

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

**LEONARDO SPILLERE**

**EFEITO DA MELATONINA NA MEMÓRIA E INFLAMAÇÃO  
EM UM MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO PELO  
PEPTÍDEO A $\beta$  1-42**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde

Orientador: Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Josiane  
Budni

**CRICIÚMA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S756e Spillere, Leonardo.

Efeito da melatonina na memória e inflamação em um modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$  1-42 / Leonardo Spillere ; orientadora : Josiane Budni. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

60 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Melatonina – Uso terapêutico. 2. Alzheimer, Doença de – Tratamento. 3. Demência. 4. Memória. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1

## Folha de aprovação



Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver  
e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de  
Neurociências - NEUROLAB - do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde - PPGCS.



Aos meus pais, Luiz Carlos Spillere e Miriam Spillere, e minha namorada Juliana. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser meu refúgio e fortaleza e permitir-me concretizar este sonho;

À professora Dr<sup>a</sup> Josiane Budni, pelo apoio fundamental na realização e orientação deste trabalho;

Aos integrantes do Laboratório de Neurociências, em especial Michele, Tatiani, Francielle, Ricardo, Arlindo, Afonso, Aline, Hemily, Eduardo, Eduarda, Gustavo, Yan, Deivid e Heron. Sem vocês nada disso seria possível;

Aos meus pais, Luiz Carlos Spillere e Miriam Spillere, sem o amor de vocês, não teria significado algum tudo isso;

Em especial, à minha namorada, Juliana Justino dos Santos, pela constante presença, por ser minha inspiradora e grande incentivadora neste momento de minha vida. Juli, você é o amor da minha vida!;

Aos meus amigos e parentes, que contribuíram de maneira indireta na realização desse trabalho;

E, finalmente, a todos que tornaram este estudo possível e contribuíram de alguma forma. Muito obrigado.



*“Qualquer estrangeiro pode me paquerar, com exceção do alemão, aquele tal de Alzheimer”  
(Zinah Alexandrino)*



## RESUMO

Estudos mostram uma estreita relação entre níveis de melatonina e pacientes com doença de Alzheimer (DA). Quanto maior a progressão da DA menor os níveis deste hormônio. Além disso, a deficiência de melatonina pode estar associada à inflamação crônica na DA. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da melatonina sobre a neuroinflamação presente na DA. Foram utilizados 40 camundongos Balb/c adultos machos, na qual, para induzir características da DA, foi aplicado o peptídeo  $\beta$ -amilóide 1-42 ( $A\beta$ 1-42) no ventrículo lateral em um volume de 4  $\mu$ L unilateralmente. O grupo controle recebeu volume idêntico de fluido cerebrospinal artificial (ACSF), formando-se quatro grupos (peptídeo+água; peptídeo+melatonina; ACSF+água; ACSF+melatonina) com 10 camundongos em cada grupo. Após 24h à cirurgia, foi iniciado o tratamento com melatonina (10mg/kg) ou água por via oral durante 15 dias. A partir do 14<sup>o</sup> dia os animais foram submetidos ao teste comportamental no labirinto radial e ao final foram eutanasiados. O córtex total e hipocampo foram retirados para análises bioquímicas. As citocinas antiinflamatórias (IL-10 e IL-4) foram diminuídas no grupo peptídeo+água, entretanto nos grupos associados com melatonina, houve restauração dos níveis, aproximando-os ao grupo controle. Além disso, o tratamento com melatonina diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  tanto no hipocampo quanto no soro, assim como TNF- $\alpha$ . No teste comportamental do labirinto radial, a melatonina mostrou-se neuroprotetora, revertendo o dano cognitivo induzido pelo peptídeo  $A\beta$ 1-42, comprovado pela redução em todos os parâmetros avaliados. Os resultados sugerem que a melatonina pode ser uma alternativa ao tratamento na DA, pois contribui para atenuar a neuroinflamação e a progressão da doença.

**Palavras chave:** Melatonina; neuroinflamação; doença de Alzheimer; memória espacial.



## ABSTRACT

Studies have shown a close relationship between melatonin levels and patients with Alzheimer's disease (AD). The higher the progression of AD minor levels of this hormone. Furthermore, melatonin deficiency may be associated with chronic inflammation in AD. Thus, the present study was to evaluate the effect of melatonin on neuroinflammation present in AD. We used 40 Balb/c mice adults, in which to induce AD characteristics, it was applied  $\beta$ -amyloid 1-42 peptide (A $\beta$ 1-42) in the lateral ventricle in a volume of 4  $\mu$ L unilaterally. The control group received the same volume of artificial cerebrospinal fluid (ACSF), forming four groups (peptide + water; peptide + melatonin; ACSF + water; + melatonin ACSF) with 10 mice in each group. 24h after the surgery, treatment was initiated with melatonin (10mg / kg) or water orally for 15 days. From the 14th day the animals were subjected to behavioral testing on radial maze and the end were euthanized. The total cortex and hippocampus were removed for biochemical analysis. The anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-4) were decreased in peptide + water group, however the groups associated with melatonin, there was restoration of levels, bringing them closer to the control group. Furthermore, melatonin treatment decreased the IL-1 $\beta$  levels in both the hippocampus and in serum, as well as TNF- $\alpha$ . In the behavioral test radial maze, melatonin proved to be neuroprotective, reversing the cognitive impairment induced by A $\beta$ 1-42 peptide, evidenced by the reduction in all parameters evaluated. The results suggest that melatonin might be an alternative to treatment in AD, it contributes to attenuate neuroinflammation and disease progression.

**Keywords:** Melatonin; neuroinflammation; Alzheimer's disease; spatial memory.





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A $\beta$	Beta-amiloide
ACSF	Fluido cerebrospinal artificial
APP	Proteína precursora amilóide
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
DA	Doença de Alzheimer
FDA	Food and Drug Administration
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
IACHes	Inibidores de acetilcolinesterase
ICV	Intracerebroventricular
IL	Interleucina
LTP	Potencial de longa duração
NFTs	Emaranhados neurofibrilares intracelular
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NMDA	N-metil-D-aspartato
PP2-A	Proteínafosfatase do tipo 2A
SNC	Sistema nervoso central
TLR	Receptores Toll-like
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 Doença de Alzheimer .....	23
1.2 Neuroinflamação na DA.....	24
1.3 Tratamento atual para a DA .....	26
1.4 Melatonina e a DA .....	27
1.5 Justificativa .....	29
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivos gerais.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
3.1 Animais .....	31
3.2 Modelo animal de demência.....	31
3.3 Protocolo de tratamento .....	31
3.4 Análise comportamental.....	32
3.5 Análise imunológica das amostras biológicas.....	33
3.6 Análise estatística .....	33
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Alzheimer

Demência é caracterizada pela perda ou redução progressiva das capacidades cognitivas, com alta prevalência na população mundial. Este número elevado foi estimado em aproximadamente 36 milhões de casos no ano de 2013 e está projetado para dobrar a cada 20 anos (Cumming and Brodtmann 2010). Diante disso, o custo financeiro a nível global para tratamento das demências foi superior a U\$ 600 bilhões de dólares em 2010, revelando um alto fator de impacto sobre os gastos públicos em saúde (Alzheimer Association, 2015).

