646,8 ± 108756 a
p	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*	< 0.0001*

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste ANOVA, acompanhada de teste “post hoc” (Holm-Sidak), quando indicado, e serão avaliadas significantes as diferenças em que $p \leq 0,05$.

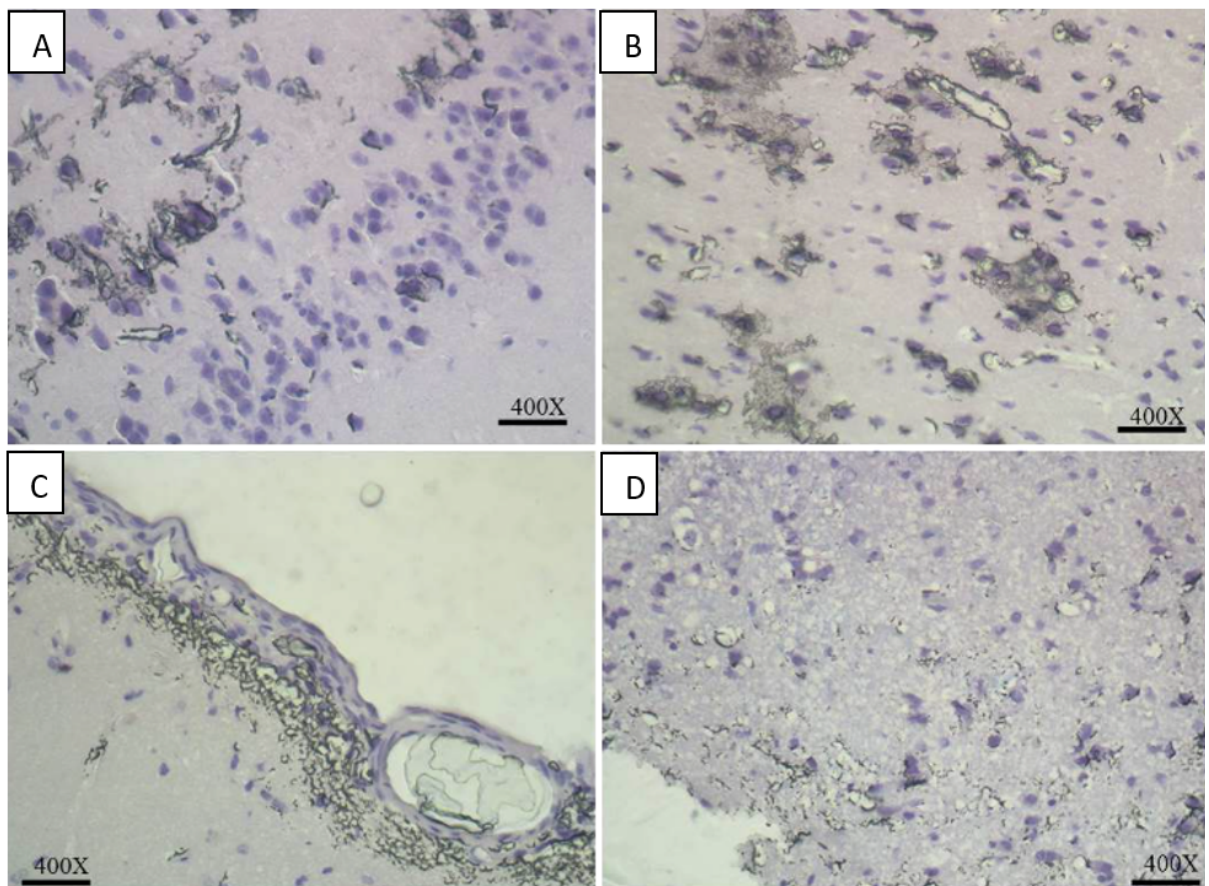


Figura 5: Fotomicrografia da região cortical do cérebro dos animais corados com Sudan black. A imagem documenta a coloração de lâminas com Sudan Black, a fim de mostrar a marcação lipídica dos cortes histológicos dos grupos (A) Grupo Controle, (B) Desmame precoce+Veículo, (C) Desmame precoce e (D) Desmame precoce+Melatonina. Quanto maior a marcação, maior a deposição lipídica.

5.6. TESTE DE APOPTOSE

Nos resultados para análise de apoptose foi observado uma forte marcação nos cérebros do grupo DP e DP + Veículo quando comparados com os demais grupos. O grupo DP + Mel mostrou-se semelhante ao grupo controle (Figura 6).

