

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TAIANE SILVEIRA DE LIMAS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA A CURTO E
LONGO PRAZO SOB PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
BIOQUÍMICOS DE RATOS JOVENS**

**CRICIÚMA
ABRIL, 2023**

TAIANE SILVEIRA DE LIMAS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA A CURTO E
LONGO PRAZO SOB PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
BIOQUÍMICOS DE RATOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para exame de qualificação em Ciências
da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaqueline da Silva
Generoso

**CRICIÚMA
ABRIL, 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L732e Limas, Taiane Silveira de.

Efeitos da suplementação de melatonina a curto e longo prazo sob parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos jovens / Taiane Silveira de Limas. - 2023.

47 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2023.

Orientação: Jaqueline da Silva Generoso.

1. Melatonina - Efeito fisiológico. 2. Melatonina - Uso terapêutico. 3. Dano oxidativo. 4. Comportamento. 5. Ansiedade. 6. Depressão. I. Título.

CDD 23. ed. 612.405

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC e no Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNISUL.

RESUMO

A melatonina (MLT) é um hormônio secretado pela glândula pineal que atua tanto no ritmo circadiano quanto na modulação neuronal. Após secretada, a MLT atua principalmente através dos receptores MT1 e MT2, modulando a função visual, circadiana, sazonal, cardiovascular, endócrina, imunológica e crescimento tumoral. Devido a descoberta de inúmeros efeitos benéficos, a suplementação de MLT vem sendo investigada. Porém, não são claros os efeitos da suplementação prolongada de MLT no período do neurodesenvolvimento. Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do tratamento a curto e longo prazo com MLT sobre parâmetros comportamentais e de dano oxidativo em ratos Wistar jovens. Foram utilizados ratos 42 Wistar machos, pesando entre 100 e 150 g, divididos em grupos controle (salina via gavagem), MLT curto prazo (CP) (MLT 10 mg/Kg/dia por 10 dias via gavagem), MLT longo prazo (LP) (MLT 10 mg/Kg/dia por 2 meses, via gavagem). Foram realizados os testes comportamentais de testes de habituação ao campo aberto, labirinto em cruz elevada, interação social e nado forçado. Para as análises bioquímicas, foi realizada a avaliação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dano oxidativo em proteínas, atividade da mieloperoxidase e concentração de nitrito/nitrato nas estruturas córtex frontal, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, estriado, hipotálamo, *núcleo accumbens* e amígdala. Na tarefa comportamental de habituação ao campo não houve diferença na atividade locomotora e exploratória. Os animais do grupo MLT/CP apresentaram redução dos movimentos de autolimpeza comparados aos outros grupos. Houve redução no número de cruzamentos no grupo controle e MLT/LP comparado com a sessão treino, demonstrando memória de habituação. No teste de interação social, houve aumento no parâmetro de seguir no grupo MLT/LP. Não houve diferença significativa no comportamento tipo depressivo. No teste do labirinto de cruz elevada, o grupo MLT/LP teve mais entradas nos braços abertos indicando um comportamento menos ansioso. Os níveis de MDA foram diminuídos no grupo MLT/LP quando comparado ao MLT/CP apenas no *núcleo accumbens*. Quanto a carbonilação de proteínas, no córtex frontal houve aumento no grupo MLT/LP; no córtex, houve aumento dos níveis no grupo MLT/LP; no cerebelo ambos os grupos tratados apresentaram aumento; na amígdala houve aumento no grupo MLT/CP e uma diminuição no grupo MLT/LP comparado ao

MLT/CP. Não houve diferença significativa na atividade da MPO. Quanto aos níveis de nitrito/nitrato, houve aumento no córtex frontal do grupo de MLT/LP; no hipocampo houve aumento no grupo MLT/LP; no estriado houve diminuição do grupo MLT/LP e aumento no grupo MLT/CP comparado ao grupo controle; no *núcleo accumbens* houve aumento no grupo MLT/CP; na amígdala os grupos tratados com MLT apresentaram aumento comparado ao grupo controle. No entanto, o grupo MLT/LP apresentou uma diminuição comparado ao tratamento de curto prazo. Assim, não houve efeitos adversos na cognição dos animais. Porém, alguns efeitos oxidantes foram observados após a suplementação de MLT. A hipótese é de que na presença de dano a MLT apresente efeito melhor, e no presente estudo o animal não foi submetido a modelo patológico. Sugerindo uma atividade da MLT dependente do microambienteque.

Palavras-chave: Melatonina, dano oxidativo, comportamento, ansiedade, depressão, memória.

ABSTRACT

Melatonin (MLT) is a hormone secreted by the pineal gland that acts in the circadian rhythm and neuronal modulation. After being secreted, MLT acts mainly through MT1 and MT2 receptors, modulating visual, circadian, seasonal, cardiovascular, endocrine, immune function, and tumor growth. Due to the discovery of numerous beneficial effects, MLT supplementation has been investigated. However, the effects of prolonged MLT supplementation on the neurodevelopmental period are unclear. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of short- and long-term treatment with MLT on behavioral parameters and oxidative damage in young Wistar rats. Forty-two male Wistar rats, weighing between 100 and 150 g, were divided into control groups (saline via gavage), MLT short-term (ST) (MLT 10 mg/Kg/day for ten days via gavage), MLT long-term (LT) (MLT 10 mg/Kg/day for two months, via gavage). Behavioral tests of habituation to the open field, elevated plus maze, social interaction, and forced swimming were performed. For the biochemical analyses, the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), oxidative damage to proteins, myeloperoxidase activity, and nitrite/nitrate concentration in the frontal cortex, cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, striatum, hypothalamus, *nucleus accumbens*, and amygdala were evaluated. There was no difference in locomotor and exploratory activity in the field habituation behavioral task. The animals in the MLT/ST group showed a reduction in self-cleaning movements compared to the other groups. There was a reduction in the number of crossings in control and MLT/LT groups compared to the training session, demonstrating habituation memory. In the social interaction test, there was an increase in the following parameter in the MLT/LT group. There was no significant difference in depressive-like behavior. In the elevated plus maze test, the MLT/LT group had more entries into the open arms, indicating less anxious behavior. MDA levels decreased in the MLT/LT group compared to the MLT/ST group only in the *nucleus accumbens*. As for protein carbonylation, in the frontal cortex, there was an increase in the MLT/LT group; in the cortex, there was an increase in levels in the MLT/LT group; in the cerebellum, both treated groups showed an increase; in the amygdala, there was an increase in the MLT/ST group and a decrease in the MLT/LT group compared to the MLT/ST. There was no significant difference in MPO activity. As for nitrite/nitrate levels, there was an increase in the frontal cortex of the MLT/LT

group; in the hippocampus, there was an increase in the MLT/LT group; in the striatum, there was a decrease in the MLT/LT group and an increase in the MLT/ST group compared to the control group; in the *nucleus accumbens* there was an increase in the MLT/ST group; in the amygdala, the groups treated with MLT showed an increase compared to the control group. However, the MLT/LT group decreased compared to short-term treatment. Thus, there were no adverse effects on the animals' cognition. However, some oxidizing effects were observed after MLT supplementation. The hypothesis is that MLT has a better effect in the presence of damage. The animal was not subjected to a pathological model in the present study, suggesting a microenvironment-dependent MLT activity.

Keywords: Melatonin, oxidative damage, behavior, anxiety, depression, memory.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	28
3.2 ANIMAIS.....	28
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	28
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	29
3.4.1 Habituação ao campo aberto.....	29
3.4.2 Teste de interação social recíproca.....	30
3.4.3 Nado forçado.....	30
3.4.4 Labirinto em cruz elevada.....	30
3.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E AMOSTRAS	31
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	31
3.6.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	31
3.6.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil	31
3.6.3 Atividade da mieloperoxidase.....	32
3.6.4 Determinação da concentração de nitrito/nitrato	32
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	47
ANEXO.....	56

1 INTRODUÇÃO

A melatonina (MLT) é um hormônio secretado pela glândula pineal, produzido de forma circadiana, tendo efeito tanto no ritmo circadiano quanto na modulação neuronal. Esse hormônio possui diversas funções, incluindo ações diretas sobre radicais livres de oxigênio e nitrogênio (ações antioxidantes), que independem de receptores e atividades mediadas por receptores específicos (Claustrat e Leston, 2015).

A MLT é sintetizada a partir do triptofano proveniente da circulação que é transformado em serotonina. A serotonina é então convertida em MLT por um processo envolvendo quatro etapas envolvendo a atividade de duas enzimas, a serotonina-n-acetil transferase (NAT), que é a enzima limitadora para a síntese da MLT, e a hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (figura 1). A síntese de MLT é iniciada pela ligação da norepinefrina em receptores adrenérgicos, ativação subsequente da adenilato ciclase pineal, e aumento do cAMP (Reiter, 1991; Cipolla-Neto e Gaspar do Amaral, 2018). Estudos mostram que a síntese de MLT depende da disponibilidade do triptofano e tem sido observada uma redução significativa deste hormônio após a depleção aguda do aminoácido. Além disso, fatores nutricionais podem influenciar a sua síntese, como os níveis de folato e vitamina B6 (Zimmermann et al., 1993; Popović et al., 2018).

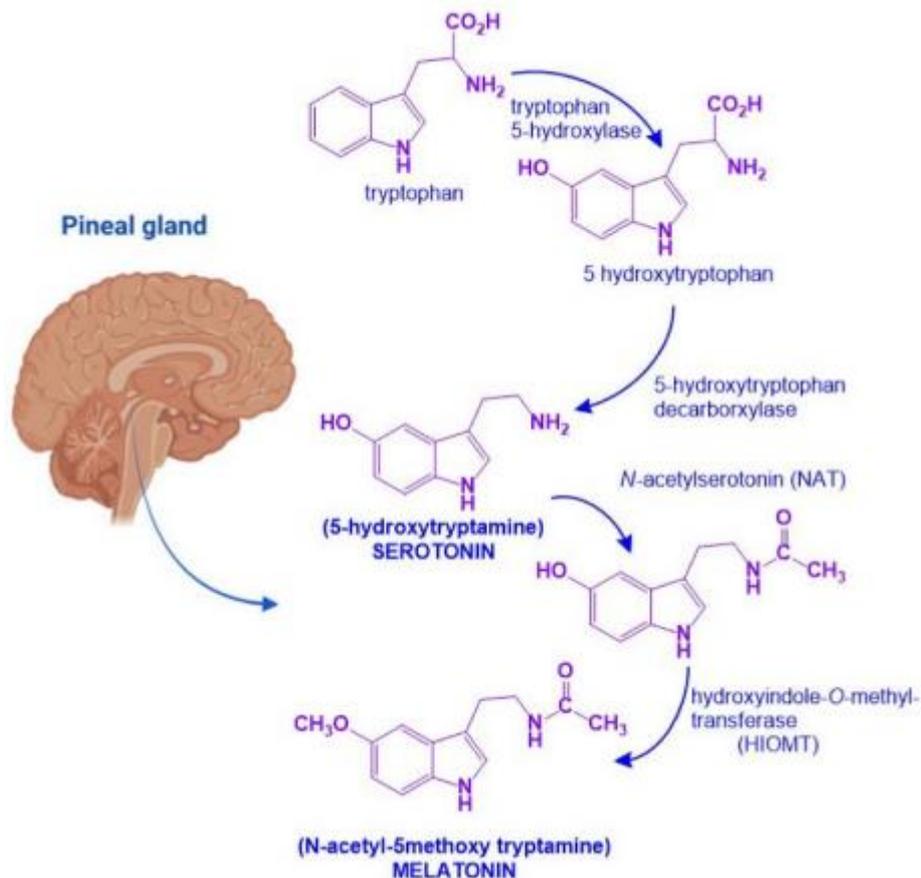


Figura 1- Via biossintética da melatonina. A biossíntese de melatonina na glândula pineal começa a partir do triptofano e envolve quatro etapas enzimáticas sequenciais para produzir N-acetiltryptamina (melatonina) (Miranda-Riestra et al., 2022).