A demência é um termo geral para caracterizar várias doenças neurodegenerativas, na qual a doença de Alzheimer (DA) apresenta a maior prevalência em pacientes acima de 60 anos, com 40% dos casos. Entretanto o envelhecimento é um grande fator de risco para o desenvolvimento na DA e com isso, a prevalência aumenta ainda mais conforme o avanço na idade desses pacientes (Fiest, Roberts et al. 2016).

A DA é caracterizada como uma patologia neurodegenerativa devido à morte neuronal progressiva e irreversível, que afeta principalmente os neurônios da região do córtex frontal e hipocampo, ambos fundamentais na formação da memória (Newman, Musgrave et al. 2007). Após a morte neuronal, os sintomas iniciais apresentados pelos pacientes são: lapso na memória recente, perda do senso de direção e mudança de comportamento. No entanto, antes mesmo da manifestação dos primeiros sintomas a doença já se iniciou há anos, dificultando o diagnóstico precoce fundamentado em manifestações clínicas e confirmado por meio de exames neurológicos, testes neuropsicológicos e neuroimagem.

A expectativa de vida dos pacientes após confirmação do diagnóstico é aproximadamente nove anos (Tedeschi, Cirillo et al. 2008). A susceptibilidade ao desenvolvimento desta patologia é resultado de fatores ambientais e genéticos que interagem durante a vida do paciente. Os fatores de risco relacionados à doença envolvem: inflamação sistêmica, obesidade (Heneka, Carson et al. 2015), baixa escolaridade (Noroozian, Shakiba et al. 2014), sexo feminino (Kojima, Taniguchi et al. 2016), traumatismo craniano (Faden and Loane 2015), depressão (Reus, Titus et al. 2016), diabetes mellitus (Rani, Deshmukh et al. 2016) e insônia (Busche, Kekus et al. 2016). Contudo, o principal

fator de risco é o envelhecimento sendo que sua incidência aumenta conforme a idade (Fiest, Roberts et al. 2016).

As principais características histopatológicas da doença foram descritas por Alois Alzheimer e contemplam dois principais marcadores, sendo o primeiro composto por placas senis extracelulares insolúveis, formadas por agregados de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) estes peptídeos são constituídos de 39 a 43 resíduos de aminoácidos. Porém, os principais tamanhos de peptídeos encontrados são de 40 resíduos de aminoácidos ( $A\beta$ -40) com aproximadamente 90% dos casos e  $A\beta$ -42 com apenas 10% de formação, sendo este mais propenso a formar placas senis extracelulares (Verdile, Fuller et al. 2004). O peptídeo  $A\beta$  é produzido a partir da clivagem de seu precursor, a proteína precursora amilóide (APP), por ação das enzimas  $\beta$  e  $\gamma$  secretase. Esta é a chamada via amiloidogênica, que está mais ativa na DA. No entanto, a APP também é clivada por  $\alpha$  e  $\gamma$  secretase formando um peptídeo solúvel que não é capaz de formar a placa senil, constituindo a via não-amiloidogênica (Haass and Selkoe 2007).

A segunda característica fisiopatológica da DA é representada pelos emaranhados neurofibrilares (NFTs) intracelulares compostos pela proteína tau hiperfosforilada. A proteína tau quando hiperfosforilada não consegue ligar-se aos microtúbulos e promover a estabilidade do citoesqueleto neuronal. Desta forma, desestabiliza os microtúbulos induzindo a morte do neurônio (Iqbal, Alonso Adel et al. 2005).

Tanto os agregados do peptídeo  $A\beta$  quanto os NFTs são fatores precipitantes de múltiplas vias neurotóxicas como excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo, apoptose, depletação energética, alterações nos fatores neurotróficos e neuroinflamação. Estes processos fisiopatológicos estão presentes na DA desencadeando atrofia e morte neuronal e consequente sintomatologia da DA (Cárdenas-Aguayo 2014).

## 1.2 Neuroinflamação na DA

A inflamação persistente, principalmente de baixo grau e progressiva é observada na grande maioria das doenças neurodegenerativas, com diferença nas vias e células afetadas (Lyman, Lloyd et al. 2014). As principais características da neuroinflamação na DA incluem ativação da microglia, liberação de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, presença de proteínas de fase aguda e recrutamento de linfócitos (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz 2012). Marcadores inflamatórios estão presentes tanto no líquido quanto no sangue periférico de pacientes com DA. Uma metanálise conduzida por (Swardfager,

Lanctot et al. 2010) encontrou que os níveis das citocinas IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-18 estavam aumentados. Esse processo inflamatório pode ser desencadeado principalmente pela presença do peptídeo A $\beta$ , que tem a capacidade de ativar o sistema imune (Bornemann, Wiederhold et al. 2001, Minter, Taylor et al. 2016) destacando-se a microglia que reconhece o peptídeo através dos seus receptores *Toll-like* (TLR-2, TLR-4 e TLR-6) (Solito and Sastre 2012, Gambuzza, Sofo et al. 2014). A via de sinalização passa pela ativação de receptores intracelulares (NLRP3, conhecido com inflamassoma) e caspases, ocorrendo então à liberação de citocinas (Tan, Yu et al. 2013, Sollberger, Strittmatter et al. 2014). Evidências de que o peptídeo A $\beta$  estimula o sistema imune são encontradas em estudos com modelos animais da DA com ênfase na ativação da micróglia (Gold and El Khoury 2015). Com isso, a atividade inflamatória tem sido relacionada com a neurodegeneração.

Em particular, a injeção intra-hipocampal do peptídeo A $\beta$ 1-42 causa mobilização e ativação da microglia acompanhada de aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias tais como, TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (McLarnon 2014). Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias têm a capacidade de aumentar a síntese de APP e fosforilação da proteína tau, desta forma, amplificando o sinal inflamatório e sustentando um ciclo vicioso (Lyman, Lloyd et al. 2014). Assim, esse sinal amplificado leva a várias alterações no sistema nervoso central (SNC). Especificamente, a IL-1 $\beta$  tem a capacidade de suprimir o potencial de longa duração (LTP) no hipocampo, por meio da supressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que está envolvido na plasticidade sináptica e memória. Em experimento avaliando a memória espacial de camundongos pelo teste do labirinto aquático de Morris a injeção de IL-1 $\beta$  bloqueou a aquisição do aprendizado (Gibertini, Newton et al. 1995). Vale salientar, que IL-1 $\beta$  em baixas concentrações é essencial para LTP, já em altas concentrações torna-se prejudicial. Além disso, este aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  é deletério para a fagocitose do peptídeo A $\beta$  pela micróglia, levando ao aumento das concentrações de cálcio em neurônios, causando disfunção neural e morte (Tong, Prieto et al. 2012). Também a IL-1 $\beta$  em níveis elevados atua facilitando a fosforilação da proteína tau (Sheng, Jones et al. 2001), assim como aumenta a produção e atividade de acetilcolinesterase, em consequência diminui as concentrações de acetilcolina (Li, Liu et al. 2000).