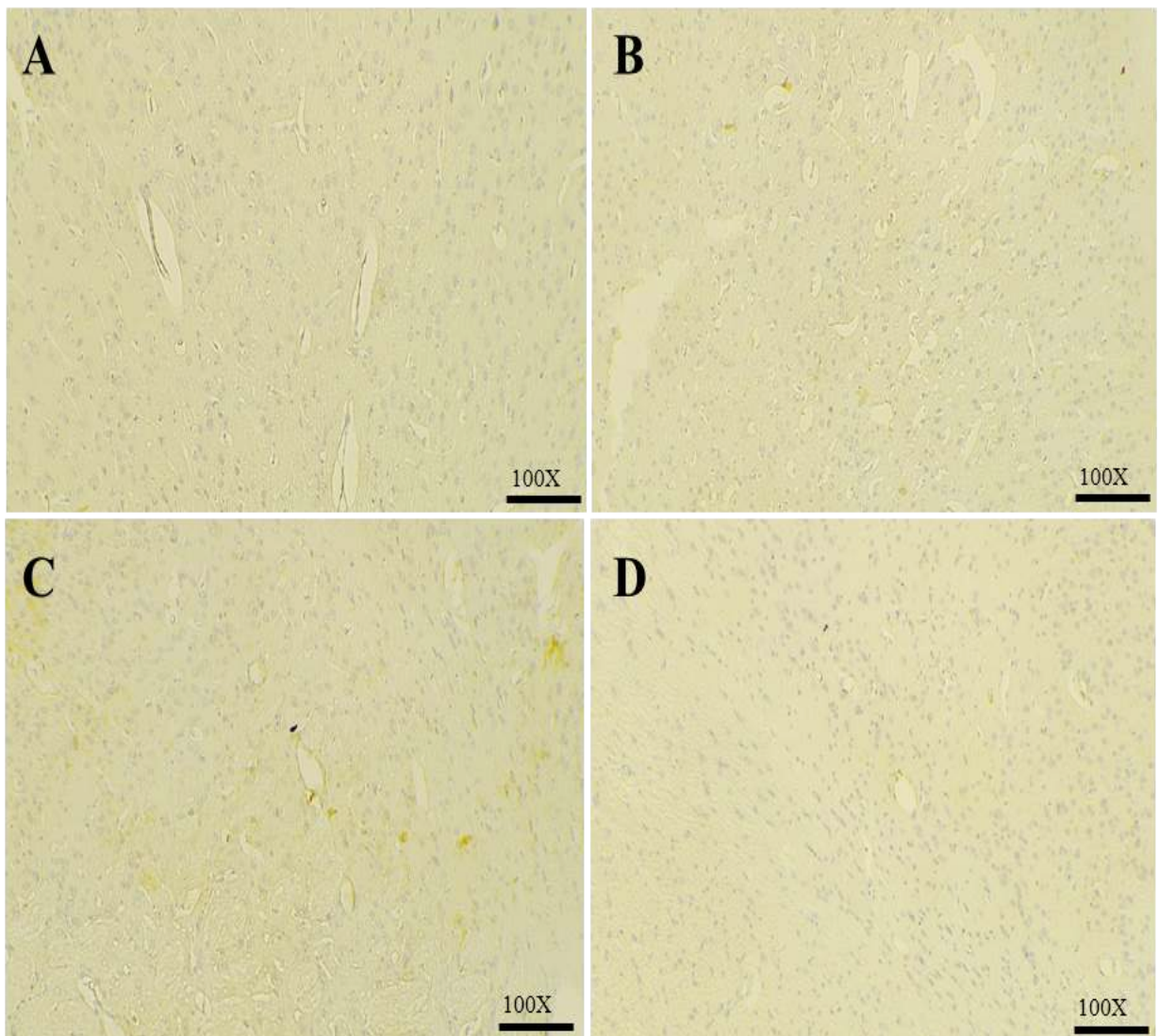


Figura 6: Fotomicrografia do teste de apoptose celular cerebral (região cortical) dos animais dos grupos experimentais. (A) Grupo Controle, (B) Grupo DP, (C) Grupo DP + Veículo, (D) Grupo DP + Mel. Observar a intensidade do amarelo fortemente positiva nos grupos DP e DP + veículo. O grupo DP + Mel é semelhante ao controle.

5.7. ANÁLISE MORFOMÉTRICA E FRACTAL

Quadro 6: Análise fractal das fotomicrografias no ImageJ

Variáveis do fractal	Controle	DP	DP + Veículo	DP + Mel	H	p
Dimensão fractal	1,51 ± 0,03	1,48 ± 0,35	1,38 ± 0,33	1,50 ± 0,34	6,07	0,10
Lacunaridade	0,27 ± 0,03	0,06 ± 0,07	0,04 ± 0,10	0,09 ± 0,06	0,46	0,13

*Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística.

Os parâmetros de dimensão fractal e de lacunaridade foram capazes de detectar alterações nos grupos DP e DP + Veículo, quando comparados ao grupo controle (Tabela 6). A dimensão fractal no grupo controle e DP + MEL se mostrou superior quando comparada com os grupos DP e DP + Veículo.

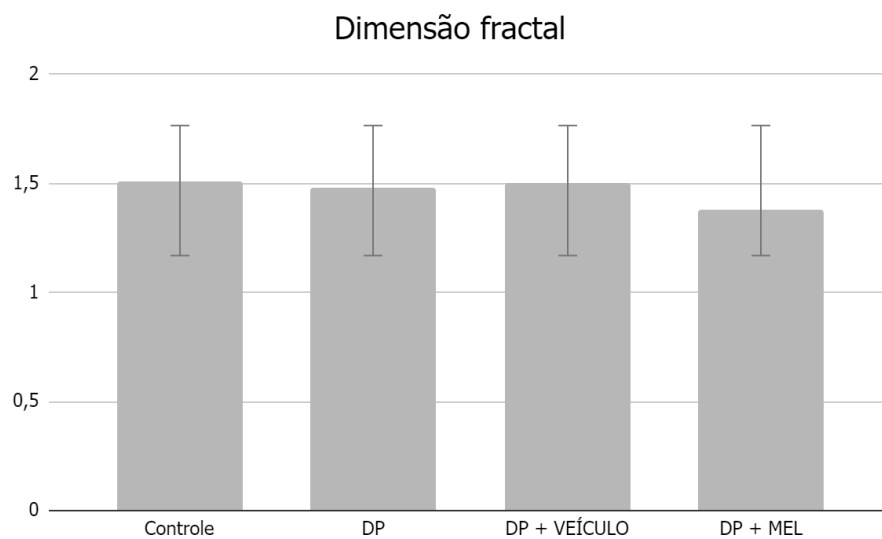


Figura 7: Gráfico da dimensão fractal (índice estatístico racional de detalhes de complexidade em um padrão). Grupo Controle, Grupo DP, Grupo DP + Veículo, Grupo DP + Mel.

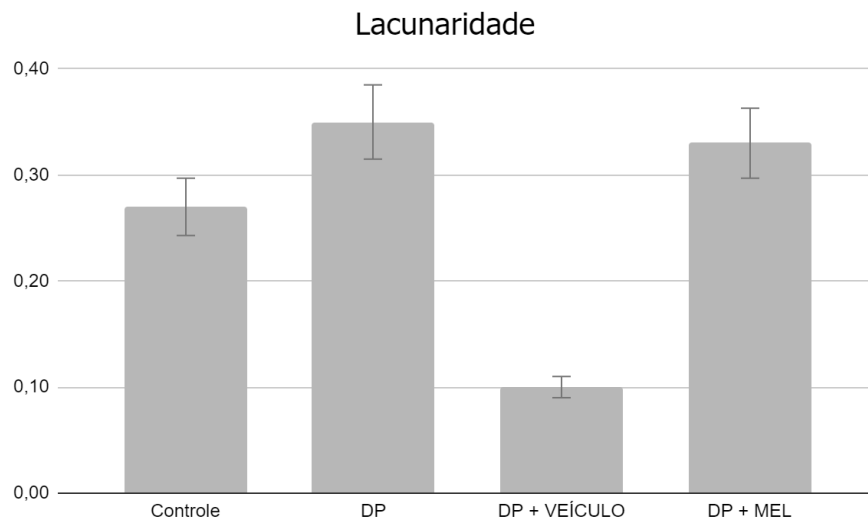


Figura 8: Gráfico da lacunaridade (descreve a textura de um fractal). Grupo Controle, Grupo DP, Grupo DP + Veículo, Grupo DP + Mel.