O ciclo claro/escuro é o principal sincronizador do sistema de regulação da secreção de MLT. A informação fóptica é transmitida ao marcapasso central via fibras retino-hipotalâmicas, sendo que durante o dia, na presença de luz, a saída do trato retino-hipotalâmico inibe a síntese de MLT. Desta forma, luzes artificiais de intensidade e duração suficientes no período noturno prejudicam a produção de MLT (Claustrat e Leston, 2015).

A influência do fotoperíodo predominante na produção de MLT circadiana é realizada por uma largura de banda restrita de luz visível, isto é, comprimentos de onda na faixa de 460 a 480 nm (luz azul). Para o processamento de comprimentos de onda azul, as retinas de mamíferos têm até cinco subtipos altamente especializados de células ganglionares de retina intrinsecamente fotossensíveis (IPRGCs), que utilizam melanopsina, um fotorreceptor especializado, para responder à luz (Bruce et al., 1991; Popović et al., 2018).

A mensagem relacionada ao ambiente de luz é então transferida para os núcleos supraquiasmáticos (SCN) no hipotálamo, através do trato retino-hipotalâmico, via nervo óptico. O SCN transmite um sinal neural à glândula pineal que funciona como um relógio biológico central (Tähkämö et al., 2018). Como a MLT não é armazenada na glândula pineal, os níveis plasmáticos refletem a atividade da glândula. A secreção ocorre à noite, com o pico dos níveis plasmáticos por volta das 03:00 às 04:00, sendo que os níveis diurnos são baixos ou indetectáveis (Gunata et al., 2020).

A produção rítmica de MLT inicia durante o primeiro ano da vida, atinge os níveis mais altos entre 3 a 6 anos de idade, e o pico noturno cai progressivamente em 80% até a idade adulta. Esta relação se dá tanto pelo aparecimento da maturidade sexual, quanto pelo aumento do tamanho corporal e da produção constante de MLT devido à falta de crescimento pineal durante a infância (Popović et al., 2018).

A MLT é uma molécula anfifílica, sendo que essa característica facilita a sua passagem através das membranas celulares e da barreira hematoencefálica para modular a atividade cerebral (Claustrat e Leston, 2015). Na corrente sanguínea, é direcionada à fluidos, tecidos e compartimentos celulares (saliva, urina, líquido cefalorraquidiano, folículo pré-ovulatório, sêmen, líquido amniótico e leite) (Reiter, 1991).

A ação biológica da MLT se dá por meio de receptores de membrana específicos e da interação com receptores nucleares e intracelulares, como a calmodulina ou proteínas associadas à tubulina, e exibe efeitos antioxidantes diretos ou indiretos que participam de muitas funções gerais (Gunata et al., 2020). Após secretada pela glândula pineal, a MLT atua principalmente através dos receptores MT1 e MT2, que são membros da superfamília dos receptores transmembranares acoplados à proteína G (WON et al., 2021). Os receptores específicos de MLT estão presentes desde o sistema nervoso central até a periferia, atuando na modulação da função visual, circadiana, sazonal, cardiovascular, endócrina, imunológica e no crescimento tumoral. Dessa forma, sabe-se que a MLT pode regular processos intracelulares, a exemplo da proteína G e a atividade de segundos mensageiros como adenosina 3,5-monofosfato cíclico (cAMP) e Ca^{+2} (Pariante et al., 2017). Durante o neurodesenvolvimento, as atividades reguladas pela MLT desempenham um importante papel na sinalização intracelular e regulação da expressão gênica de proteínas importantes na neurogênese. No hipocampo, receptores de MLT ligados à membrana encontram-se no giro denteado, nas regiões da via das fibras musgosas

(CA3) e via colateral de Schaffer (CA1) e do subículo (Claustrat e Leston, 2015; Liu et al., 2017). Este hormônio também atua em outros receptores não específicos e com menor afinidade. No cérebro, a MLT é oxidada por espécies reativas de oxigênio (ERO) em N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK). A AFMK exibe uma capacidade antioxidante *in vitro* e está envolvida no processo pelo qual a MLT e seus metabólitos neutralizam o radical hidroxila, que é altamente tóxico, além de outras ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Claustrat e Leston, 2015).

As ERO e ERN são geradas intrínseca ou extrínsecamente nas células. Algumas das fontes endógenas de ERO incluem respiração mitocondrial, resposta inflamatória, microsomas e peroxissomos, enquanto nanomateriais sintéticos e poluentes ambientais atuam como indutores exógenos (Pushpakumar et al., 2014; Yang et al., 2021). Fisiologicamente, ERO são produzidas em pequenas quantidades em resposta a vários estímulos, pois ocorrem como subprodutos essenciais da respiração mitocondrial (Lopes Lima et al., 2021). No entanto, quando ocorre um desbalanço e estas espécies são produzidas em excesso, pode ocorrer a necrose ou apoptose das células. Este desbalanço pode ser produzido pela ação de radiação ionizante e ultravioleta, ingestão de toxinas, metais pesados, álcool, medicamentos, lesões de isquemia/reperfusão que ocorrem durante um infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular encefálico, inflamação grave, doenças neurodegenerativas e muitas outras (Li et al., 2008). Além disso, o envelhecimento está associado ao acúmulo progressivo de detritos oxidativos, o que contribui para a ineficiência funcional dos processos celulares, induzindo assim a produção adicional de radicais livres, que progressivamente acarretam em falhas de processos moleculares, acúmulo de danos oxidativos induzindo um colapso fisiológico adicional, exacerbando ainda mais a produção de radicais livres (Claustrat e Leston, 2015; Dayem et al., 2017).

A MLT exibe propriedades antioxidantes uma vez que aumenta a produção de enzimas antioxidantes, por mobilizar o sistema enzimático intracelular, e por quelar, de maneira direta, as ERO e nitrogênio incluindo a superóxido (Amaral and Cipolla-Neto 2018). Além disso, a MLT inibe a produção da óxido nítrico (NO) sintase, uma enzima pró-oxidante (WON et al., 2021). Ainda atua na regulamentação de complexos da cadeia respiratória I e IV e na proteção do DNA mitocondrial contra mutações e exclusões. Estas características são de extrema importância para a manutenção da função mitocondrial (Cipolla-Neto e Gaspar do Amaral, 2018; Reiter et al., 2018).

Como a glândula pineal é um alvo imunológico, foi relatado que a MLT inibe fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina (IL) 6 e IL-1 β através da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que ocorre em resposta à ação regulatória da MLT sobre macrófagos (figura 2). Além disso, a MLT demonstrou exercer efeitos de reforço imunológico, como o aumento do número de células relacionadas ao sistema imunológico, incluindo macrófagos, células *natural killer* (NK), IL-1, IL-6 e IL-12, células TCD4(+), imunoglobulina (Ig) G1 e IgM (Gunata et al., 2020; Manchia et al., 2021).

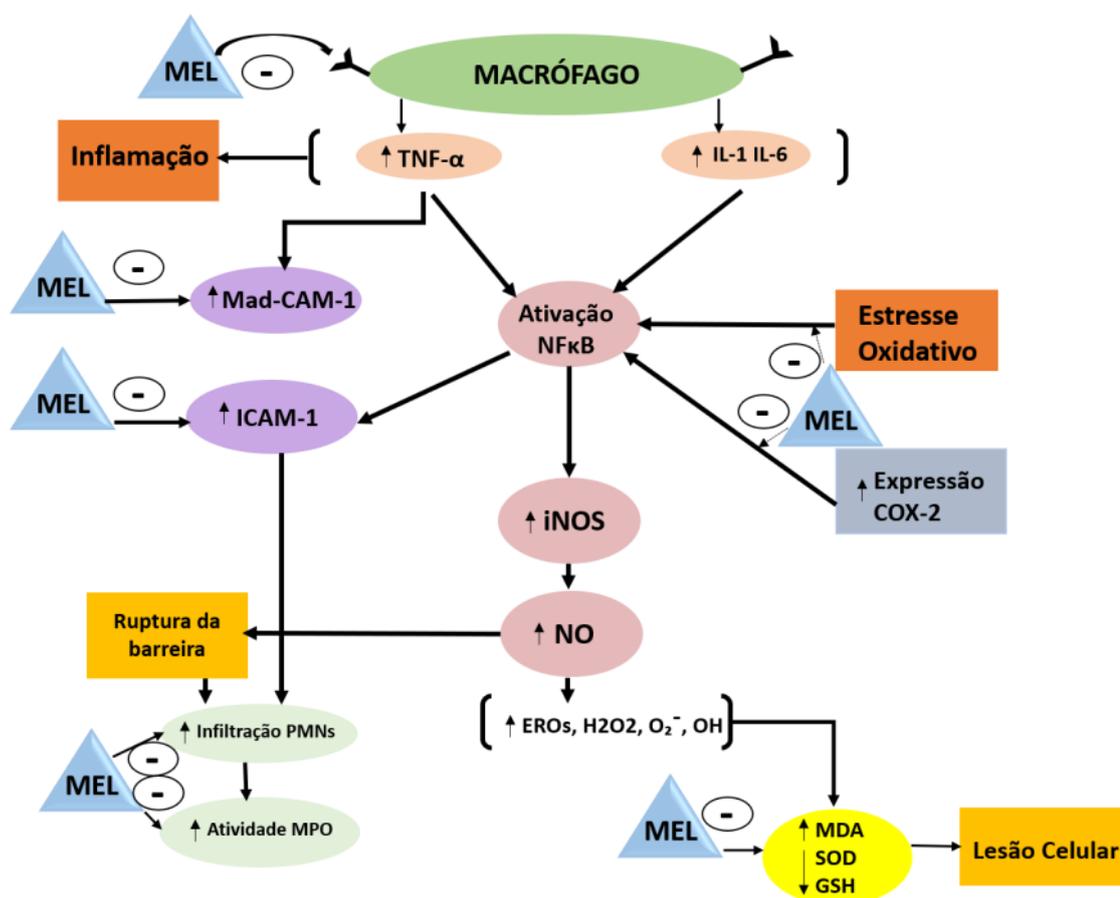


Figura 2: MLT apresenta propriedade anti-inflamatória por meio de diferentes mecanismos. a MLT inibe fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina (IL) 6 e IL-1 β através da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que ocorre em resposta à ação regulatória da MLT sobre macrófagos. MEL (Melatonina); COX (Ciclo-oxigenase); GSH (Glutationa reduzida); OH (Radical hidroxila); ICAM (Molécula de adesão intercelular); iNOS (Óxido Nítrico Sintase); Mad-CAM (Molécula de adesão à célula de adesão da mucosa); MDA (malondialdeído); MPO (mieloperoxidase); Linfócito T-helper (TH); NO (óxido nítrico); PMNs (polimorfonucleares); SOD (Superóxido dismutase); - (Inibição); ↓ (diminui); ↑ (aumenta). Fonte: adaptado de Mozaffari e Abdollahi, 2011.