Outra citocina importante encontrada em níveis aumentados na DA é o TNF-  $\alpha$ . Esta citocina em altas concentrações pode promover apoptose, toxicidade neural pelo aumento do glutamato e alteração do

potencial de membrana neural, conduzindo um desequilíbrio nas concentrações de cálcio intracelular (Li, Tan et al. 2014). Diante deste panorama inflamatório, o papel do peptídeo beta amilóide é fundamental para desencadear um ciclo vicioso, promovendo a liberação de marcadores pró-inflamatórios, que por sua vez amplificam o dano ao SNC. Por esta razão, evidências sugerem que reduzindo a neuroinflamação é possível neutralizar os danos ao SNC (Medeiros, Prediger et al. 2007, McAlpine, Lee et al. 2009, Kiyota, Okuyama et al. 2010, Bachstetter, Norris et al. 2012).

Segundo Rubio Perez e Morillas Ruiz (2012), o papel da microglia pode ser benéfico na DA, uma vez que sua ativação pode reduzir o acúmulo do peptídeo A $\beta$ , por meio do aumento da fagocitose, depuração e degradação do mesmo. Também ocorre liberação de fatores solúveis, tais como fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e outras citocinas (IL-4 e IL-10). A IL-4 pode ter ações protetoras como inibir a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (Hart, Cooper et al. 1991, Levings and Schrader 1999). Consequentemente, esta citocina pode reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico. A IL-10 é uma das principais representantes, tendo um papel importante na homeostase neural e sobrevivência celular. Assim como a IL-4, também tem a capacidade de diminuir a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 agindo sobre seus próprios receptores presentes na superfície celular. Uma meta-análise sugeriu que um polimorfismo no gene IL-10 seria um fator de risco para o desenvolvimento da DA (Zhang, Zhang et al. 2011).

A atividade da microglia em estágios iniciais da DA é fundamental para a proteção do SNC, pois é capaz de impedir a formação do peptídeo A $\beta$  por meio de mecanismos protetores. Entretanto, com o avanço da doença associado ao envelhecimento, sua atividade torna-se insuficiente para contrapor a eliminação do peptídeo A $\beta$ , ocorrendo liberação de citocinas pró-inflamatórias que terão seus efeitos deletérios sobre o SNC (Cherry, Olschowka et al. 2014). Diante disso, sua dualidade sobre o SNC impedindo ou promovendo o avanço da doença, deve ser considerada como um potencial terapêutico.

### 1.3 Tratamento atual para a DA

Infelizmente a atual terapia farmacológica para combater a DA ainda é limitada, pois atua apenas sobre os sintomas clínicos. A farmacoterapia reconhecida pela *Food and Drug Administration* (FDA) baseia-se na perda dos neurônios colinérgicos e excitotoxicidade do



glutamato. As classes de fármacos utilizados são os inibidores de acetilcolinesterase (IACHes) (Tacrina, Donepezil, Rivastigmina e galantamina) (Birks 2006) e antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Memantina) (Danysz and Parsons 2003). Os IACHes visam o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, que ocorre através da inibição das suas principais enzimas: acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. Com a perda dos neurônios colinérgicos há redução das concentrações de acetilcolina na fenda sináptica. Portanto, os IACHes aumentam a acetilcolina na fenda sináptica reduzindo os sintomas da DA (Birks 2006).

A memantina tem como função restabelecer a transmissão neural do glutamato a um nível fisiológico e impedir os efeitos dos níveis aumentados de glutamato com consequente excitotoxicidade (Danysz and Parsons 2003). Os efeitos colaterais mais comuns relacionados ao uso de IACHes são náuseas e vômitos, ambos estão ligados ao excesso de acetilcolina. Estes efeitos secundários são leves a moderados em termos de gravidade, e podem ser gerenciados pelo ajuste de doses do fármaco (Sun, Jin et al. 2012). Efeitos secundários menos comuns incluem câibras musculares, diminuição da frequência cardíaca (bradicardia), diminuição do apetite, e aumento da produção de ácido gástrico (Birks 2006). Os efeitos adversos relatados com memantina são infreqüentes e leves, incluindo alucinações, confusão, tonturas, dor de cabeça e fadiga (Reisberg, Doody et al. 2003).

Entretanto, o atual tratamento não é capaz de impedir a neurodegeneração e consequentemente a progressão da doença, com isso, faz-se necessário a busca por novos fármacos que tenham a capacidade de impedir ou reduzir a progressão na DA.

#### 1.4 Melatonina e a DA

A melatonina é um hormônio derivado do aminoácido triptofano, secretada principalmente pela glândula pineal, localizada no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. No entanto, outros órgãos e tecidos podem sintetizá-la, incluindo o trato gastrointestinal, epitélio das vias respiratórias, pâncreas, glândulas supra-renais, glândula tireóide, timo e trato urogenital (Zawilska, Skene et al. 2009). Esses amplos locais de sínteses refletem suas diversificadas atividades fisiológicas no controle do ritmo biológico (Dominguez-Rodriguez, Abreu-Gonzalez et al. 2010), na ação antioxidante combatendo os radicais livres (Reiter, Acuna-Castroviejo et al. 2001, Reiter, Manchester et al. 2010), na atividade sobre o sistema imune (Carrillo-Vico, Guerrero et al. 2005,

Chahbouni, Escames et al. 2010), na proliferação e diferenciação celular (Sotthibundhu, Phansuwan-Pujito et al. 2010) e na regulação do sono (Ferguson, Rajaratnam et al. 2010). Suas ações dependem em parte da sua interação com os receptores de membrana da superfamília de receptores acoplados a proteína G do tipo MT1 (presentes no hipotálamo), MT2 (presente na retina, hipotálamo e cerebelo) ou MT3 (receptores presente no citosol). Além disso, tem a capacidade para atuar em vias independentes de seus receptores (Dubocovich, Yun et al. 1998).

A secreção de melatonina pelo organismo saudável ocorre principalmente durante a noite, apresentando níveis noturnos elevados e diurnos reduzidos. Entretanto, no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas vários precursores da melatonina encontram-se reduzidos, incluindo serotonina e triptofano, diminuindo assim a capacidade de síntese. Com isso, pacientes idosos ou com doenças neurodegenerativas apresentam transtornos do sono como a insônia. Desta forma, a melatonina tem um papel fundamental na regulação do sono e sua suplementação tem sido utilizada como tratamento nessas condições (Xu, Wang et al. 2015, Iranzo 2016, Zhang, Chen et al. 2016). Além disso, esta redução nos níveis de melatonina tem sido associada com o declínio cognitivo e neurodegeneração, proporcionando um fator de risco para o desenvolvimento da DA (Zubenko, Moossy et al. 1991, Corrales, Martinez et al. 2013, He, Ouyang et al. 2013).