Lacunaridade é um complemento da dimensão de fractal que descreve a textura de um fractal. Tem a ver com a distribuição e tamanho dos vazios. Se um fractal tem grandes vazios ou buracos, ele tem lacunaridade alta; por outro lado, se um fractal é quase invariante, à translação, tem baixa lacunaridade. Podem ser construídos fractais diferentes que tenham a mesma dimensão, mas que pareçam extremamente diferentes porque eles têm lacunaridades diferentes (MANDELBROT et al., 1996). Já a Dimensão Fractal representa o nível de ocupação do espaço pelo objeto. Dessa forma, ela pode apresentar valores não-inteiros.

Quadro 7: Análise morfométrica das fotomicrografias no ImageJ

Variáveis da morfometria	Controle	DP	DP + Mel	DP + Veículo	H	p
Quantidade de núcleos	147,50 ± 36,45	156,08 ± 42,10	142,44 ± 30,87	163,50 ± 39,45	10,94	0,012*
Área	2115,34 ± 484,66	2043,22 ± 418,08	2105,10 ± 378,44	2030,34 ± 9884,66	7.3417	0.0618
Perímetro	180150,00 ± 16011,26	17039,97 ± 16761,49	180115,28 ± 15896,06	178085,00 ± 32011,26	5.0413	0.1688
Largura	56,02 ± 7,70	52,12 ± 7,17 [^]	55,78 ± 6,23 [^]	52,80 ± 10,70	10,625	0,0139*
Altura	51,30 ± 7,40 [^]	56,59 ± 6,89 ^{^,B,C}	51,55 ± 6,75 ^B	51,05 ± 7,50 ^C	31,702	0,0001*
Circunferência	755,45 ± 41,58	708,20 ± 77,16 [^]	758,15 ± 30,25 [^]	756,00 ± 81,54	13,321	0,0040*
Diâmetro Feret	66432,00 ± 5359,74	68037,06 ± 5912,45	65607,46 ± 5443,24	64448,00 ± 11453,00	9,111	0,0278*
AR	1697,50 ± 141,22	1929,47 ± 318,95 [^]	1707,64 ± 148,83 [^]	1687,50 ± 321,22	17,321	0,0006*
Circularidade	641,85 ± 44,11	588,47 ± 74,02 [^]	637,18 ± 43,11 [^]	651,85 ± 74,11	15,409	0,0015*
Solidez	932,40 ± 16,60 [^]	903,70 ± 43,15 ^B	929,48 ± 14,92 ^{^,B,C}	922,40 ± 46,60 ^C	25,501	0,0001*

*Indica diferença estatisticamente significativa (p <0,05). Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística.