Fernández-Gil *et al.* (2017) observaram, em um estudo que avaliou o efeito do tratamento oral com gel de MLT em animais submetidos a um modelo de toxicidade intestinal induzida por radioterapia, que a MLT apresentou um efeito protetor no intestino delgado associado à proteção mitocondrial, corroborando na redução da resposta inflamatória e a inibição da sinalização dos receptores do tipo NOD contendo o domínio pirina 3 (NLRP3) e seu complexo NF- κ B/NLRP3, responsável pela ativação da caspase-1 e subsequente clivagem de pró-citocinas, como IL-1 β , em suas formas maduras. Estes efeitos provocaram a redução da apoptose das células intestinais e recuperação da disfunção da mucosa, aliviando e facilitando a recuperação da mucosa intestinal. Constatou-se também, que, em condições com respostas imunes exacerbadas, a MLT diminuiu a resposta imune, representada por uma redução na infiltração de neutrófilos, migração de neutrófilos e macrófagos e níveis de ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS (Chuffa *et al.*, 2015; Lansink *et al.*, 2017).

A MLT é sugerida como uma molécula altamente neuroprotetora com efeitos citoprotetores através de mecanismos biológicos independentes de suas ações imunomoduladoras, como regulação do estresse oxidativo, apoptose e homeostase mitocondrial (Morera-Fumero e Abreu-Gonzalez, 2013; Gunata *et al.*, 2020). A MLT demonstrou diminuir os níveis extracelulares de glutamato mantendo a homeostase do Ca²⁺, além de prevenir a lesão celular. Um estudo confirmou que a MLT reduziu a geração de radicais livres no cérebro, agindo nos receptores acoplados à proteína G do tipo MT2 e diminuiu o dano por estresse oxidativo, reduzindo a expressão de Nox2 e Nox4 (Manchia *et al.*, 2021).

O processo autofágico desempenha um importante papel no dano neural induzido por vários agentes neurotóxicos, como o arsenito e cádmio. A MLT exibiu efeitos neuroprotetores regulando a autofagia nessas condições (Teng, Tai *et al.* 2015). Outros efeitos bem descritos nas últimas décadas, figura 3, incluem a regulação da reprodução sazonal, controle fotosensível da síntese de melatonina pela glândula pineal, iniciação do sono, modulação do ritmo circadiano, e regulação da epigenética e da função da ubiquitina e proteossoma (Reiter, Sharma *et al.* 2020).

A MLT tem-se apresentado como um agente neuroprotetor altamente eficaz, não somente em doenças neurodegenerativas, com a doença de Alzheimer, como também após lesão cerebral. Esse efeito decorre, em parte, de suas ações antioxidante e ações antiapoptóticas (Rosales-Corral *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2019).

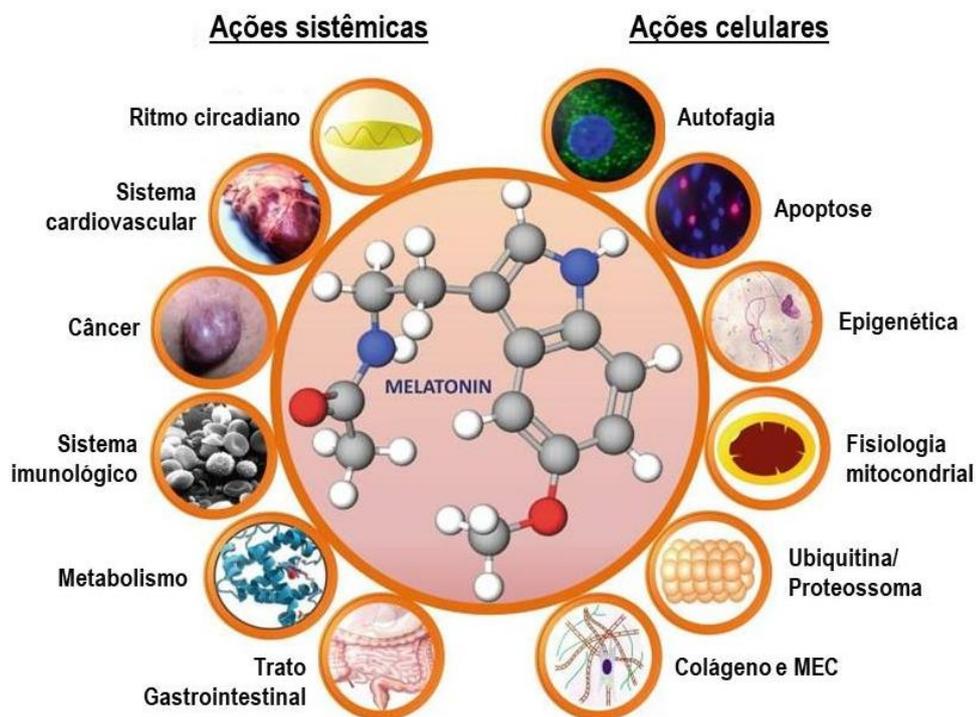


Figura 3: Principais ações sistêmicas e celulares identificadas da melatonina produzida endogenamente ou administrada exogenamente. MEC= matriz extracelular. Adaptado de Reiter, Sharma et al. 2020.

Em estudos com animais, a MLT estimulou todos os estágios da neuroplasticidade, incluindo neurogênese, sinaptogênese, axogênese e dendritogênese. A MLT demonstrou reparar a perda de dendritos do hipocampo aumentando os níveis de Ca^{2+} /calmodulina e a ativação da quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM) (Pariante et al., 2017).

O avanço da idade leva a uma diminuição gradual da produção de MLT, de modo que, em idosos, os níveis noturnos de MLT na circulação são bastante atenuados ou inexistentes. As consequências dessa redução podem ser altamente significativas em termos de saúde (Friedrich, 2019). Além disso, a perda de MLT durante o envelhecimento contribui para o acúmulo acelerado de ERO e ERN devido à disponibilidade reduzida desse importante antioxidante (Waldhauser et al., 1988; Popović et al., 2018). Níveis baixos de MLT também foram encontrados em transtornos psiquiátricos, como transtorno depressivo maior (TDM), esquizofrenia e transtorno bipolar (TB), o que pode indicar a presença de processos neurodegenerativos análogos ao envelhecimento, e propiciar futuramente o uso deste como biomarcador na identificação dessas condições de saúde (Melhuish Beaupre et al., 2021).

Evidências recentes têm demonstrado o envolvimento do sistema melatonérgico em diferentes doenças neurodegenerativas. A melatonina inibe efetivamente a síntese do peptídeo β -amilóide e a formação de fibrilas, e esses efeitos podem ser revertidos pelo bloqueio farmacológico dos seus receptores. Além disso, reduções na expressão de receptores MT1 e MT2 na amígdala e na substância nigra foram relatadas em pacientes com doença de Parkinson (Wongprayoon, Govitrapong, 2021). A compreensão do papel de MLT na neuroproteção contra doenças pode levar ao desenvolvimento de análogos específicos com especificidade e potencial terapêutico.

Com relação à suplementação da MLT, as doses normalmente usadas em estudos pré-clínicos e clínicos para a regulação do ritmo circadiano mediado por receptor de membrana são menores do que os usados para ação antioxidante, que é independente do receptor de membrana (Won et al., 2021). No entanto, ainda não são claros os efeitos da suplementação prolongada de MLT na idade adulta. Portanto, este trabalho tem como objetivo a avaliação dos efeitos do tratamento curto e prolongado de MLT em ratos jovens sobre parâmetros comportamentais de ansiedade, depressão, atividade locomotora, memória e aprendizado, bem como sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao dano oxidativo e nitrosativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração de MLT, a curto e longo prazo, em parâmetros de dano oxidativo e comportamentais em ratos Wistar jovens.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração de MLT, a curto e longo prazo, sob parâmetros comportamentais de ansiedade, depressão, atividade locomotora, interação social e memória e aprendizado em ratos Wistar jovens;
- Avaliar o efeito da administração de MLT, a curto e longo prazo, sob parâmetros de dano oxidativo (TBARS, carbonil, nitrito/nitrato e mieloperoxidase) em ratos Wistar jovens.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Neurologia Experimental, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil e Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, da Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL, Tubarão, SC, Brasil. O estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 19.021.4.IV (anexo A). Sendo assim, todos os cuidados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos foram adotados.

3.2 ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, jovens com 30 dias de vida, saudáveis, pesando entre 100 e 150 g procedentes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram acondicionados em caixas de no máximo cinco animais, com comida e água *ad libitum*, mantidos em ambiente com temperatura de 23 °C +/- 1 °C e umidade relativa entre 55 e 65%, num ciclo de 12 horas claro-escuro (7 h às 19 h).

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Ao completarem 30 dias de vida, os animais foram pesados para ajuste da dosagem dos tratamentos, e em seguida foi iniciado a administração oral dos tratamentos (por 10 dias ou dois meses, conforme grupo experimental, sempre no mesmo horário (06:30). Os animais foram divididos em três grupos experimentais: controle/salina (n = 12), grupo MLT curto prazo (MLT/CP) (n = 15) e grupo MLT longo prazo (MLT/LP) (n = 15). O grupo controle/salina recebeu salina via gavagem; o grupo MLT/CP recebeu MLT (10 mg/Kg) diariamente, diluída em 0,9% de solução salina por 10 dias, via gavagem, e o grupo MLT/LP recebeu MLT (10 mg/Kg) diariamente, diluída em 0,9% de solução salina por 2 meses, via gavagem. A dose da MLT, bem como a

via de administração foram baseados no trabalho de Verma e colaboradores (Verma et al, 2019).

Os testes comportamentais foram realizados apenas em 60 dias após o início de ambos os tratamentos. Vinte e quatro horas após a última administração de salina ou MLT, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto, interação social, nado forçado e de labirinto em cruz elevada (figura 4).

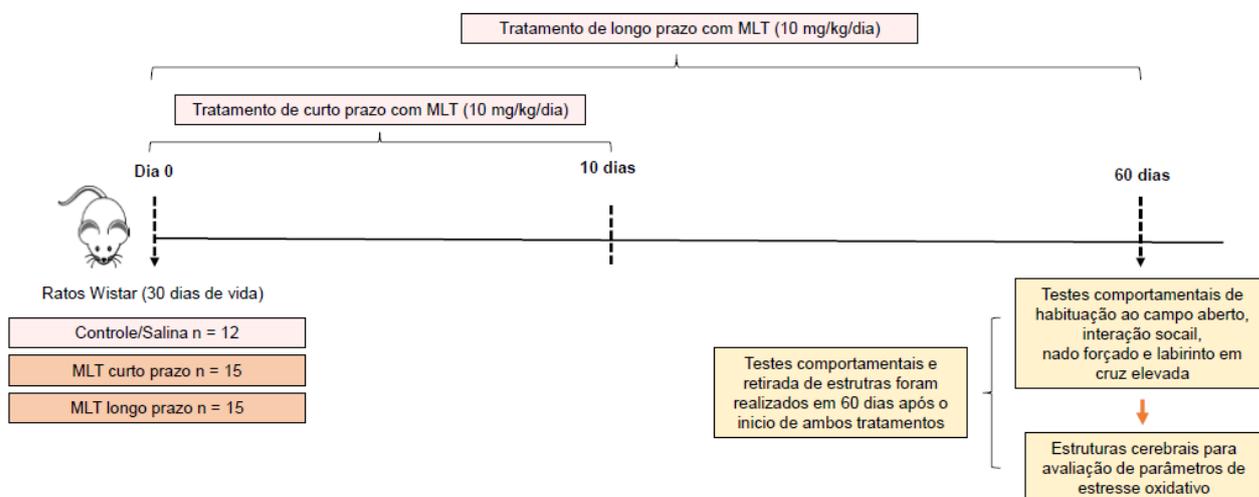


Figura 4 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental. Figura elaborada pelo autor, 2023.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Habituação ao campo aberto

Para avaliar as atividades locomotoras e a memória de habituação dos animais, foi utilizado o aparato de campo aberto. O aparelho é um campo aberto de 40 cm de profundidade por 60 cm de largura, cercado por paredes cinza escuras de 50 cm de altura com uma parede de vidro frontal. Linhas pretas dividem o chão do campo aberto em nove retângulos. Cada rato foi gentilmente colocado no quadrante traseiro esquerdo do campo aberto e foi permitido explorar a arena por 5 minutos (sessão treino). Foram contabilizados o número de cruzamentos (o número de vezes que o animal cruzou as linhas pretas) e de levantamentos (se apoia com as patas traseiras levantando as dianteiras). Imediatamente após este procedimento, os animais foram devolvidos à sua gaiola. Vinte e quatro horas após a sessão de

treinamento, foi realizado a sessão teste. Todos os ratos foram submetidos a uma segunda sessão de campo aberto. Em ambas as sessões, os cruzamentos e os levantamentos foram contados pelo período de 5 minutos. Uma redução no número de cruzamentos e levantamentos nas duas sessões foi tomada como uma medida de retenção de memória (Vianna, Alonso et al. 2000).