Diante disso, estudos clínicos e pré-clínicos sugerem uma forte relação entre melatonina e a patogênese da DA (Skene, Vivien-Roels et al. 1990, Uchida, Okamoto et al. 1996, Liu, Zhou et al. 1999, Mishima, Tozawa et al. 1999, Ohashi, Okamoto et al. 1999, Ferrari, Fioravanti et al. 2000, Skene and Swaab 2003, Wu, Fischer et al. 2006, Wu and Swaab 2007). Entre esses estudos, o conduzido por (Wu and Swaab 2007) avaliou os níveis de melatonina no soro de pacientes com DA, comparando-os com pacientes controles, pareados com a mesma idade, sendo observado níveis reduzidos deste hormônio na presença desta patologia. Além disso, em muitos destes pacientes o ritmo noturno e diurno de síntese foi praticamente abolido. Segundo Magri Locatelli et al. (1997) estes níveis podem estar diminuídos ainda em estágios iniciais da doença, antes mesmo do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. Reforçando esta relação, em pacientes com DA foi observado que a concentração de melatonina no líquido diminuiu conforme a progressão da DA (Ozcankaya and Delibas 2002), assim como a imunorreatividade de receptores MT2 presentes no hipocampo (Savaskan, Ayoub et al. 2005). Essas alterações podem ser decorrentes

da presença dos peptídeos A $\beta$ , que tem a capacidade de alterar o funcionamento da glândula pineal, bloqueando a síntese de melatonina e a expressão de seus receptores (Cecon, Chen et al. 2015).

### 1.5 Justificativa

Diante de diversificada atividade fisiológica e forte relação com a DA, a melatonina tem sido investigada como alvo terapêutico no tratamento da DA tanto em estudos clínicos como em estudos pré-clínicos (Feng, Chang et al. 2004, Shen, Zhang et al. 2007, Ali and Kim 2015, Xu, Wang et al. 2015). Tendo isso em vista, o presente estudo visou investigar o papel da melatonina sobre a memória e a inflamação por meio de sua atividade moduladora no sistema imune em um modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-42.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito terapêutico da melatonina na memória e neuroinflamação em um modelo animal de demência induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide 1-42.

### 2.2 Objetivos específicos

1 - Avaliar a memória espacial no labirinto radial de camundongos Balb/c tratados com melatonina e submetidos ao modelo animal de demência induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42.

2 - Avaliar os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10) no soro e cérebro de camundongos Balb/c tratados com melatonina e submetidos ao modelo animal de demência induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 40 camundongos Balb/c adultos machos pesando em média 30g a 40g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e mantidos em gaiolas em ciclo claro/escuro de 12h, com alimentação e água, disponíveis, com temperatura entre  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal): Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos. Os devidos procedimentos foram iniciados após a aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais Experimentais da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob protocolo 031/2015-02.

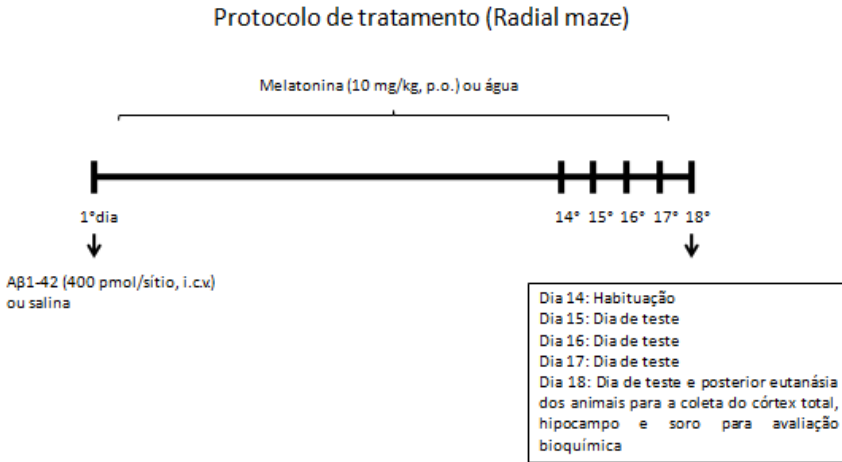
#### 3.2 Modelo animal de demência

Para induzir características da demência tipo-DA em animais, foi utilizado o peptídeo A $\beta$ 1-42 dissolvido em PBS na concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Este peptídeo ficou incubando a  $37^\circ\text{C}$  durante sete dias para ser obtida a forma agregada. Após, o agregado de peptídeo A $\beta$  1-42, foi diluído na concentração de  $100\text{pg}/\mu\text{L}$  e injetado no ventrículo lateral em um volume de  $4\mu\text{L}$  bilateralmente (Fukumoto, Mizoguchi et al. 2014). Camundongos Balb/c machos adultos foram anestesiados com isoflurano, e por meio da injeção à mão livre no ventrículo lateral foram administrados o agregado de peptídeo. Os camundongos controle receberam os mesmos procedimentos, porém foram injetados um volume idêntico de fluido cérebroespinal artificial (ACSF).

#### 3.3 Protocolo de tratamento

Após o primeiro dia da injeção do agregado de peptídeo A $\beta$  1-42 foi iniciado o tratamento dos 40 animais, com melatonina ( $10 \text{ mg/kg}$ ) ou água por via oral (p.o.) durante 15 dias (Feng, Chang et al. 2004, Ali and Kim 2015). No 14º dia os animais foram submetidos ao início do teste comportamental e após o término no 18º dia foram eutanasiados e imediatamente foi coletado o sangue para obtenção do soro, também foram retiradas as estruturas cerebrais (córtex total e hipocampo) para as

análises imunológicas (Figura 1). Foram obtidos quatro grupos experimentais: ACSF+ água; ACSF+ melatonina; peptídeo+água; peptídeo+melatonina. Foi obtido um n=10 camundongos em cada grupo experimental.



**Figura 1:** Protocolo de tratamento, iniciado no 1º dia após injeção do agregado de peptídeo. Teste comportamental no labirinto radial com habituação no 14º dia, a partir do 15º dia até o 18º dia ocorreu o teste e depois de finalizado houve eutanásia dos camundongos para coleta do córtex total, hipocampo e soro para avaliação de testes imunológicos.

### 3.4 Análise comportamental

Labirinto de radial (Radial Maze): Este labirinto consiste de uma plataforma central (28 cm de diâmetro) conectada a oito braços dispostos radialmente. Cada braço contém 50 cm de tamanho por 12 cm largura, 12 cm de altura. Os braços podem ser fechados através de uma porta de acrílico removível. Nas paredes de quatro braços ficaram dispostas figuras ilustrativas, que ao serem observadas pelo animal durante sua exploração, foram utilizadas por estes como “pistas” ou “dicas” espaciais. Para aguçar o apetite dos camundongos e estimulá-los a buscar a recompensa (Nescau cereal), os animais foram mantidos em jejum por 22 horas e racionamento de comida por cinco dias, ficando com 85% do seu peso corporal e mantido assim até o final do experimento. No 14º dia ocorreu à habituação, na qual os animais foram colocados na parte central do labirinto e deixados por 10 minutos para explorar o aparato. Nos dias dos testes (15º; 16º; 17º; 18º) quatro braços

foram selecionados para conter recompensa e os animais tiveram até 10 minutos para comer as quatro recompensas. Foram aferidos os seguintes parâmetros: erros de memória de trabalho (entrar num braço que continha comida já previamente consumida); erros de memória de referência (entrar num braço sem recompensa); e erros totais (Olton and Samuelson 1976).

### 3.5 Análise imunoquímica das amostras biológicas

As amostras de córtex total, hipocampo e soro dos animais submetidos ao protocolo de tratamento, foram utilizadas para a realização da avaliação dos níveis de citocinas. Os kits ELISA de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10) foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante.