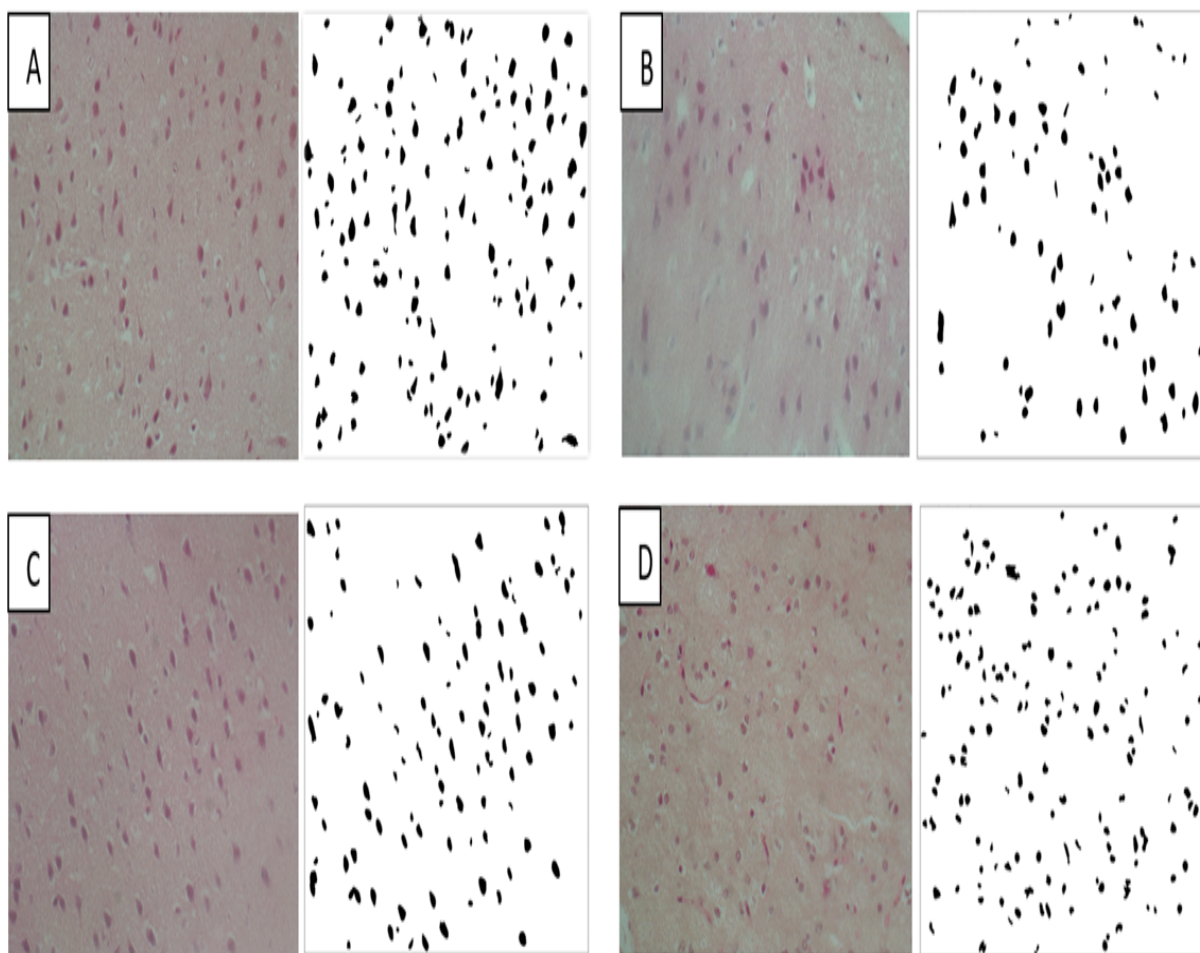


Figura 9: Fotomicrografias da região cortical do cérebro dos animais dos grupos experimentais, após o uso do programa ImageJ, para análise morfométrica. A imagem documenta a quantidade de núcleos, sendo cada ponto preto a representação de um núcleo de célula. Nas primeiras imagens de cada dupla estão as fotomicrografias originais que foram feitas das lâminas e as segundas imagens são uma versão segmentada do Grupo Controle (A), grupo Desmame precoce (B), grupo Desmame precoce + melatonina (C) e grupo Desmame precoce associado ao uso do veículo (D). AU 400x.

Neste estudo, foi observado que as dimensões morfométricas dos grupos controle e DP + MEL foram maiores que dos grupos DP e DP + VEÍCULO. A quantidade de núcleos, largura, altura, circunferência, diâmetro feret, AR, circularidade, solidez tiveram resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo registram importantes achados sobre a análise eletrofisiológica, morfológica e morfométrica do cérebro de ratos jovens submetidos ao desmame precoce e tratados com melatonina. A melatonina exerceu um efeito redutor e, em alguns casos, reparador dos danos causados pelo desmame precoce no cérebro dos ratos.

Como visto em estudos anteriores sobre processos metabólicos induzidos pelo estresse, como a desnutrição, os resultados estão associados a processos de desequilíbrio redox e neurodegeneração de células do sistema nervoso (DE BRITO et al., 2014; FRAGOSO et al., 2020). Desta forma, a desnutrição é tida como responsável por causar impactos que reafirmam comportamentos de ansiedade (GARCIA-MESA et al., 2016; RADAK et al., 2016), como foi registrado nos dados da atual pesquisa, tanto no teste de campo aberto, quanto no teste de labirinto em cruz inclinada.

No teste de campo aberto e no labirinto em cruz elevada, os resultados dos animais do grupo controle e do grupo que passou pelo desmame precoce associado ao uso da melatonina foram muito semelhantes, quando comparados. A maior distância percorrida; o menor tempo de imobilidade, consequentemente, maior exploração e interação com o ambiente; o maior tempo de permanência e entradas na área periférica do campo confirmam a tendência de redução e/ou reparo aos danos do desmame precoce quando comparados os resultados dos grupos estudados. O comportamento e registros opostos foram observados no grupo que sofreu apenas o desmame precoce e no grupo que sofreu desmame precoce e foi tratado com solução veículo, tendo uma maior permanência e número de entradas na área central (DP + Veículo) do teste de campo aberto, refletindo em um comportamento com aumento de ansiedade.

No registro da DAC houveram diferenças significativas estatisticamente ($<0,05$) entre o grupo DP e Controle, também entre o grupo DP + Veículo e DP +

Mel. Esses registros sugerem que o desmame precoce dos filhotes pode estar associado a modificações eletrofisiológicas do sistema nervoso, as quais podem perdurar até a fase adulta (ROCHA-DE-MELO, 2001) e (SANTOS-MONTEIRO, 2002). A velocidade, duração e amplitude de propagação das ondas se mostraram mais eficientes no grupo Controle e DP + Mel. Estes resultados mostram que o desmame precoce refletiu em um efeito contrário na propagação da DAC no cérebro.

Na análise morfométrica da contagem de intensidade de coloração com o Sudan Black, o resultado foi estatisticamente significativo sendo mais elevado nos grupos DP e DP + Veículo, refletindo em um maior conteúdo lipídico dos grupos citados. Após o tecido adiposo, o cérebro é o órgão que contém a maior concentração de lipídios, com uma grande proporção de ácidos graxos poliinsaturados (FERNANDEZ et al., 1997). Esses compostos exercem papel importante no desenvolvimento desta estrutura. Mudanças na composição lipídica cerebral resultante de manipulações dietéticas têm sido associadas com alterações comportamentais, de aprendizado (WAINWRIGHT, 1992, citado por MEDEIROS, 1996) e no processo de desenvolvimento neuronal, levando à alteração da sua multiplicação, migração, da arborização dendrítica e sináptica, bem como da mielinização (MORGANE et al., 1992; PICANÇO-DINIZ et al. 1998; BORBA et al., 2000; PONTES-FILHO, 2003). As fotomicrografias das lâminas para detectar apoptose seguem os mesmos resultados.

Ao analisar a forma dos núcleos por dimensão morfométrica, observou-se que a quantidade de núcleos do grupo Controle e DP + Mel foi menor que a dos outros grupos, quando comparados, é significativamente estatística ($p < 0,05$). O atual trabalho evidenciou que houve diferença significativa entre os grupos na maioria das variáveis analisadas. A análise fractal mostrou alta sensibilidade e especificidade quanto às medidas de dimensão fractal e lacunaridade nos grupos controle e DP + MEL, indicando, assim, que a dimensão fractal pode ser uma ferramenta essencial como método alternativo ou complementar para o diagnóstico.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso da melatonina, em animais que sofreram o desmame precoce, desempenha um papel redutor e/ou protetor contra os efeitos da desnutrição. Os padrões dos testes feitos nos filhotes submetidos à desnutrição e suplementados com a MEL foram beneficiados em seus resultados. Deste modo, pelos resultados encontrados, podemos afirmar que a melatonina atua como uma ferramenta terapêutica para o tratamento dos efeitos do desmame precoce. Também compreendemos melhor sobre a sua influência no desenvolvimento do sistema nervoso, assim como este estudo fica à disposição para contribuir cientificamente na compreensão dos mecanismos relacionados à influência da melatonina sobre a atividade elétrica e histomorfométrica do cérebro.