3.4.2 Teste de interação social recíproca

De acordo com Schneider e Przewłocki²⁵, o teste para analisar a interação social nos animais se baseia na tendência natural dos roedores em investigar com maior empenho um indivíduo intruso que lhe foi apresentado pela primeira vez. Neste teste os animais foram submetidos individualmente a interagir com outro animal desconhecido do mesmo peso, sexo e mesma faixa etária que não foram submetidos ao tratamento, durante 10 minutos, em um aparato de campo aberto e foi feito o registro das imagens. Os parâmetros usados para avaliar o comportamento de interação social recíproca seguiram as descrições de Moreira (2008) e quantificaram os tempos de cheirar, de *grooming*, de seguir e de montar.

3.4.3 Nado forçado

O teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato é colocado em um cilindro com água a uma temperatura de 23 °C, com água suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. No primeiro dia (treino), os ratos foram forçados a nadar durante 15 minutos. No teste realizado 24 horas após o treino, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de imobilidade, que incluem imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar (Porsolt, Le Pichon et al. 1977, Detke, Rickels et al. 1995).

3.4.4 Labirinto em cruz elevada

O nível de ansiedade dos animais foi avaliado na tarefa do labirinto em cruz elevada no 17º dia do experimento. O labirinto consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) dispostos de forma perpendicular

formando uma plataforma central (5 x 5 cm), com 50 cm de altura do chão. Os experimentos foram conduzidos em sala escura com luz vermelha posicionada a 30 cm de altura da plataforma central do aparelho.

Os animais foram colocados no centro do labirinto, virado para o braço fechado, por cinco minutos. Os parâmetros avaliados foram: número de entradas e o tempo de permanência no braço aberto ou no fechado, e número de entradas em cada um dos braços e as entradas totais (Pellow et al., 1985)

3.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E AMOSTRAS

Após os testes, os animais foram eutanasiados por decapitação e as estruturas cerebrais córtex frontal, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, estriado, hipotálamo, *núcleo accumbens* e amígdala dissecadas para avaliações bioquímicas de dano oxidativo.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de peroxidação lipídica foi medido níveis de TBARS durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Draper e Hadley 1990). Brevemente, as amostras obtidas serão misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm.

3.6.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito (Levine, Garland et al. 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370 nm.

3.6.3 Atividade da mieloperoxidase

Os tecidos foram homogeneizados (50 mg/mL) em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado a 15.000 g durante 40 min. A suspensão foi sonicada três vezes durante 30 s. Uma parte do sobrenadante foi misturado com solução de tetrametilbenzidina 1,6 mM e 1 mM de H₂O₂. A atividade foi medida espectrofotometricamente, como a variação de absorbância a 650 nm a 37 °C (De Young, Kheifets et al. 1989).

3.6.4 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

A concentração de nitrito/nitrato foi medida em alíquotas de tecido, utilizando a reação de Griess por adição de 100 µl de reagente (0,1% [w/v] em H₂O e 1% [w/v] de sulfanilamida em 5% [v/v] de H₃PO₄ e concentrar o volume [1:01] para a amostra de 100 µl. A densidade óptica foi mensurada a 550 nm utilizando um leitor de ensaio enzimático (Alshammari, Monnier et al. 2012).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Para as análises os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA de duas vias, seguido de teste *post hoc* Tukey. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

4 RESULTADOS

Na tarefa comportamental de habituação ao campo aberto (figura 5), foi avaliado a influência da MLT na atividade exploratória e locomotora. Não houve diferenças no número de cruzamentos e levantamentos entre os grupos entre as sessões treino e teste, demonstrando não haver diferença na atividade locomotora e exploratória entre os grupos ($p > 0,05$) (figura 5A e 5B). Quando avaliado o *grooming* (figura 5C), os animais do grupo MLT/CP apresentaram redução dos movimentos de autolimpeza quando comparados ao grupo salina e grupo MLT/LP.

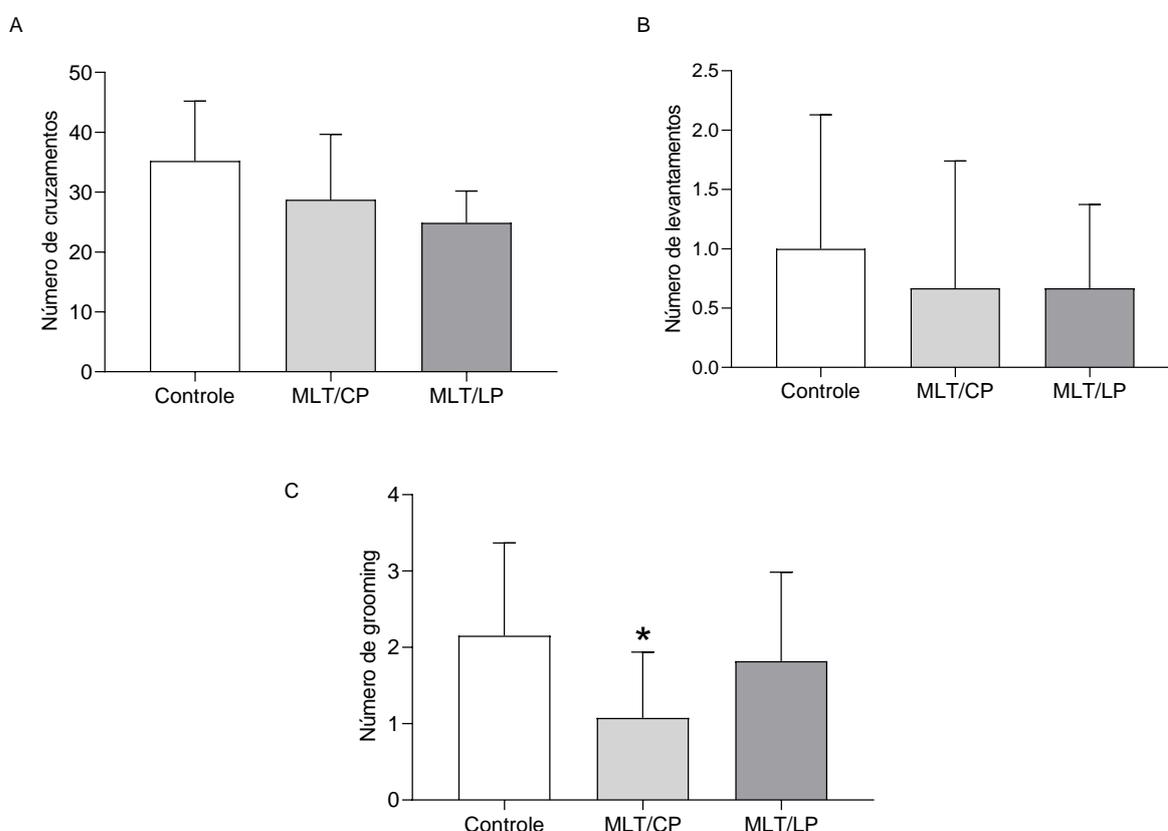
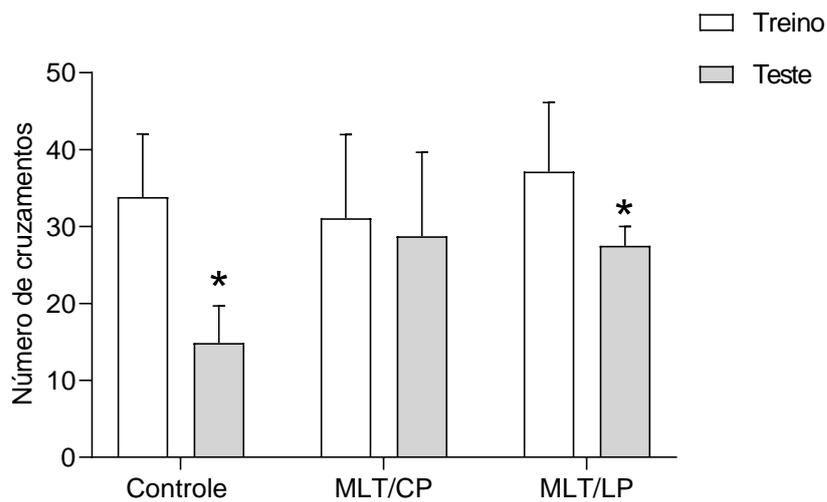


Figura 5. Atividade locomotora e exploratória. A) Número de cruzamentos. B) Número de levantamentos. C) Número de *grooming*. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 12 a 15 animais por grupo e as comparações dentre os grupos foram feitas utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de *Tukey*, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística comparado ao grupo controle. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo.

A figura 6 ilustra a avaliação da memória de habituação. Na sessão teste, houve redução significativa no número de cruzamentos no grupo salina e MLT com tratamento em longo prazo comparado com a sessão treino, demonstrando memória de habituação nesses grupos. O grupo MLT curto prazo não apresentou diferença

estatística entre as sessões (figura 6A). Para o número de levantamentos (figura 6B) não foi encontrado diferenças significativas entre treino e teste nos grupos.