### 3.6 Análise estatística

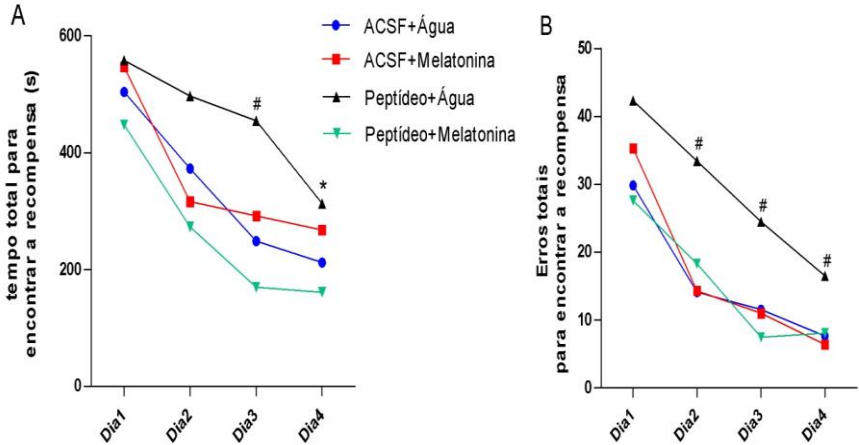
Os resultados foram analisados através do programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade *Shapiro-Wilk* foi realizado para confirmar se os dados possuem uma distribuição normal. Os resultados das citocinas foram avaliados por análise de variância por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls, quando necessário. Os resultados tiveram diferenças significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste do labirinto octogonal foi analisado por ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls quando o  $p < 0,05$ . Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4. RESULTADOS

A figura 2A mostra o tempo total para o animal encontrar a recompensa nos quatro braços do labirinto radial, o qual foi observado interação entre o grupo peptídeo tratado com melatonina e grupo peptídeo+água [Fator (1,31) = 7,42  $p < 0,05$ ]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo peptídeo apresentou diferença significativa (demorando mais tempo para encontrar a recompensa) com relação aos demais grupos no 3º dia de teste ( $p < 0,05$ ). Além disso, quando realizadas as comparações dentro do grupo peptídeo+água, este somente aprendeu no 4º dia ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao 1º dia de teste, reduzindo o tempo total para encontrar a recompensa, diferente dos demais grupos. Quando comparado as diferenças em relação ao grupo peptídeo+água, o grupo controle, reduziu o tempo total para encontrar a recompensa no 2º dia ( $p < 0,05$ ), 3º dia ( $p < 0,01$ ) e 4º dia ( $p < 0,001$ ) de teste. No grupo controle tratado com melatonina houve redução significativa, quando comparado ao grupo peptídeo, no 2º dia ( $p < 0,005$ ), 3º dia ( $p < 0,01$ ) e 4º dias ( $p < 0,001$ ). O grupo peptídeo tratado com melatonina reduziu o tempo total para encontrar a recompensa no 2º dia ( $p < 0,05$ ), 3º e 4º dias ( $p < 0,001$ ). Dentro dos grupos, somente os grupos controle e peptídeo tratado com melatonina aprenderam ao longo dos dias, no 3º e 4º dia, quando comparado ao 1º dia.

A figura 2B representa os erros totais que os animais cometeram até encontrar a recompensa na qual também houve interação entre grupo peptídeo+água e o grupo peptídeo tratado com melatonina [Fator (1,36) = 6,19  $p < 0,05$ ]. O grupo peptídeo+água apresentou diferença significativa (cometendo mais erros totais para encontrar a recompensa) com relação aos demais grupos nos 2º dia, 3º dia e 4º dia de teste. Em relação ao grupo controle as diferenças ocorreram no 2º dia, 3º dia e 4º dia ( $p < 0,01$ ). Em relação ao grupo controle tratado com melatonina as diferenças foram, no 2º dia ( $p < 0,001$ ), 3º dia ( $p < 0,05$ ) e 4º dia ( $p < 0,01$ ). Em relação ao grupo peptídeo tratado com melatonina, diferenças significativas ocorreram no 2º dia ( $p < 0,01$ ), 3º dia e 4º dia ( $p < 0,05$ ). Dentro dos grupos, somente os grupos controle, ACSF+melatonina e peptídeo+melatonina aprenderam ao longo dos dias. Os grupos controle e ACSF+melatonina, aprenderam já no 2º dia, e os três grupos experimentais aprenderam no 3º e 4º dia, quando comparado ao 1º dia. O grupo peptídeo+água somente aprendeu no último dia quando comparado ao 1º dia.

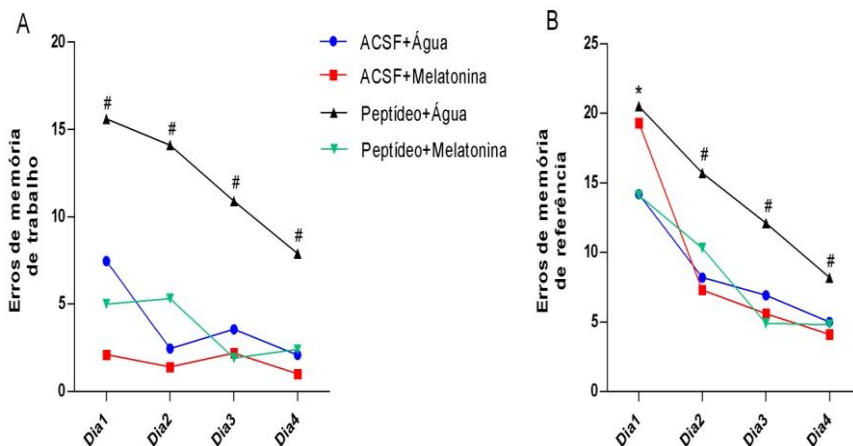




**Figura 2:** Efeito da melatonina (10mg/kg) no teste do labirinto octogonal realizado em camundongos Balb/c no modelo animal de demência tipo-DA induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42. A figura (A) mostra o tempo total para encontrar a recompensa em segundos e a figura (B) mostra os erros totais de entrada nos braços cometidos pelos animais até encontrar a recompensa. Os dados estatísticos foram analisados pelo método ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao primeiro dia de teste do respectivo grupo. #  $p < 0,05$  quando comparado ao respectivo dia de teste em relação aos demais grupos.

A figura 3A representa os erros de memória de trabalho que os animais cometeram até encontrar a recompensa. Os resultados mostram que houve interação entre o grupo peptídeo+água e grupo peptídeo tratado com melatonina [Fator (1,37) = 5,01  $p < 0,05$ ]. O grupo peptídeo+água apresentou diferença significativa (cometendo mais erros de memória de trabalho para encontrar a recompensa) com relação aos demais grupos nos 1º dia, 2º dia, 3º dia e 4º dia de teste, sendo que em relação ao grupo controle as diferenças foram no 1º dia ( $p < 0,05$ ), 2º dia ( $p < 0,001$ ), 3º dia ( $p < 0,05$ ) e 4º dia ( $p < 0,05$ ). Em relação ao grupo controle tratado com melatonina as diferenças foram, no 1º dia ( $p < 0,01$ ), 2º dia ( $p < 0,001$ ), 3º dia ( $p < 0,05$ ) e 4º dia ( $p < 0,05$ ). Em relação ao grupo modelo tratado com melatonina às diferenças foram, no 1º dia ( $p < 0,01$ ), 2º dia ( $p < 0,001$ ), 3º dia ( $p < 0,01$ ) e 4º dia ( $p < 0,05$ ).