REFERÊNCIAS

- ABADIE-GUEDES R. et al. Dose dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism, Clinic and Experimental Research**, v. 32, p. 1417-21, 2008.
- ABREU, M. D. C.; et al. Brain development in male rats subjected to early weaning and treated with diet containing flour or flaxseed oil after 21 days until 60 days. **Journal of developmental origins of health and disease**, 6, 4, 268-271, 2015
- ACUNA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci**, v.71, p.2997–3025, 2014.
- ALBERDA C, Graf A, McCargar L. Malnutrition: etiology, consequences, and assessment of a patient at risk. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 2006; 20: 419-39.
- ALVES, João Guilherme B. Baixo peso ao nascer e desmame precoce: novos fatores de risco para aterosclerose. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 4, p. 339-340, 2004.
- ALZOUBI, K.H. et al. Chronic Melatonin Treatment Prevents Memory Impairment Induced by Chronic Sleep Deprivation. **Mol Neurobiol**, v.53, p.3439-3447, 2016.
- ASADI-POOYA, Ali A. et al. Prevalence and incidence of drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy in the United States. **World neurosurgery**, v. 99, p. 662-666, 2017.
- ASGHARI, M. H. et al. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. **Expert Opin Drug MetabToxicol.**, v.13, n. 5, p. 545-54, 2016.
- ASSIS, T. A. de ., Vivas Miranda, J. G., Mota, F. de B., Andrade, R. F. S., & Castilho, C. M. C. de .. (2008). Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais. **Revista Brasileira De Ensino De Física**, 30(2), 2304.1–2304.10.
- BAGANHA, Sarah Celestino; PEREIRA, Érika Aparecida Azevedo. **Avaliação nutricional e o consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico.** -, 2018.
- BARRERA DUSSÁN, Nathaly; RAMOS-CASTAÑEDA, Jorge Andrés. Prevalence of malnutrition in children under 5 years of age. Comparison between OMS parameters and their adaptation to Colombia. **Universidad y Salud**, v. 22, n. 1, p. 91-95, 2020.

BATISTA-DE-OLIVEIRA, M. et al. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. **Exp Gerontol**, v.47, p.452–457, 2012.

BAYDAS G, Koz ST, Tuzcu M, Etem E, Nedzvetsky VS. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. **J Pineal Res** 2007; 43(3): 225-31.

BAYDAS G, Koz ST, Tuzcu M, Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. **J Pineal Res** 2008; 44:181–188.

BIRBEN E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal**. v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BORBA, J.M.C.; ARAÚJO, M.A.S.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; MANHÃES-DE-CASTRO R.;GUEDES R.C.A. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, 53:193-201, 2000.

BOTO, Edilayne Gomes et al. Manual de terapia nutricional enteral de alta hospitalar: elaboração e validação de um instrumento. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 33-38, 2019.

BOUTIN, Jean A. Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 20, n. 3, p. 303-317, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde da criança: crescimento e desenvolvimento / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica - Brasília : Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

Bronzino JD, Austin-La France JR, Morgane PJ. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. **Brain Research** 1990; 515: 45-50

BURKHALTER, Hanna et al. Melatonin rhythms in renal transplant recipients with sleep–wake disturbances. **Chronobiology international**, v. 33, n. 7, p. 810-820, 2016.

CARLONI, S. et al. Melatonin modulates neonatal brain inflammation through endoplasmic reticulum stress, autophagy, and miR-34a/silent information regulator 1 pathway. **J Pineal Res**, v.61, p.370–380, 2016.

CASTRO, R. M. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural processes**, 86, 1, 119-124, 2011 “A”.

CASTRO, R. M. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral and secretion. **Diabetes Obes Metab.** v. 14 Suppl 3, p. 29-39, Oct 2012.

CAPUTO NETO, M. Caderno de Atenção à Saúde da Criança: Aleitamento Materno. Secretaria de Estado da Saúde. Banco de Leite Humano de Londrina. IBFAN Brasil. Sociedade Paranaense de Pediatria. Paraná, 2013.

Chen YC, Sheen JM, Tiao MM, Tain YL, Huang LT. Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. **Int J Mol Sci** 2013; 5380-5401.

CHEN, Yiheng; MICHALAK, Marek; AGELLON, Luis B. Focus: Nutrition and Food Science: Importance of Nutrients and Nutrient Metabolism on Human Health. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 91, n. 2, p. 95, 2018.

CHUNG, S.Y. e HAN, S.H. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. **J Pineal Res**, v.34, p.95-102, 2003.

CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

COMAI, S. et al. Melancholic-Like Behaviors and Circadian Neurobiological Abnormalities in Melatonin MT1 Receptor Knockout Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.18, n. 3, p. 1–10, 2015.

CREPIN, S., et al. Malnutrition and epilepsy: A two-way relationship. **Clin. Nutr.** v.28, p.219–225, 2009.

DE BRITO ALVES, José Luiz et al. Short-and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **British journal of nutrition**, v. 111, n. 4, p. 606-615, 2014.

DING, K. et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2- ARE signaling pathway as a potential mechanism. **Free Radic Biol Med**, v.73, p.1–11, 2014.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON, A.N.; DOBBING, J. *Applied Neurochemistry*. **Oxford: Blackwell**, p. 287-316, 1968.

DOS SANTOS, CAROLINA ARAÚJO et al. **Perfil nutricional e fatores associados à desnutrição e ao óbito em pacientes com indicação de terapia nutricional**. 2017.

EL-BACHÁ R.S.; LIMA-FILHO J.L.; GUEDES R.C.A. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photoactivated riboflavin. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 205-212, 1998.

FÁVARO-MOREIRA, NÁDIA CRISTINA et al. Risk factors for malnutrition in older adults: a systematic review of the literature based on longitudinal data. **Advances in nutrition**, v. 7, n. 3, p. 507-522, 2016.

FERNANDEZ, V.; PASCUAL, R.; RUIZ, S. Early life environmental deterioration, nutrition and ontogenesis of motor cortex in the rat: a golgi study. **Biology of the Neonate**, 64: 245-253, 1997.