A)



B)

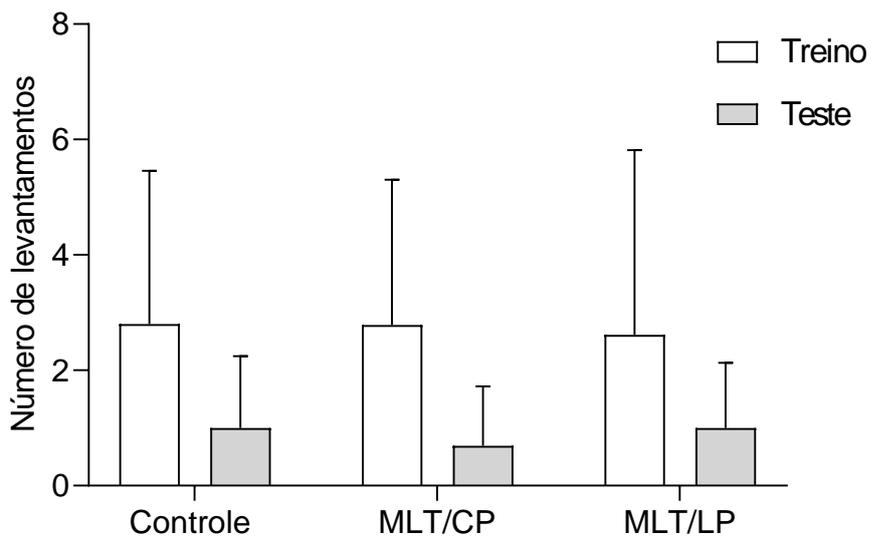


Figura 6: Teste de habituação ao campo aberto. A) Número de cruzamentos. B) Número de levantamentos. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 12 a 15 animais por grupo e as comparações dentre os grupos foram feitas utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística entre as sessões treino e teste. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo;

A figura 7 demonstra que não houve diferença entre os grupos nos parâmetros de início da interação social (figura 7A) e de cheirar (figura 7B), de *grooming* (figura 7C) e de montar (figura 7D). No entanto, para o parâmetro de seguir (figura 7E) no grupo MLT/LP houve um aumento do número comparando-se aos grupos controle e MLT/CP.

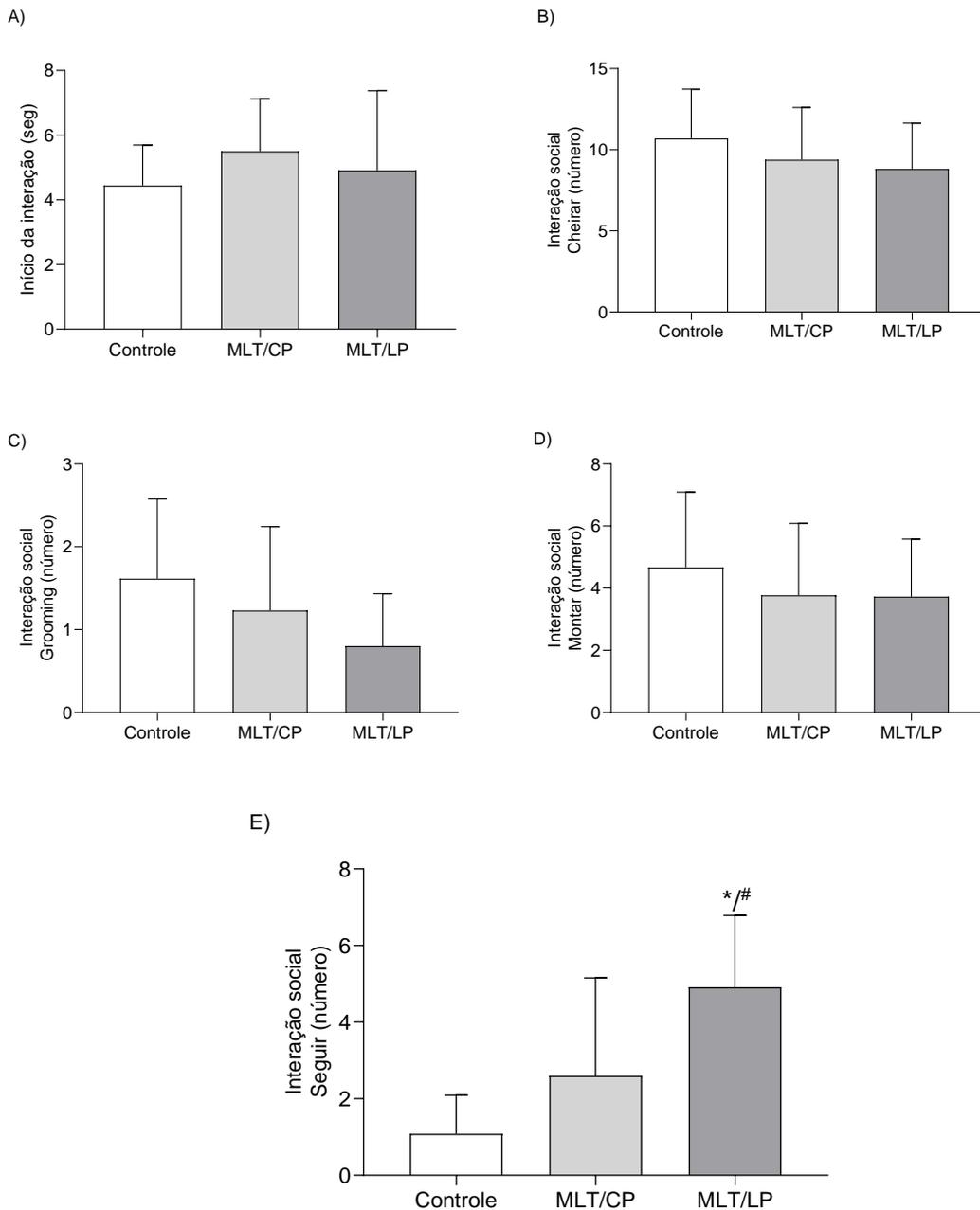


Figura 7 - Teste comportamental de interação social. A) início da interação social. B) teste de cheirar. C) teste de *grooming*. D) teste de montar. E) teste de seguir. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 12 a 15 animais por grupo e as comparações foram feitas utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de *Tukey*, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística comparado ao grupo controle e # indica diferença estatística com o grupo MLT/CP. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo.

No teste de nado forçado (figura 8), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para o uso da MLT a curto e longo prazo quando comparado ao grupo controle.

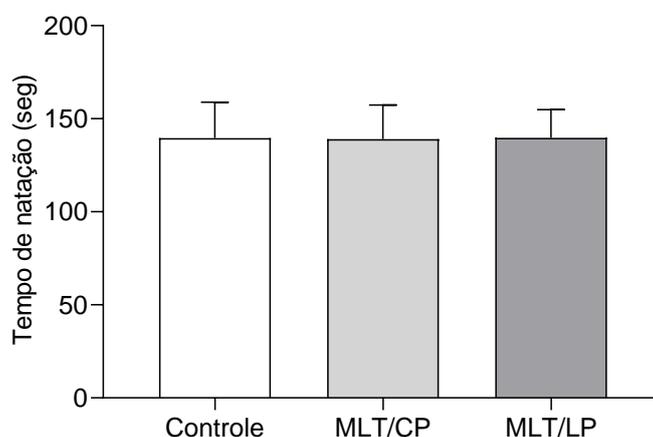


Figura 8 - Teste de nado forçado. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 12 a 15 animais por grupo e as comparações dentro os grupos foram feitas utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de *Tukey*, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística comparado ao grupo controle e # indica diferença estatística com o grupo MLT/CP. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo

No teste do labirinto de cruz elevada, o grupo MLT/LP teve mais entradas nos braços abertos indicando um comportamento menos ansioso quando comparado aos outros dois grupos (figura 9C). Entretanto, nas outras análises realizadas não houve diferença no comportamento dos animais entre os grupos experimentais.

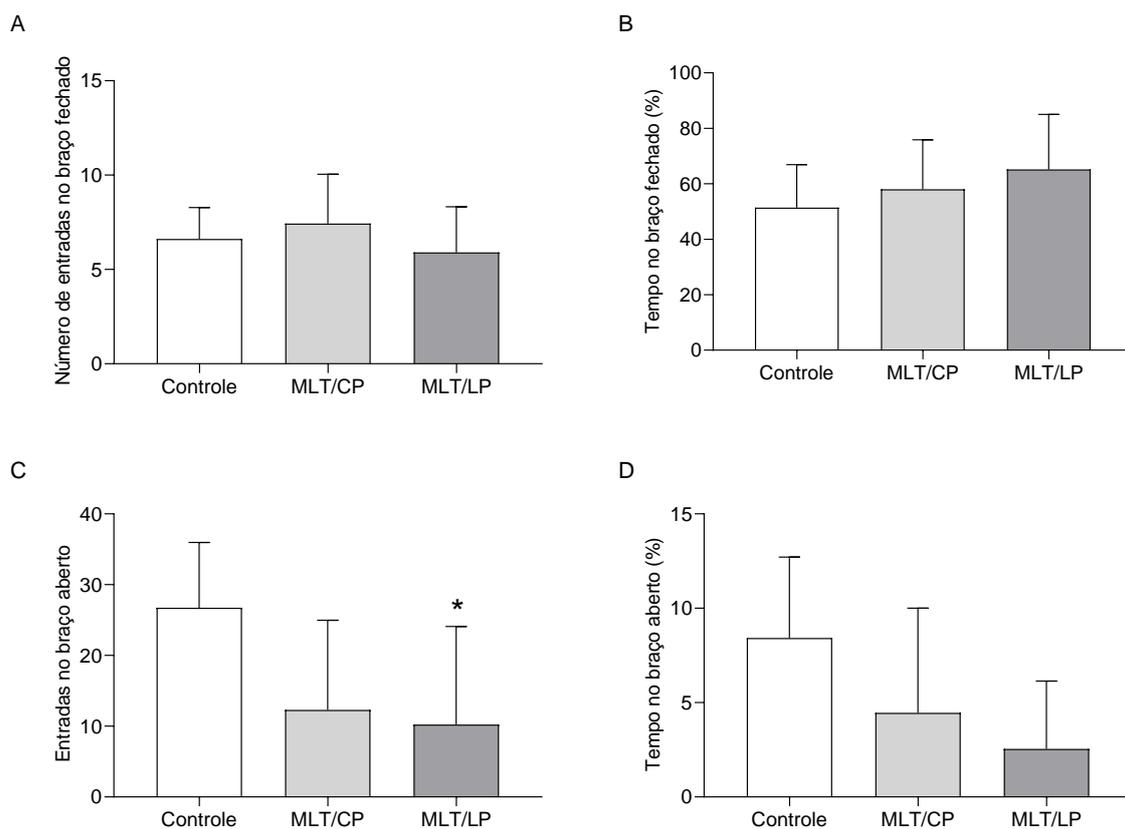


Figura 9- Teste do labirinto de cruz elevada. A) Avaliação de entrada nos braços abertos. B) avaliação de tempo de permanência nos braços abertos. C) avaliação de tempo e entrada nos braços fechados. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 12 a 15 animais por grupo e as comparações dentro os grupos foram feitas utilizando a análise de *Shapiro-Wilk* seguido de teste de *Levene*, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística comparado ao grupo controle.

Na figura 10 são apresentados os níveis de MDA nas estruturas cerebrais córtex frontal, córtex, cerebelo, hipocampo, estriado, hipotálamo, *nucleo accumbens* e amígdala. Foi observado uma diminuição nos níveis de MDA no grupo MLT/LP quando comparado ao grupo MLT/CP apenas no *nucleo accumbens*.