A figura 3B representa os erros de memória de referência que os animais cometeram até encontrar a recompensa na qual também houve interação entre o grupo peptídeo e grupo peptídeo tratado com melatonina [Fator (1,35) = 8,22  $p < 0,01$ ]. O grupo peptídeo+água apresentou diferença significativa (cometendo mais erros de memória de referência para encontrar a recompensa) com relação aos demais grupos nos 2º dia, 3º dia e 4º dia de teste, sendo que em relação ao grupo controle as diferenças foram no 2º dia ( $p < 0,01$ ), 3º dia ( $p < 0,05$ ) e 4º dia ( $p < 0,05$ ). Em relação ao grupo controle tratado com melatonina às diferenças foram, no 2º dia ( $p < 0,001$ ), 3º dia ( $p < 0,05$ ) e 4º dia ( $p < 0,01$ ). Em relação ao grupo modelo tratado com melatonina às diferenças foram, no 2º dia ( $p < 0,01$ ), 3º dia ( $p < 0,05$ ) e 4º dia ( $p < 0,05$ ). Finalizando esta relação, o grupo peptídeo+água apresentou diferença do 1º dia em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Dentro dos grupos, somente os grupos controle, ACSF+melatonina e peptídeo+melatonina aprenderam ao longo dos dias. Os grupos controle e ACSF+melatonina, aprenderam já no 2º dia, e os três grupos experimentais aprenderam no 3º e 4º dia, quando comparado ao 1º dia.

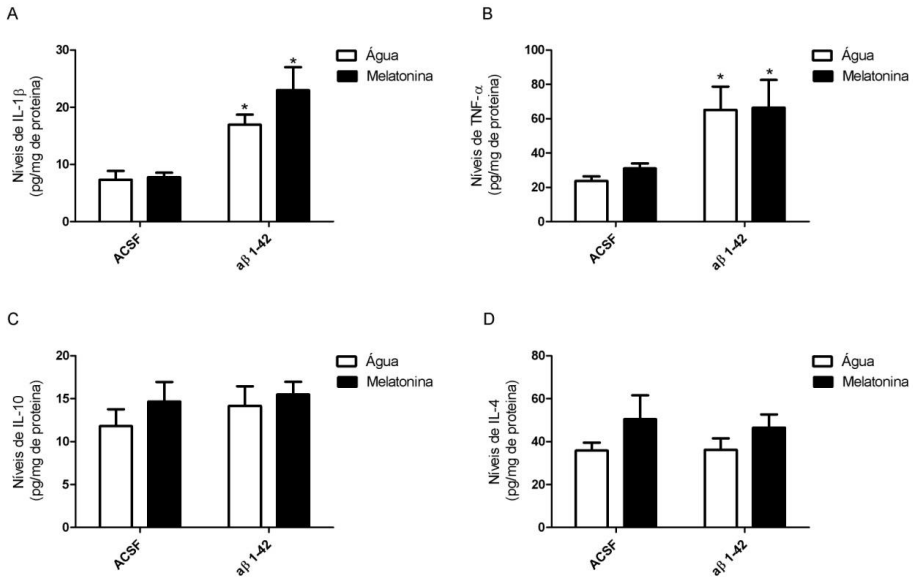


**Figura 3:** Efeito da melatonina (10mg/kg) no teste do labirinto octogonal realizado em camundongos Balb/c no modelo de demência tipo-DA induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42. A figura (A) mostra os erros de memória de trabalho (B) mostra os erros de memória de referência. Os dados estatísticos foram analisados pelo método ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como

média  $\pm$  erro padrão da média de 8-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao primeiro dia de teste com o grupo controle. #  $p < 0,05$  quando comparado ao respectivo dia de teste em relação aos demais grupos.

Além disso, foram avaliados os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 no córtex total, hipocampo e soro de camundongos submetidos ao modelo animal de demência tipo-DA pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42 e tratados com melatonina ou água. Analisando as citocinas antiinflamatórias, foi observado que a indução com o peptídeo promoveu redução desses níveis. Porém através do tratamento com melatonina, foi possível restabelecer os níveis tanto de IL-4 quanto de IL-10 principalmente no hipocampo. Da mesma forma, melatonina mostrou ser capaz de regular as citocinas pro-inflamatórias através da redução dos níveis no hipocampo e soro. A indução com o peptídeo desencadeou um processo inflamatório, representado pelo aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , no entanto nos animais submetidos ao tratamento com peptídeo + melatonina este efeito não foi observado.

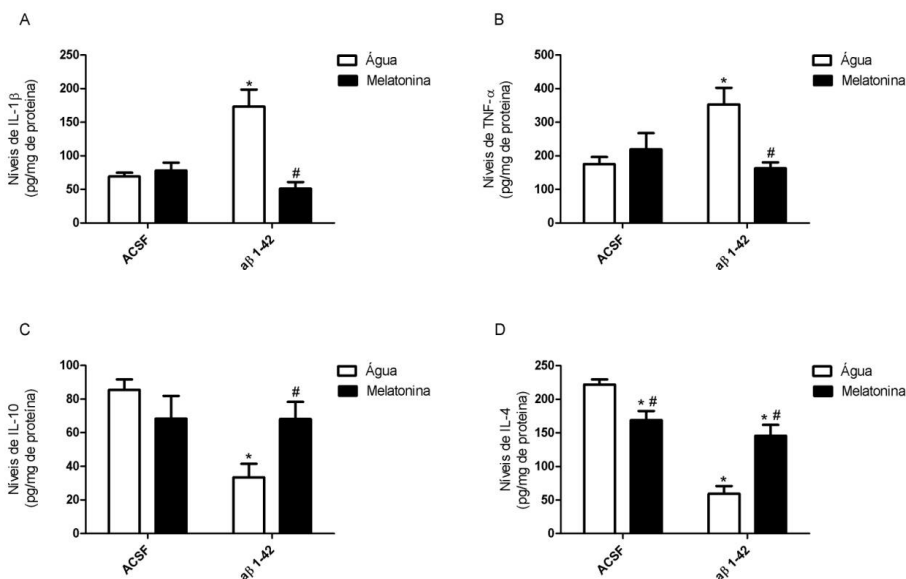
A figura 4 mostra os níveis de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) no córtex total de camundongos Balb/c. Os dados apresentados na figura 4A não mostraram interação entre o grupo peptídeo e o grupo peptídeo tratado com melatonina [Fator (1,12) = 1,41  $p = 0,25$ ] comprovados pelos métodos estatísticos ANOVA de duas vias e utilizando o teste *post hoc* de Newman-Keuls. Porém o grupo peptídeo aumentou níveis de IL-1 $\beta$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), quando realizado ANOVA de uma via. Em adição, o tratamento com melatonina não conseguiu reverter esse aumento ( $p < 0,09$ ). Na figura 4B não foi observado interação entre o grupo peptídeo e o grupo tratado com melatonina [F (12,1) = 0,09  $p = 0,76$ ]. Entretanto, o grupo peptídeo aumentou níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), porém o tratamento com melatonina não conseguiu reverter esse aumento ( $p = 0,92$ ). Na figura 4C não houve interação entre o grupo peptídeo e o grupo tratado com melatonina [F (1,12) = 0,13  $p = 0,71$ ], assim como não houve diferença entre os grupos. Resultados similares foram encontrados na figura 4D não havendo interação entre o grupo modelo e o grupo tratado com melatonina [F (1,13) = 0,08  $p = 0,77$ ]. Da mesma forma, não houve diferença entre os grupos.