FRAGOSO J, CARVALHO JUREMA SANTOS G, THOMAZ DA SILVA H, OLIVEIRA NOGUEIRA V, LOIZON E, VIDAL H, COSTA-SILVA JH, DA SILVA ARAGÃO R, PIROLA L, LEANDRO CG. Maternal physical activity-induced adaptive transcriptional response in brain and placenta of mothers and rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 11, n. 2, p. 108-117, 2020.

GARCÍA-MESA, Yoelvis et al. Oxidative stress is a central target for physical exercise neuroprotection against pathological brain aging. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 71, n. 1, p. 40-49, 2016.

GERMANO, P. C. S. et al. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: effects on cortical spreading depression in adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 275-81, 2013.

GITTO, E.; KARBOWNIK, M.; REITER, J.R. et al. Effects of melatonin treatment in septic newborns. **Pediatr. Res.**, v.50, p.756-760, 2001.

GODOY, R. F. de. Benefícios do Exercício Físico sobre a Área Emocional. **Movimento**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, 2002.

GOLDMAN, B.D. Pattern of melatonin secretion mediates transfer of photoperiod information from mother to fetus in mammals. **Sciences's STKE**. V. 192, p. 29-31, 2003.

GOMAA, A.M.S. et al. Neuroprotective effects of melatonin administration against chronic immobilization stress in rats. **Int J Physiol, Pathophysiol and Pharmacol**, v.9, p.16-27, 2017.

GRANTHAM-McGREGOR, S.M. Malnutrition, mental function, and development. **The Malnourished Child Nestlé Nutrition Workshop Series**, v. 19. p. 197-212, 1990.

GUEDES R.C.A. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR (eds.) **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**. Springer, Berlin, 2343-2355, 2011.

GUEDES, R. C. A., Rocha-de-Melo, A. P., & Teodósio, N. R. (2004). Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, 56(1), 32-35.

GUEDES, R. C. A.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; COSTA-CRUZ, R. R.G. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, 5 (2): 115-123, 2002.

GUEDES, R. C. A.; CABRAL-FILHO, J. E.; TEODÓSIO, N. R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. Spreading depression. **Experimental brain research series**, v. 23, p. 17-26, 1992.

GUEDES, R. C. A.; SANTOS-MONTEIRO, J. TEODOSIO, N. R. Malnutrition and brain function: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. **Revista Brasileira de Biologia**, 56:293-301, 1996.

GUEDES, R. C. et al. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 16, n. 4, p.142-6, 2013.

GUEDES, R.C.A. Electrophysiological methods: application in nutritional neuroscience. In: LIEBERMANN, H.; KANAREK, R.; PRASAD, C. Nutritional Neurosciences: overview of an emerging field. New York: **Nutrition, Brain and Behavior Series**, v. 3, c. 4, p. 39-54, 2005

GUEDES, R.C.A. On some conditions that influence cortical spreading depression. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 56:445-455, 1984.

GUEDES, R.C.A.; BARRETO, J.M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**. 25: 393-397, 1992.

GUEDES, R.C.A.; CABRAL FILHO, J.E.; TEODOSIO, N.R. GABAergic mechanisms involved in cortical spreading depression in normal and early malnourished rats. **Experimental Brain Research**. 17-26p, 1992.

GUERRA, M.Q.F. Fatores associados à qualidade da estimulação do ambiente domiciliar de crianças aos 12 meses de idade da zona da mata de Pernambuco. Recife, 2002. **Tese. (Mestrado em Nutrição)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 48 p, 2002.

GUNASEKARAN, S. et al. Experimental and theoretical investigations of spectroscopic properties of N-acetyl-5-methoxytryptamine. **Can. J. Anal. Sci. Spectrosc**, v. 53, n. 4, p. 149-162, 2008.

HÉBERT, Marc et al. The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. **Journal of pineal research**, v. 33, n. 4, p. 198-203, 2002.

HIRIART, B.M. et al. Hormona de la oscuridad. **Rev. Latinoamer. Patol. Clin.**, v.59,n.4, p.222-232, 2012.

HUANG, F.; YANG, Z.; LI, C.-Q. The melatonergic system in anxiety disorders and the role of melatonin in conditional fear. **In: Vitamins and hormones**. Academic Press, 2017. p. 281-294.

HUOT, R. L.; PLOTSKY, P. M.; LENOX, R. H.; MCNAMARA, R. K. Neonatal

JAIN, S.V. et al. Melatonin improves sleep in children with epilepsy: a randomized, double-blind, crossover study. **Sleep Med**, v.16, p.637–644, 2015.

JONES, L.C. and G.T. Lonergan, Biotech. **Lett**. 19, 65 (2004).

JONSSON, L. et al. Association between ASMT and autistic-like traits in children from a Swedish nationwide cohort. **Psychiatr Genet.**, v.24, n.1, p. 21-7, 2014.

JOSHI, N. et al. Promising Role of Melatonin as Neuroprotectant in Neurodegenerative Pathology. **Mol Neurobiol.**, v.52, n.1, p. 330- 340, 2015.

KASECKER, Fernanda Gugelmin; NUNES, Carlos Pereira. Melatonina e glândula pineal. **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis**, v. 1, n. 01, 2017.

KENNAWAY, D. J.; ROYLES, P. Circadian rhythms of 6-sulphatoxy melatonin, cortisol and electrolyte excretion at the summer and winter solstices in normal men and women. **European Journal of Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 450-456, 1986.

Kerman M; Cirak B; Ozguner MF; Dagtekin A; Sutcu R; Altuntas I; Delibas N. **Exp Brain Res** 2005, 163: 406-410.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother–pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain research**, 1133, 115-122, 2007.

KUMAR, A. e SINGH, A. Possible involvement of GABAergic mechanism in protective effect of melatonin against sleep deprivation–induced behaviour modification and oxidative damage in mice, *Fundam Clin Pharmacol*, v.23, p.439-448, 2009.

LANOIX, D., Beghdadi, H., Lafond, J., & Vaillancourt, C. (2008). Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **Journal of pineal research**, 45(1), 50-60.

LANOIX, Dave; OUELLETTE, Rodney; VAILLANCOURT, Cathy. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. **Human Reproduction**, 2006, 21.8: 1981-1989.

LEÃO, A.A.P. Pial circulation and spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**. v. 7, p. 391-396, 1944b.