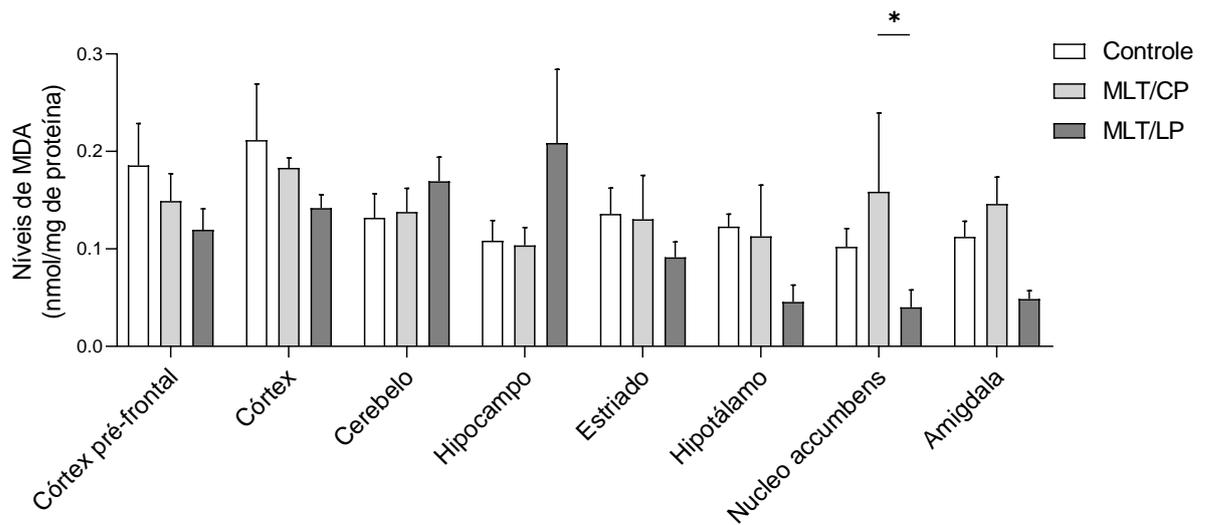


Figura 10 - Avaliação dos níveis de MDA, no córtex frontal, córtex, cerebelo, hipocampo, estriado, hipotálamo, núcleo accumbens e amígdala de ratos Wistar adultos após a tratamento com MLT. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 6 animais por grupo e as comparações utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística comparado ao grupo MLT/CP. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo

Quanto a carbonilação de proteínas (figura 11), no córtex frontal, foi observado que o grupo MLT/LP apresentou aumento dos níveis comparado aos grupos controle e MLT/CP. No córtex, houve aumento dos níveis de carbonilação de proteínas no grupo MLT/LP comparado ao grupo controle. No cerebelo ambos os grupos tratados apresentaram aumento nos níveis de carbonilação de proteínas comparados ao grupo controle. Na amígdala houve aumento dos níveis de carbonilação de proteínas no grupo MLT/CP quando comparado ao grupo controle e uma diminuição no grupo MLT/LP comparado ao grupo MLT/CP.

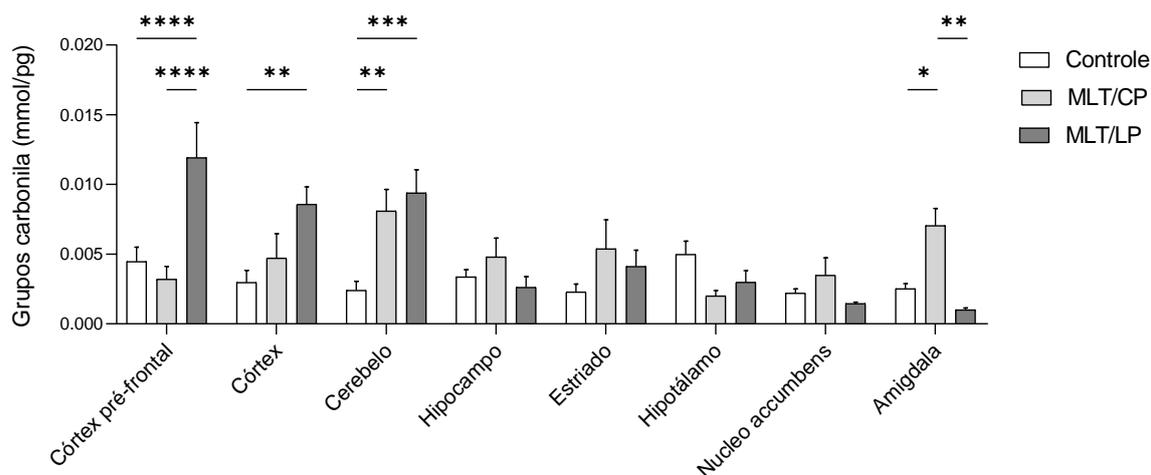


Figura 11 - Avaliação de carbonilação de proteínas nas estruturas cerebrais. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 6 animais por grupo e as comparações utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, considerando $p < 0,05$. * indica diferença estatística comparado ao grupo controle. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo

Não houve diferença significativa na atividade da MPO nas estruturas analisadas (figura 12).

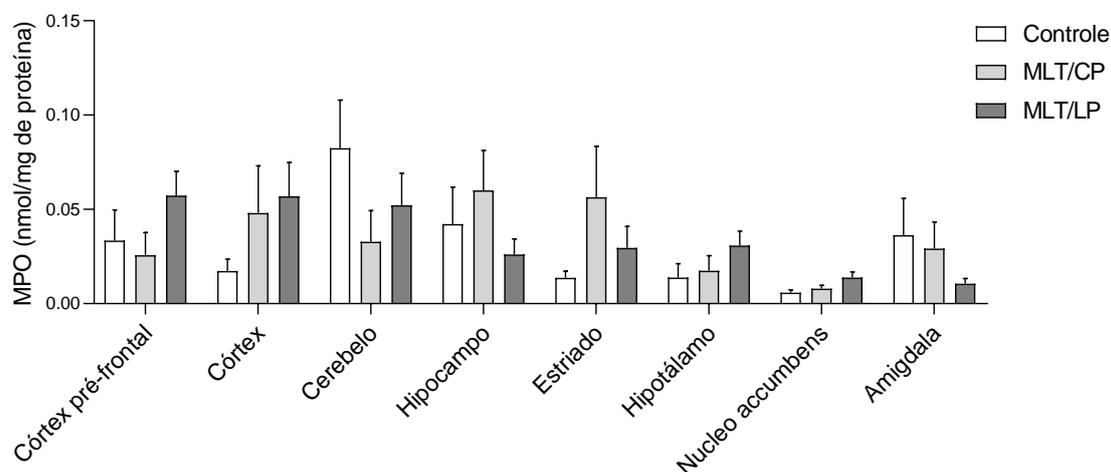


Figura 12 - Avaliação de MPO nas estruturas cerebrais. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 6 animais por grupo e as comparações utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de Tukey, considerando $p < 0,05$. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo.

Na figura 13 são demonstrados os níveis de nitrito/nitrato nas estruturas cerebrais. Houve aumento de nitrito/nitrato no córtex frontal do grupo de MLT/LP comparado ao curto prazo. No hipocampo houve aumento dos níveis de nitrito/nitrato no grupo MLT/LP comparado ao grupo controle. No estriado houve diminuição do

grupo MLT/LP comparado ao tratamento curto prazo e aumento no grupo MLT/CP comparado ao grupo controle. No *núcleo accumbens* houve aumento no grupo MLT/CP comparado ao grupo controle. Na amígdala os grupos tratados com MLT apresentaram aumento nos níveis de nitrito/nitrato comparado ao grupo controle. No entanto, o grupo MLT/LP apresentou uma diminuição comparado ao tratamento de curto prazo.

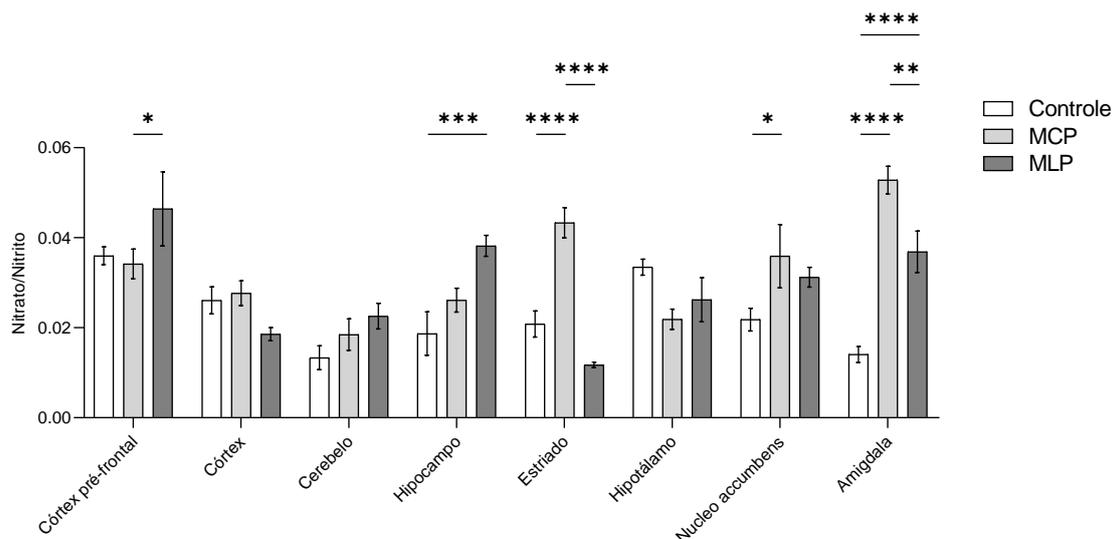


Figura 13- Avaliação dos níveis de nitrito/nitrato nas estruturas cerebrais. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 6 animais por grupo e as comparações utilizando a ANOVA de 2 vias, seguido do teste *post-hoc* de *Tukey*, considerando $p < 0,05$. MLT/CP: melatonina curto prazo; MLT/LP: melatonina longo prazo.

5 DISCUSSÃO

A MLT (N-acetil-5-metoxitamina), é um hormônio derivado do metabolismo do triptofano, sintetizado e secretado pela glândula pineal (Bonfont-Rousselot e Collin, 2010). Esse hormônio não apenas regula o ritmo circadiano e o sono através de seus receptores específicos, mas também atua eliminando radicais livres e como um potencial antioxidante (Johns e Platts, 2014; Han et al., 2017). O ritmo circadiano auxilia os organismos a sincronizar seu comportamento e fisiologia com a alteração diária de fases claras e escuras (Schmal et al., 2015).

A tendência é que a produção de MLT na pineal diminua com o avanço da idade. Segundo Gunata (2020) em humanos, a produção de MLT não apenas diminui no envelhecimento, mas também é reduzida em diversas doenças relacionadas à idade, incluindo a doença de Alzheimer e doença cardiovascular, além de mostrar efeito protetor em modelos experimentais de diversos distúrbios neurológicos (Ali, 2015; Wu, 2017; Lin, 2018).

O uso da MLT como fármaco em curtos períodos já é considerado seguro para algumas patologias (Andersen et al., 2016). No entanto, estudos avaliando os efeitos da suplementação de MLT em animais jovens saudáveis ainda são escassos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento prolongado de MLT em ratos jovens sobre parâmetros comportamentais de ansiedade, depressão, atividade locomotora, memória e aprendizado, bem como sobre parâmetros de dano oxidativo. O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais, onde não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Quando avaliado o parâmetro de *grooming*, os animais do grupo MLT/CP apresentaram menos movimentos de autolimpeza quando comparados ao grupo controle e grupo MLT/LP. Este mesmo teste foi utilizado para avaliar memória de habituação através de uma segunda sessão. Na sessão teste, houve redução significativa no número de cruzamentos no grupo controle e MLT com tratamento em longo prazo comparado com a sessão treino, conforme esperado para uma segunda exposição. No entanto, o grupo MLT/CP não apresentou diferença estatística entre as sessões.