**Figura 4:** Efeito da melatonina (10mg/kg) nos níveis de citocina IL-1b (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C), IL-4 (D) no córtex total de camundongos Balb/c no modelo animal de DA induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42. Os dados estatísticos foram analisados pelo método ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACSF+água, # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo A $\beta$  1-42+água.

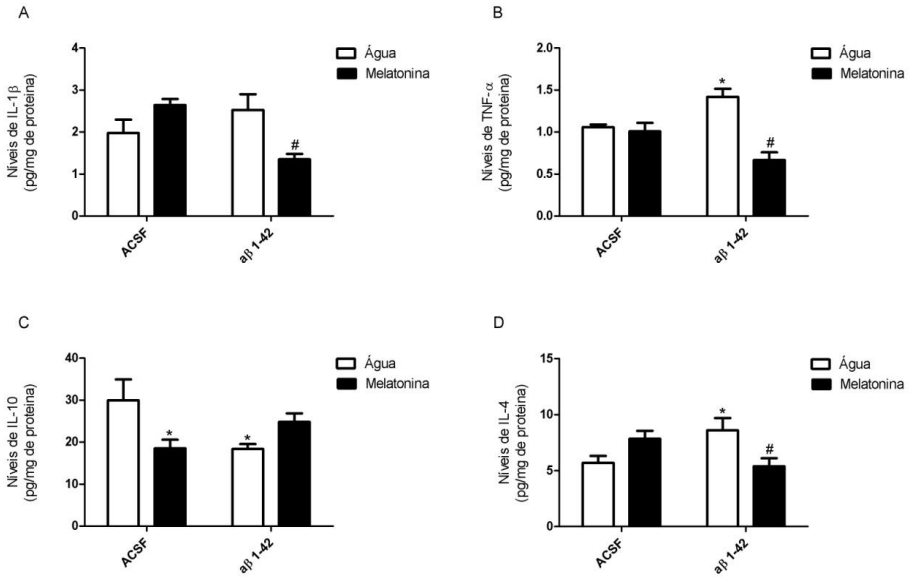
A figura 5 mostra os níveis de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) no hipocampo de camundongos Balb-C. Quando analisado por ANOVA e utilizando o *post hoc* Newman-Keuls, na figura 5A foi observada interação entre o grupo modelo e o grupo modelo tratado com melatonina [Fator (1,16) = 18,97  $p < 0,001$ ]. O grupo modelo aumentou os níveis de IL-1  $\beta$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), e o tratamento com melatonina conseguiu reverter o aumento do conteúdo desta citocina ( $p < 0,001$ ). Da mesma forma na figura 5B foi observada interação entre o grupo modelo e grupo modelo tratado com melatonina [Fator (1,13) = 8,98  $p < 0,05$ ], onde o grupo modelo aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), e o tratamento com melatonina, conseguiu reverter os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), reduzindo próximos ao grupo controle. Entretanto na figura 5C foi

observada interação entre o grupo modelo e grupo modelo tratado com melatonina [Fator (1,12) = 5,59  $p < 0,05$ ], porém foi observado que o grupo modelo reduziu os níveis de IL-10 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), e o tratamento com melatonina conseguiu aumentar os níveis de IL-10 aproximando aos níveis do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Assim como na figura 5D foi observado interação entre o grupo modelo tratado com melatonina e o modelo [Fator (1,12) = 29,66  $p < 0,001$ ], e da mesma forma foi observado que o grupo modelo reduziu os níveis de IL-4 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), e o tratamento com melatonina conseguiu aumentar os níveis de IL-4 ( $p < 0,001$ ), entretanto esta reversão foi parcial pois também apresentou diferença significativa com relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Da mesma maneira o grupo controle tratado com melatonina reduziu os níveis de IL-4 comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5:** Efeito da melatonina (10mg/kg) nos níveis de citocina IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C), IL-4 (D) no hipocampo de camundongos Balb/c no modelo animal de DA induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42. Os dados estatísticos foram analisados pelo método ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACSF+água, # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo A $\beta$  1-42+água.

A figura 6 mostra os níveis de IL-1  $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) no soro de camundongos Balb/c. Quando analisado por ANOVA e utilizando o *post hoc* Newman-Keuls, na figura 6A foi observada interação entre o grupo modelo e o grupo modelo tratado com melatonina [Fator (1,15) = 7,79  $p < 0,05$ ], e foi observado que o tratamento com melatonina conseguiu reduzir os níveis de IL-1  $\beta$  comparado ao grupo modelo ( $p < 0,05$ ). Na figura 6B houve interação entre o grupo modelo e o grupo modelo tratado com melatonina [F (1,11) = 15,33  $p < 0,01$ ], e foi observado que o grupo modelo aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), e o tratamento com melatonina conseguiu reverter os níveis de TNF- $\alpha$ , reduzindo próximos ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Na figura 6C houve interação, entre o grupo modelo e o grupo modelo tratado com melatonina [Fator (1,13) = 10,40  $p < 0,01$ ], porém o grupo modelo reduziu os níveis em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), assim como o grupo controle tratado com melatonina ( $p < 0,05$ ). Na figura 6D houve interação entre o grupo modelo e o grupo modelo tratado com melatonina [Fator (1,13) = 11,10,  $p < 0,01$ ], e foi observado que o grupo modelo aumentou os níveis de IL-4 quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), e o tratamento com melatonina conseguiu reverter o aumento dos níveis de IL-4, reduzindo próximos ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6:** Efeito da melatonina (10mg/kg) nos níveis de citocina IL-1b (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C), IL-4 (D) no soro de camundongos Balb/c no modelo de DA induzido pela administração do peptídeo A $\beta$  1-42. Os dados estatísticos foram analisados pelo método ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACSF+água, # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo A $\beta$  1-42+água.

## 5. DISCUSSÃO

A DA apresenta entre os sintomas clínicos a perda de memória precoce e desorientação, devido à neurodegeneração principalmente do hipocampo e córtex pré-frontal. É importante observar que a taxa de atrofia sobre o hipocampo já é elevada mesmo em estágios iniciais da doença (He, Ouyang et al. 2013). Sabe-se que a memória espacial é dependente da integridade do hipocampo, com isso, qualquer alteração presente nesta região do cérebro pode ocasionar disfunção e perda na memória (Broadbent, Squire et al. 2004). Entre as características fisiopatológicas que justificam este prejuízo cognitivo nas demências como na DA encontra-se o acúmulo do peptídeo A $\beta$ 1-42 (Cárdenas-Aguayo 2014).