LEÃO, A.A.P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **J. Neurophysiol.**, v.7, p.359–390, 1944a.

LEÃO, A.A.P. The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, V 3, P 315-321, 1951.

LEÃO, AAP. On the spread of spreading depression. In: M.AB. **Brazier (Ed). Brain Function**. 1: 78-85, University of California Press, 1963.

LESER, S. M.; SOARES, E. A. Aspectos nutricionais e atividade física na prevenção do câncer coloretal. *Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN)*, 21:121-145, 2001.

LEWY, Alfred J. et al. Light suppresses melatonin secretion in humans. **Science**, v. 210, n. 4475, p. 1267-1269, 1980.

LI, H. et al. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin. **J Pineal Res**, v.57, p.110–119, 2014.

LI, Z.Q. et al. Effects of combination treatment of dexamethasone and melatonin on brain injury in intracerebral hemorrhage model in rats. **Brain Res**, v.1264, p.98–103, 2009.

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

LIN, A.M.; HO, L.T. Melatonin suppresses iron-induced neurodegeneration in rat brain. **Free Radic Biol Med**, v.28, p.904–911, 2000.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care,

LIU, J. et al. Melatonin increases reactive aggression in humans. **Psychopharmacology**, v.234, n. 19, p. 2971-2978, 2017.

LIU, Y.J. et al. Apolipoprotein E influences melatonin biosynthesis by regulating NAT and MAOA expression in C6 cells. **J Pineal Res**, v.52, p.397–402, 2012.

LIU, Y.J. et al. Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. **J Pineal Res**, v.43, p.232–238, 2007.

MAGANHIN, C. C. et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**.54(3):267-270; 2008.

MANDELBROT, Benoit B.; PASTOR-SATORRAS, Romualdo; RAUCH1Y, Erik M. The Geometry of Ising Clusters: Gap Independence and Global Structure. 1996.

MARTORELL, Reynaldo. Consequências a longo prazo da subnutrição no desenvolvimento físico e mental. **Anais Nestlé**, v. 61, p. 19-30, 2001.

MARTIN, P. Animal models sensitive to antianxiety agents. **Acta Psychiatr Scand Suppl**. 1998.

MEDEIROS, M.C. Composição lipídica da dieta e depressão alastrante cortical: estudo eletrofisiológico. Recife, 1996. **Tese (Doutorado em Nutrição)** - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 89p, 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.

MESENGÉ, C. et al. Protective effect of melatonin in a model of traumatic brain injury in mice. **J Pineal Res**, v.25, p.41–46, 1998.

MILLER E, Morel A, Saso L and Saluk J. Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Applications in Neurodegenerative Disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry** 2015; 15: 163-169.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 17, n. 1, p. 91-128, Spring 1993.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LaFRANCE, R. J.; BRONZINO, J.D.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Malnutrition and developing central nervous system. In: ISAACSON, R. L.; JENSEN, K. F. (ed.). **The Vulnerable Brain and Environmental Risks.** New York, Plenum Press, 2-42, 1992.

NAHAR, A. et al. Effects of psychosocial stimulation on growth and development of severely malnourished children in a nutrition unit in Bangladesh. **Eur J Clin Nutr**, v.63, p.725–731, 2009.

NAKAMURA, Y. et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 1, p. 29-33, 2001.

NETO, Adail Orrith Liborio. Histologia do Sistema Nervoso: Diversidade Celular e Suas Localizações. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento.** 2017

PALENCIA G, Calvillo M, Sotelo J. Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazole-induced seizures in rats. **Epilepsia** 1996; 37: 583-86.

PASSANHA, A.; CERVATO-MANCUSO, A. M.; SILVA, M. E. M. P. Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias. **Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.** [online]. 2010, vol.20, n.2, pp. 351-360. ISSN 01041282.

PERES, Mario Fernando Prieto. Melatonina, aminoácidos e a fisiopatologia da enxaqueca: a ponta ou o fragmento do iceberg?. **Migrêneas cefaléias**, 2005, 8.1: 16-19.

PICANÇO-DINIZ, C.W.; ARAÚJO, M.S.; BORBA, J.M.C.; GUEDES, R.C.A. NADPH Diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. **Nutritional Neuroscience**, 1, 35-48, 1998.

PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct.**, v.220, n.2, p.827- 40, 2015.

PONTES-FILHO, N.T. Morfometria e histoquímica do córtex cerebral de ratos jovens submetidos à desnutrição e ao etanol. Recife, 2003. **Tese (Doutorado em Nutrição)**, 68p, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

RADAK, Zsolt et al. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 187-196, 2016.

RANDALL, C. F. et al. Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-of-phase photoperiods. **General and comparative endocrinology**, v. 98, n. 1, p. 73-86, 1995.

REITER, Russel J. et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 34, n. 2, p. 237-256, 2001.

REITER, Russel J. et al. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2007.

REITER, Russel J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of pineal research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

ROCHA, A.K.A.A. et al. Altered MT1 and MT2 melatonin receptors expression in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats. **Epilepsy Behav**, v.71, p.23–34, 2017.

ROCHA-DE-MELO A.P. E; GUEDES R.C.A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663–669, 1997.

ROCHA-DE-MELO, A. P. et al. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutritional Neuroscience*, v. 9, n. 3-4, p. 155-160, 2006.

ROCHA-DE-MELO, A. P. Modificação do estado nutricional no rato recém-nascido, por manipulação do tamanho da ninhada: estudo morfo-funcional do sistema nervoso. Recife, 2001. **Tese (Doutorado em Nutrição)**, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 68p, 2001.

RODGERS, R.J., et al. Comparative behavioural profiles of buspirone and its metabolite 1-(2-pyrimidine)-piperazine-(1pp) in the murine elevated plus-maze. **J. Méd. Biol. Re**, 1997

ROMALDINI, Ceres C. et al. Fatores de risco para aterosclerose em crianças e adolescentes com história familiar de doença arterial coronariana prematura. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 135-140, 2004.

RUIZ, S.; PEREZ, H.; HERNANDEZ, H.; SOTO-MOYANO, R. Effect of early malnutrition on latencies of direct cortical responses evoked in the rat prefrontal cortex. **Nutrition Reports International**, v. 32, p. 533-538, 1985.