Quando observados isoladamente, os parâmetros avaliados para o grupo MLT/CP sugerem alguma alteração em relação aos demais grupos. O parâmetro de *grooming* é considerado um índice de adaptação comportamental a uma situação de

estresse, sendo que a diminuição deste parâmetro já foi relacionada com comportamento ansioso (Ishihara, 2021). Além disso, segundo Prut e Belzung (2003) a ausência de diferença estatística entre as sessões treino e teste indicam prejuízo à memória de habituação. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que o teste de campo aberto é sensível ao ciclo claro-escuro e o ritmo circadiano podendo este ter sido afetado brevemente pela suplementação a curto prazo de MLT. Como estas alterações não foram observadas na suplementação a longo prazo, é possível que estes efeitos sejam transitórios e restritos a um possível período de adaptação em animais saudáveis.

Controversamente, diversos estudos mostram efeitos protetores da MLT em diferentes modelos animais de estresse e ansiedade (Liu, J. 2017; Han, 2017). Um estudo avaliou a administração de MLT em camundongos após um regime de suplementação diurno e noturno, em animais saudáveis ou expostos à radiação para aumentar sintomas ansiosos. Neste estudo, foram observadas alterações para o teste de campo aberto nos animais suplementados durante o dia, sugerindo que a administração de MLT neste regime perturbou a homeostase circadiana e causou uma condição de estresse tendo um potencial ansiogênico. No entanto, após a indução de ansiedade através da radiação, foi observado um efeito ansiolítico da MLT nos animais suplementados de forma crônica, com base em parâmetros comportamentais no teste de campo aberto (Haridas et al., 2012).

Para o grupo de curto prazo, foi observado um aumento de interação social, além disso, no teste do labirinto de cruz elevada, o grupo MLT longo prazo teve mais entradas nos braços abertos indicando um comportamento menos ansioso quando comparado aos outros dois grupos, sendo que nas outras análises realizadas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Em conjunto, não foram observadas diferenças importantes para os parâmetros comportamentais avaliados, tendo sido observadas poucas alterações.

Além dos seus efeitos comportamentais já demonstrados, a MLT é também eficaz na redução do estresse oxidativo em diversas circunstâncias. São diversos os mecanismos envolvidos nesta atividade, entre eles: a detoxificação direta de ERO e ERN, ou indireta através do estímulo da produção de enzimas antioxidantes enquanto suprimem a atividade das enzimas pró-oxidantes. Além destes efeitos, a MLT também é capaz de quelar metais de transição envolvidos nas reações de Fenton e Haber-

Weiss, e conseqüentemente reduzindo a formação do radical hidroxila, o qual é altamente tóxico (Reiter, 2014).

A MLT tem grande distribuição intracelular ocorrendo em altas concentrações principalmente nas mitocôndrias, o que provavelmente contribui com a sua capacidade de modular o estresse oxidativo e a apoptose celular. Evidências sugerem que a MLT pode ser classificada como um antioxidante direcionado à mitocôndria. Além de seus efeitos em doenças neurodegenerativas, a capacidade da MLT de prevenir danos oxidativos resultantes de outros processos patológicos já foi mostrada em modelos experimentais de isquemia, estudos de reperfusão (hipóxia/reoxigenação), acidente vascular cerebral e infartos (Lin, 2018).

Desta forma, a fim de compreender mais profundamente o efeito da suplementação de MLT a curto e longo prazo em ratos jovens saudáveis, os animais foram avaliados também sob parâmetros de dano oxidativo. Para tal, alguns parâmetros foram avaliados em tecidos cerebrais, sendo eles: córtex frontal, córtex, cerebelo, hipocampo, estriado, hipotálamo, *núcleo accumbens* e amígdala.

A enzima MPO foi utilizada como um parâmetro oxidativo. Ela está presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica, e tem papel fundamental na produção de ERO, onde catalisa a síntese de ácido hipocloroso (HOCL) a partir de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e íons cloreto (CL) (Hazen, 1997). Evidências sugerem que a presença de MPO no tecido cerebral é resultante de um distúrbio na barreira hematoencefálica (BHE), em consequência de condições inflamatórias que afetam o metabolismo lipídico e energético nos capilares devido à adaptação prejudicada às condições pró-oxidantes (Klebanoff, 2005; Baldissera, 2017; Goeritzer et al., 2020). No presente estudo, nenhum dos grupos apresentou aumento significativo em relação ao controle, o que sugere que não houve produção aumentada de HOCL e perturbação da integridade da BHE.

Os níveis de carbonil representam a geração do grupo carbonila, e foram utilizados como um marcador de oxidação de proteínas mediada por radicais livres, especialmente sobre os resíduos das cadeias laterais de aminoácidos (Levine, Garland et al. 1990). Neste estudo, foi observado um aumento significativo nos níveis de carbonil no córtex frontal, córtex e cerebelo em ambos os grupos MLT, sugerindo dano em proteínas nestes tecidos, o que não condiz com os achados que sugerem efeito protetor antioxidante da MLT. Uma vez que estes efeitos não foram observados

em todos os tecidos avaliados, outros parâmetros seriam relevantes para avaliar a extensão do dano observado bem como avaliar a sua causa.

Dados similares foram observados por Ishihara et al., (2021), que demonstraram aumento na oxidação em lipídios através dos níveis de TBARs e de dano em proteínas através dos níveis de carbonilação no tecido cardíaco de ratos após o tratamento com MLT em condições basais. No entanto, quando expostos a um protocolo exaustivo de exercícios que ocasionaram a produção de estresse oxidativo leve no tecido cardíaco dos animais, a MLT induziu respostas antioxidantes que foram capazes de reequilibrar o *status redox* neste tecido, observado pela normalização dos níveis de TBARs e carbonilação, entre outros parâmetros oxidantes. Assim como no estudo de Haridas et al. (2012), os dados novamente sugerem que o efeito antioxidante da MLT pode estar condicionado ao contexto metabólico em que ocorre a suplementação.

O MDA é um produto da peroxidação lipídica que contribui para a reação inflamatória por ativação de citocinas pró-inflamatórias. A perda de seletividade na troca iônica das membranas celulares provoca a liberação do conteúdo de organelas e conseqüentemente a formação de produtos citotóxicos, como o MDA (Spiteller, 2001). Desta forma os níveis de MDA foram utilizados para quantificar dano oxidativo em lipídeos. Para este parâmetro, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tecidos avaliados com exceção de um pequeno aumento no *núcleo accumbens* para o grupo MLT/CP. Este aumento pode estar relacionado aos efeitos transitórios também observados no teste de campo aberto, uma vez que foram restritos ao grupo curto prazo. Evidências mostram que neurônios GABAérgicos localizados no *núcleo accumbens* estão relacionados a indução do sono e ao efeito de vigília induzido pela suplementação de cafeína (Luppi, Forti, 2019). Desta forma, é possível que a perturbação no ritmo circadiano sugerida no presente estudo para o teste de campo aberto para este grupo, esteja relacionada com o dano oxidativo observado no *núcleo accumbens*. Em contraste, dados anteriores sugerem que a MLT tanto endógena quanto suplementada, parece reduzir níveis de MDA em diferentes condições (Sewerynek et al., 1995; Reiter et al., 2003; Piechota et al., 2010).

Os níveis de nitrito/nitrato foram utilizados para avaliar o conteúdo de ERN através da produção de óxido nítrico. Foi observado um aumento nos níveis de nitrito em alguns tecidos em ambos os tratamentos. Tais resultados contrastam com dados da literatura que mostram que a MLT e seu metabólito AMK são capazes de inibir a

atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Zhang e Zhang, 2014). O NO resultante da ativação da iNOS possui em situações fisiológicas ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. Este efeito é resultante da reação do NO com metais presentes nas enzimas da célula alvo. No entanto, em excesso e associado a ERO, a produção de NO pode prejudicar tecidos e células adjacentes, principalmente em situações de estresse oxidativo. Desta forma, a diminuição da atividade da iNOS tem se mostrado protetor em diversas patologias (Dusse et al., 2003).

Um estudo clínico que avaliou pacientes com doença de Parkinson, observou que a intervenção com suplementação diária de 50 mg de MLT, por três meses resultou em uma redução significativa dos marcadores de estresse oxidativo, retratados pelo aumento significativo da atividade da CAT e atividade da cadeia respiratória. Tais dados corroboram com estudos anteriores que mostram que a MLT aumenta os níveis de glutathiona reduzida (Okelly et al., 1999) diminui os níveis de MDA e estimula a expressão gênica de importantes enzimas antioxidantes, como superóxido, dismutase, complexo I e catalase em modelos animais de doença de Parkinson (Cetin e Dincer, 2007; Beriwal, et al., 2019).

Contrastando com os resultados do presente trabalho, as evidências sugerem um efeito positivo enfatizado da atividade antioxidante ocasionado pela suplementação de MLT. No estudo aqui apresentado, embora não sejam tão acentuados, alguns efeitos oxidantes foram observados após a suplementação de MLT. Sugerindo, que talvez, na presença de dano a MLT apresenta efeito melhor, pois no presente estudo o animal não foi submetido a qualquer modelo patológico. Interessantemente, estes dados corroboram com algumas evidências que sugerem uma atividade da MLT dependente do microambiente (Haridas et al., 2012; Wang et al., 2019; Ishihara et al., 2021).

Um estudo demonstrou que a MLT pode exercer um efeito duplo sobre a viabilidade de células granulares de cerebelo em cultura dependendo do contexto em que essas células se encontram. Na presença de lipopolissacarídeo (LPS) a MLT protege as células inibindo a ativação da via do NF- κ B. No entanto, a incubação apenas com MLT gera um efeito citotóxico que resulta em morte celular. Este resultado pode ser comparado ao efeito da MLT sobre células cancerosas em que se observa um aumento de ERO e moléculas pró-apoptóticas (Sainz et al., 2003). Além disso, estes dados corroboram com os dados observados por Ishihara et al., (2021) e

Haridas, Kumar e Manda (2012) que sugerem a importância do microambiente para a atividade da MLT.

Wang et al., (2019) investigaram a influência da MLT na produção de ERO geradas a partir de autoxidação de polifenol na presença de cobre. Os autores demonstraram que a MLT paradoxalmente aumentou a formação de ERO em um sistema redox que continha baixas concentrações de cobre e quercetina, devido a redução do íon cúprico pela MLT. Neste estudo foi observado que a adição de DNA a este sistema inibiu a produção de ERO uma vez que o DNA interagiu com o cobre e inibindo a sua redução pela MLT. Por outro lado, quando adicionada a um sistema contendo altas concentrações de cobre e quercetina, a MLT provocou uma diminuição na formação de radicais hidroxil, conforme sugerem outros estudos, impedindo dano ao DNA.

O tratamento com MLT em longo prazo parece ser não exercer efeitos prejudiciais, sendo uma alternativa interessante a ser usada durante o período de crescimento e neurodesenvolvimento, já que não apresentou efeitos adversos na memória dos animais estudados. Em adição, é possível observar um melhor desempenho dos animais submetidos ao tratamento por longo prazo sobre a interação social aliado a um menor comportamento do tipo ansioso.

6. CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que os roedores não foram afetados com uso de MLT em curto e longo prazo, o que indica que talvez possa ser usada com segurança em períodos maiores dos que os recomendados na infância sem comprometimentos comportamentais na vida adulta. De fato, não houve efeitos adversos na cognição dos animais. Porém, alguns efeitos oxidantes foram observados após a suplementação de MLT. A hipótese é de que na presença de dano a MLT apresente efeito melhor, enquanto que no presente estudo o animal não foi submetido a modelo patológico, longo sem danos nas estruturas avaliadas, sugerindo uma atividade da MLT dependente do microambiente que

Mais estudos sobre o fármaco devem ser feitos não só compreendendo os efeitos comportamentais, mas também buscando encontrar se existe diferença nos parâmetros neuroquímicos na vida adulta com o uso da MLT a longo prazo durante o período de neurodesenvolvimento

REFERÊNCIAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;302(2-3):141-5.

Ali T, Kim M. Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI3/Akt/GSk3 β pathway in the mouse hippocampus. *Journal of Pineal Research.* 2015;59(1):47-59.

Alshammari J, Monnier P, Daniel RT, Sandu K. Clival chordoma with an atypical presentation: A case report. *Journal of Medical Case Reports.* 2012;6(410): Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;3:2279-312.

Alshammari JP, Monnier RT. Daniel and K. Sandu (2012). Clival chordoma with an atypical presentation: A case report. *Journal of Medical Case Reports.* 2012;6:410.
Amaral FGD, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62(4):472-9.

Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. Pharmacokinetics of Melatonin: the missing link in clinical efficacy?. *Clinical Pharmacokinetics.* 2016;55(9):1027-30.

Baldissera MD, Souza CF, Santos RCV, Baldisserotto B. Blood-brain barrier breakdown and myeloperoxidase activity in silver catfish experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Fish Diseases.* 2017;41(2):209-13.

Beriwal N, Namgyal T, Sangay P, Quraan AMA. Role of immune-pineal axis in neurodegenerative diseases, unraveling novel hybrid dark hormone therapies. *Heliyon.* 2019;5:1190-96.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, [S.L.], v. 278, n. 1, p. 55-67, nov. 2010.

Bruce J, et al. Sequential Cerebrospinal Fluid and Plasma Sampling in Humans: 24-Hour Melatonin Measurements in Normal Subjects and after Peripheral Sympathectomy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991;72:819–23.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(2):309-16.

Cetin F, Dincer S. The Effect of Intrahippocampal Beta Amyloid (1-42) Peptide Injection on Oxidant and Antioxidant Status in Rat Brain. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 1100, n. 1, p. 510-517, 1 abr. 2007.

Chuffa GGA. et al. Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 1–13, 6 fev. 2015.

Cipolla-Neto J, Gaspar do Amaral F. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. 2018.

Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, v. 61, n. 2–3, p. 77–84, 1 abr. 2015.

Dayem, AA et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, p. 1–21, 2017.

De Young LM et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents." *Agents Actions*. 1989;26(3-4):335-341.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989;26(3-4):335-41.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;121(1):66-72.

Detke, MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants." *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;121(1):66-72.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

Fernández-Gil B. et al. Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity. 2017.

Fischer, JC et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985;153(1):23-36.

Friedrich J. *Molecular Sciences Aging, Melatonin, and the Pro-and Anti-Inflammatory Networks* Rüdiger Hardeland. 2019.

Goeritzer, M et al. Myeloperoxidase and Septic Conditions Disrupt Sphingolipid Homeostasis in Murine Brain Capillaries In Vivo and Immortalized Human Brain Endothelial Cells In Vitro. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 1143, 9 fev. 2020.

Gunata M, Parlakpınar H, Acet H. A. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. *Revue Neurologique*, v. 176, n. 3, p. 148–165, 1 mar. 2020.

Han, QH et al. Effects of Melatonin on Anti-oxidative Systems and Photosystem II in Cold-Stressed Rice Seedlings. *Frontiers In Plant Science*, [S.L.], p. 1-8, 11 maio 2017.

Haridas S, Kumar M, Manda K. Chronic melatonin administration mitigates behavioral dysfunction induced by γ -irradiation. *Hormones And Behavior*, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 621-627, nov. 2012.

Hazen SL, Heinecke JW. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest*,99(9):2075-81.

Ishihara, R et al. Melatonin improves the antioxidant capacity in cardiac tissue of Wistar rats after exhaustive exercise. *Free Radical Research*, [S.L.], v. 55, n. 7, p. 677-692, 24 jun. 2021.

Johns JR, Platt JA. Theoretical insight into the antioxidant properties of melatonin and derivatives. *Org. Biomol. Chem.*, [S.L.], v. 12, n. 39, p. 7820-7827, 2014.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal Of Leukocyte Biology*, [S.L.], v. 77, n. 5, p. 598-625, 2 fev. 2005. Oxford University Press (OUP).

Lansink, MO et al. Melatonin reduces changes to small intestinal microvasculature during systemic inflammation. *Journal of Surgical Research*, v. 211, p. 114–125, 1 maio 2017.

Levine, RL et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:64-78.

Li N, Xia T, Nel A. E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radical Biology and Medicine* Pergamon, , 1 maio 2008.

Lin, Y et al. Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating

endoplasmic reticulum stress. *International Journal Of Molecular Medicine*, [S.L.], 30 mar. 2018.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):153-8.

Liu J, Clough SJ, Dubocovich ML. Role of the MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mediating depressive-and anxiety-like behaviors in C3H/HeN mice. *Genes, Brain and Behavior*, v. 16, p. 546–553, 2017.

Lopes Lima, M et al. Evaluation of antileishmanial potential of the antidepressant escitalopram in *Leishmania infantum*. 2021.

Luo C et al. The multiple protective roles and molecular mechanisms of melatonin and its precursor N-acetylserotonin in targeting brain injury and liver damage and in maintaining bone health. *Free Radic Biol Med*. 2019;130:215-33.

Luppi PH, Fort P. Sleep–wake physiology. *Clinical Neurophysiology: Basis and Technical Aspects*, [S.L.], p. 359-370, 2019

Manchia, M et al. Melatonin and Depression: A Translational Perspective From Animal Models to Clinical Studies. *Frontiers in Psychiatry* | www.frontiersin.org, v. 1, p. 638981, 2021.

Melhuish Beaupre LM, Brown GM, Gonçalves VF, Kennedy JL. Melatonin's neuroprotective role in mitochondria and its potential as a biomarker in aging, cognition and psychiatric disorders. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1):339.

Miranda-Riestra A et al. Melatonin: a neurotrophic factor? *Molecules*. 2022;27(22):7742.

Morera-Fumero AL, Abreu-Gonzalez P. Role of Melatonin in Schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci*, v. 14, p. 9037–9050, 2013.

Mozaffarl S, Abdollahi M. "Melatonin, a promising supplement in inflammatory bowel disease: a comprehensive review of evidences." *Current pharmaceutical design* 17 38 (2011): 4372-8.

O'Kelly, C et al. The Production of Scoliosis After Pinealectomy in Young Chickens, Rats, and Hamsters. *Spine*, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 35-43, jan. 1999.

Pariante R. et al. Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. v. 80, p. 985–998, 2017.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14(3):149-67.

Piechota, A, Lipińska S, Szemraj J, Gorąca A. Long-term melatonin administration enhances the antioxidant potential of human plasma maintained after discontinuation of the treatment. *General Physiology And Biophysics*, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 144-150, 2010.

Popović, B et al. The influence of ageing on the extrapineal melatonin synthetic pathway. *Experimental Gerontology*, v. 110, p. 151–157, 1 set. 2018.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266(5604):730-2.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal Of Pharmacology*, [S.L.], v. 463, n. 1-3, p. 3-33, fev. 2003.

Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Current medicinal chemistry*, v. 21, n. 32, p. 3662–72, 2014.

Reiter RJ et al. Advances in Characterizing Recently-Identified Molecular Actions of Melatonin: Clinical Implications. *Approaching Complex Diseases*. 2020;2:301-41.

Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: Exceeding expectations. *Physiology*, v. 29, n. 5, p. 325–333, 1 set. 2014.

Reiter RJ. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. *Endocrine Reviews*, v. 12, n. 2, p. 151–180, 1 maio 1991.

Reiter, RJ et al. molecules Mitochondria: Central Organelles for Melatonin s Antioxidant and Anti-Aging Actions. 2018.

Rosales-Corral AS et al. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res.* 2012;52(2):167-202.

Rustin P et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994;228(1):35-51.

Schmal C, Myung J, Herzel H, Bordyugov G. A Theoretical Study on Seasonality. *Frontiers In Neurology*, v. 6, n. 9, p. 4-8, 7 maio 2015.

Sewerynek, E et al. Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *European Journal Of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, [S.L.], v. 293, n. 4, p. 327-334, dez. 1995.

Spiteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Experimental Gerontology*, [S.L.], v. 36, n. 9, p. 1425-1457, set. 2001. Elsevier BV.

Tähkämö L, Partonen T, Pesonen A.-K. *Chronobiology International The Journal of Biological and Medical Rhythm Research* Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. 2018.

Teng YC et al. Melatonin Ameliorates Arsenite-Induced Neurotoxicity: Involvement of Autophagy and Mitochondria. *Mol Neurobiol.* 2015;52(2):1015-22.

Verma AK, Singh S, Rizvi SI. Redox homeostasis in a rodent model of circadian

disruption: Effect of melatonin supplementation. *Gen Comp Endocrinol.* 2019;28097-103.

Vianna, MR et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.).* 2000;7(5):333-40.

Waldhauser F et al. Alterations in Nocturnal Serum Melatonin Levels In Humans With Growth and Aging. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 1988;66(3):648–52.

Wang, J et al. Antioxidant and Pro-Oxidant Activities of Melatonin in the Presence of Copper and Polyphenols In Vitro and In Vivo. *Cells,* 2019(8):903.

Won E, Na K-S, Kim Y.-K. Associations between Melatonin, Neuroinflammation, and Brain Alterations in Depression. 2021.

Wongprayoon P, Govitrapong P. Melatonin Receptor as a Drug Target for Neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol.* 2021;14(2):150-164.

Wu, H-J et al. Neuroprotective Mechanisms of Melatonin in Hemorrhagic Stroke. *Cellular And Molecular Neurobiology.* 2017;37(7):1173-85..

Yang, J et al. Toxic effect of titanium dioxide nanoparticles on corneas in vitro and in vivo . *Aging.* 2021;13(4):5020–33.

Zhang H-M, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research.* 2014;57(2):131-46..

Zimmermann, RC. et al. Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1993;76(5):1160–4.

ANEXO

Anexo A: Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no uso de Animais



Reitoria

Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 10 de abril de 2023
Registro na CEUA Nº 19.021.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Fabricia Cardoso Petronilho

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Efeito do uso da melatonina a curto e longo prazo em ratos jovens sobre o comportamento de animais adultos”, registrada com o nº 19.021.4.01.IV, sob a responsabilidade de Fabricia Cardoso Petronilho - que envolve a manutenção ou utilização de modelos 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 Federal 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 **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 07 de outubro de 2019.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Anna Paula Piovezan
Coordenadora da Comissão

Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 10 de abril de 2023

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Efeito do uso da melatonina a curto e longo prazo em ratos jovens sobre o comportamento de animais adultos”, registrada com o nº 19.021.4.01.IV, sob a responsabilidade de Fabricia Cardoso Petronilho - que envolve a manutenção ou utilização de modelos 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 Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 07 de outubro de 2019.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/01/2019 Final: 30/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus, ratos Wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	150g a 200g / 29 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina (UFSC)



Anna Paula Piovezan
Coordenadora da Comissão

ANEXO B: ATA DE APROVAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 410

Com início às 9 (nove) horas do dia 13 (treze) de abril de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 004/Bloco XXI A o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **TAIANE SILVEIRA DE LIMAS**, sob a orientação da **Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso**, intitulada **“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA A CURTO E LONGO PRAZO SOB PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DE RATOS JOVENS”**.

A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Cristiane Damiani Tomasi (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 11h (onze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 13 (treze) de abril de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Assistente Administrativo