SALES, Michelle Ribeiro et al. **Efeito de Melatonina em Drosophila melanogaster modelo para doença de Alzheimer**. 2019.

SALVIANO, Marcelo de Faria. **Análise fisiológica e comportamental de modelos animais desenvolvidos geneticamente para o estudo da ansiedade e da doença de Alzheimer**. 2013.

SANTOS-MONTEIRO, J., GUEDES, R. C. A.; CASTRO, R.M.; CABRA-FILHO, J.E. psychosocial stimulation and brain plasticity in malnourished adult rats. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, 2(1):15-22, 2002.

SAWAYA, Ana Lydia. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos avançados**, v. 20, n. 58, p. 147-158, 2006.

SCHWEIGERT, Ingrid Dalira; Souza, Diogo Onofre Gomes de; Perry, Marcos Luiz Santos (2009). Desnutrição, maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas. **Revista de Nutrição**, 22(2), 271–281.

SEDIVY R, WINDISCHBERGER Ch, SVOZIL K, MOSER E, BREITENECKER G. Fractal analysis: an objective method for identifying atypical nuclei in dysplastic lesions of the cervix uteri. **Gyn Oncol** 1999; 75: 78-83.

SERSON, Breno. Transtornos de ansiedade, estresse e depressão: conhecer e tratar. **MG Editores**, 2016.

SILVA, R.H. et al. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacol**, v.46, p.895-903, 2004.

SOARES JÚNIOR, José Maria et al. Aspectos moleculares dos receptores de melatonina e sua ação na reprodução. **Femina**, p. 495-499, 2003.

SOUSA, Mariana Séfora Bezerra. **Efeitos do extrato de murici (Byrsonima crassifolia (L.) Kunth) sobre o sistema nervoso de ratos idosos e sépticos: análise da depressão alastrante cortical e sua relação com o status oxidativo cerebral**. 2018.

TABOADA-CRISPI, A., et al. Quantitative EEG Tomography of Early Childhood Malnutrition. **Frontiers in Neuroscience**. 12. 2018.

TAN, D. X. et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. **Free Radic Biol Med.**, v.29, p. 1177–1185, 2000.

TENORIO, A.S. et al. Early vibrissae removal facilitates cortical spreading depression propagation in the brain of well-nourished and malnourished developing rats. **Int J Dev Neurosci**, v.27, p.431–437, 2009.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal of Pineal Research**. v.39, n.2, p.99-104, 2005

TOYOKUNI S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. **Antioxid Redox Signal**. 2006; 8:1373-7

TSANTES AE, Bonovas S, Travlou A, Sitaras NM. Redox imbalance, macrocytosis, and RBC homeostasis. **Antioxid Redox Signal** 2006;8:1205-16

UBEROS, J. et al. Normalization of the sleep-wake pattern and melatonin and 6 sulphatoxy-melatonin levels after a therapeutic trial with melatonin in children with severe epilepsy. **J Pineal Res**, v.50, p.192–196, 2011.

UTTARA B, SINGH AV, ZAMBONI P, MAHAJAN RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**. v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VASCONCELOS, C.A.C.; OLIVEIRA, J.A.F.; COSTA, L.A.O.; GUEDES, R.C.A.

VICTORA, Cesar G. et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **The lancet**, v. 371, n. 9609, p. 340-357, 2008.

VIEIRA, R. W. et al. Do aleitamento materno à alimentação complementar: atuação do profissional nutricionista. **Saúde & Amb. Rev.**, Duque de Caxias, v.4, n.2, p.1-8, jul- dez. 2009.

VITOLO, Márcia Regina. **Nutrição da gestação à adolescência**. Reichmann& Affonso, 2003.

VOICULESCU SE, Zygouropoulos N, Zahiu CD and Zagrean AM. Role of melatonin in embryo fetal development. **J Med Life** 2014; 7(4): 488–492.

WAINWRIGHT, P.E. Do essential fatty acids play a role in brain and behavioral development? Neuroscience and Biobehavioral. 16:193-205, 1992. In: MEDEIROS, M.C. Composição lipídica da dieta e depressão alastrante cortical: estudo eletrofisiológico. Recife, 1996. **Tese (Doutorado em Nutrição)** - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 1996.

WEHR, Thomas A. Melatonin and seasonal rhythms. **Journal of biological rhythms**, v. 12, n. 6, p. 518-527, 1997.

WEIL, Z. M. et al. Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like with bipolar disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.13, p. 1905-1908, 2006

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, p. 249-278, 1989.

WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sciences**, v. 35, p. 2085-2094, 1984

WU G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. **J Nutr.** 2004; 134(9):2169-72.

WU, H. et al. Melatonin attenuates neuronal apoptosis through up-regulation of K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2 expression following traumatic brain injury in rats. **J Pineal Res**, v.61, p.241–250, 2016.

WU, H.J. Neuroprotective Mechanisms of Melatonin in Hemorrhagic Stroke. **Cell Mol Neurobiol**, v.37, p.1173-1185, 2017

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. C. A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 24, n. 12, p. 1277-1281, 1991.

YOUNES-RAPOZO, V.; MOURA, E. G.; MANHAES, A. C.; PEIXOTO-SILVA, N.; OLIVEIRA, E.; LISBOA, P. C. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to

ZIMMERMANN, Alice Mesquita; KIRSTEN, Vanessa Ramos. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2016.

ZIPPEL, U. et al. Altered action of dopamine and cholecystokinin on lateral hypothalamic neurons in rats raised under different feeding conditions. **Behav. Brain Res**, v.147, p.89–94, 2003.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de aprovação de comitê de ética no uso de Animal (CEUA) da UFPE



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

Recife, 10 de setembro de 2020

Ofício nº 48/20

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

Para: **Prof. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório**

Departamento de Histologia e Embriologia

processo nº0045/2020

Certificamos que a proposta intitulada “**Análise eletrofisiológica e morfológica do cérebro de ratos jovens submetidos ao desmame precoce e tratados com melatonina**” ” registrado com o nº0045/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório** 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 26/08/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2020 à 01/12/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus Novergicus Albinus</i> / Wistar / rato
Nº de animais	24
Peso/Idade	90 dias/ 200 gramas
Sexo	Machos (12) e Femea (12)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE

Atenciosamente

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