No presente estudo a administração do peptídeo A $\beta$ 1-42 intracerebroventricular (icv), foi utilizado como modelo animal de demência. Após avaliação pelo teste comportamental no labirinto octogonal, os resultados demonstraram que o peptídeo induziu um decréscimo na função cognitiva dos camundongos. Isso foi evidenciado pelo aumento significativo no tempo total para encontrar comida, erros totais, erros de memória de trabalho e erros de memória de referência, no grupo administrado com o peptídeo quando comparado com o grupo controle. O tratamento com melatonina reverteu os déficits cognitivos, comprovados pelas diferenças significativas em todos os parâmetros comportamentais avaliados. Desta forma, o tratamento com melatonina demonstrou efeito neuroprotetor contra a perda de memória induzida por A $\beta$ 1-42.

O estudo da memória espacial de animais em ambientes naturais é relativamente complexo, devido aos problemas em se controlar os estímulos que influenciam sua orientação. Desta forma, testes de memória espacial vêm sendo realizados em laboratórios onde o ambiente é controlado; labirintos, sobretudo, são empregados com este objetivo. Entretanto, diferentes tipos de labirintos investigam a neurobiologia da memória espacial em roedores. Dentre eles, estão o labirinto radial de oito braços (Olton and Samuelson 1976) e o labirinto aquático de Morris (Morris 1981). O foco do presente estudo foi o labirinto radial de oito braços, o qual avalia dois tipos de memória em roedores durante o desempenho desta tarefa: a memória de referência e memória de trabalho, ambas compondo a memória espacial.

Memória de referência é avaliada quando os ratos só visitam os braços do labirinto que contém a recompensa. O fracasso em fazê-lo irá resultar em erros de memória de referência. A memória de trabalho é



avaliada quando os ratos entram em cada braço uma única vez. A re-entrada nos braços resultaria em um erro de memória de trabalho (Olton and Samuelson 1976). A memória de trabalho pode ser definida como a memória de curto prazo de um objeto, estímulo, ou local usado dentro de uma sessão de testes, mas não necessariamente entre as sessões, o que difere da memória de referência, que é a memória que seria normalmente adquirida na sequência de repetições, e persiste em longos períodos de tempo, normalmente dias a meses (Onaolapo, Onaolapo et al. 2014).

Os resultados do presente trabalho são consistentes com demais estudos mostrando que a administração aguda ou crônica com melatonina melhora a memória espacial em diferentes modelos animais. Em modelo de rato transgênico APP695 para a DA, a melatonina melhorou os déficits de aprendizado e memória (Feng, Chang et al. 2004). Em adição, outro estudo mostrou que a administração de calcicolina A, inibidor da fosfatase do tipo A (PP-2A), causou diminuição da memória espacial e alterações patológicas compatíveis com a DA em ratos. Neste estudo, a melatonina melhorou a memória espacial modulando a atividade de PP-2A, além de proteger contra o dano oxidativo induzido por calcicolina A (Yang, Yang et al. 2011).

Estudos em modelo animal com indução de demência tipo-DA pelos peptídeos A $\beta$ 1-42 (Ali and Kim 2015) ou A $\beta$ 25-35 (Shen, Zhang et al. 2007) mostraram que a melatonina apresentou efeito protetor. No estudo conduzido por Ali e Kim (2015), o mecanismo neuroprotetor de melatonina foi investigado no hipocampo de ratos, na qual o peptídeo provocou neurotoxicidade, desencadeando perda de memória significativa (avaliado pelos testes do labirinto aquático de Morris e labirinto em Y), disfunção sináptica, hiperfosforilação da proteína tau e morte neuronal. Os resultados demonstraram que a melatonina mostrou efeito neuroprotetor envolvendo a via de sinalização PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ , e também pela restauração de marcadores pré-sinápticos e pós-sinápticos. Os mesmos resultados comportamentais foram observados no estudo de Shen et al. (2007). Contudo, há diferenças entre os dois modelos citados acima frente ao trabalho atual, principalmente no que diz respeito aos métodos comportamentais, protocolo de tratamento e animais utilizados. Pois, os dados do presente estudo expõem o efeito da melatonina no teste comportamental do labirinto radial, diferentemente dos demais.

Em relação ao tratamento, à melatonina foi administrada via intraperitoneal durante 21 dias em ratos no trabalho de Ali e Kim (2015) e 10 dias por gavagem em ratos no trabalho de Shen et al (2007). Porém,

o presente estudo administrou a melatonina por gavagem durante 17 dias em camundongos. Para compreender como o tratamento com melatonina melhorou o desempenho da memória espacial nos camundongos, o presente trabalho avaliou o envolvimento da inflamação central e periférica no efeito da melatonina. Estudos mostram que em modelos que mimetizam a DA *in vivo*, normalmente um perfil inflamatório está presente, isso devido à capacidade do A $\beta$  ativar o sistema imune (Rosales-Corral, Tan et al. 2003, McLarnon 2014). Além disso, efeitos similares com aplicação do peptídeo em modelos *in vitro*, foram observados (Clapp-Lilly, Smith et al. 2001, Wang, Li et al. 2004, Jang, Jung et al. 2005, Hoppe, Frozza et al. 2010, Dal Pra, Chiarini et al. 2015).

Para mensurar a inflamação no SNC e no SNP, o presente estudo avaliou as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), e as anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Foi observado que a aplicação do peptídeo A $\beta$  teve a capacidade de induzir um processo inflamatório, comprovado pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias tanto no hipocampo quanto no córtex total. Da mesma forma, os níveis de TNF- $\alpha$  encontraram-se aumentados no soro. Analisando o hipocampo, foi verificado aumento significativo nos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no grupo peptídeo comparado ao grupo controle. Porém no grupo peptídeo tratado com melatonina esses níveis foram revertidos significativamente, produzindo concentrações próximas ao grupo controle. Resultado similar aconteceu no soro, com melatonina revertendo o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ . Entretanto, no córtex total, o tratamento com melatonina não conseguiu reverter os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Diante disso, os resultados demonstram que melatonina reduz a inflamação, tanto no SNC quanto no SNP, por meio da regulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Corroborando com estes dados, estudos clínicos demonstram que pacientes com DA apresentaram níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias no soro associado a concentrações reduzidas de melatonina (Wu and Swaab 2007, Swardfager, Lanctot et al. 2010).

Além disso, os resultados do presente estudo são correspondentes com outros trabalhos indicando que a administração aguda ou crônica com melatonina regula a neuroinflamação em diferentes modelos animais. Atuando sobre a neuroinflamação em culturas de células do hipocampo, após serem induzidas com peptídeo  $\beta$ A25-35, a melatonina impediu o aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6, assim como, hiperfosforilação da proteína Tau (Hoppe, Frozza et al. 2010). Já no modelo de neuroinflamação induzido por LPS, tratamento com

melatonina via oral, diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$ , como também de TNF- $\alpha$ , em várias regiões do cérebro de ratos (Tyagi, Agrawal et al. 2010). Resultados similares foram encontrados em modelo de rato com aplicação icv do peptídeo A $\beta$ 1-40 (Rosales-Corral, Tan et al. 2003). Adicionalmente, em modelo de meningite aguda, melatonina reduziu em ambos, no hipocampo e soro, os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Wu, Mai et al. 2011).

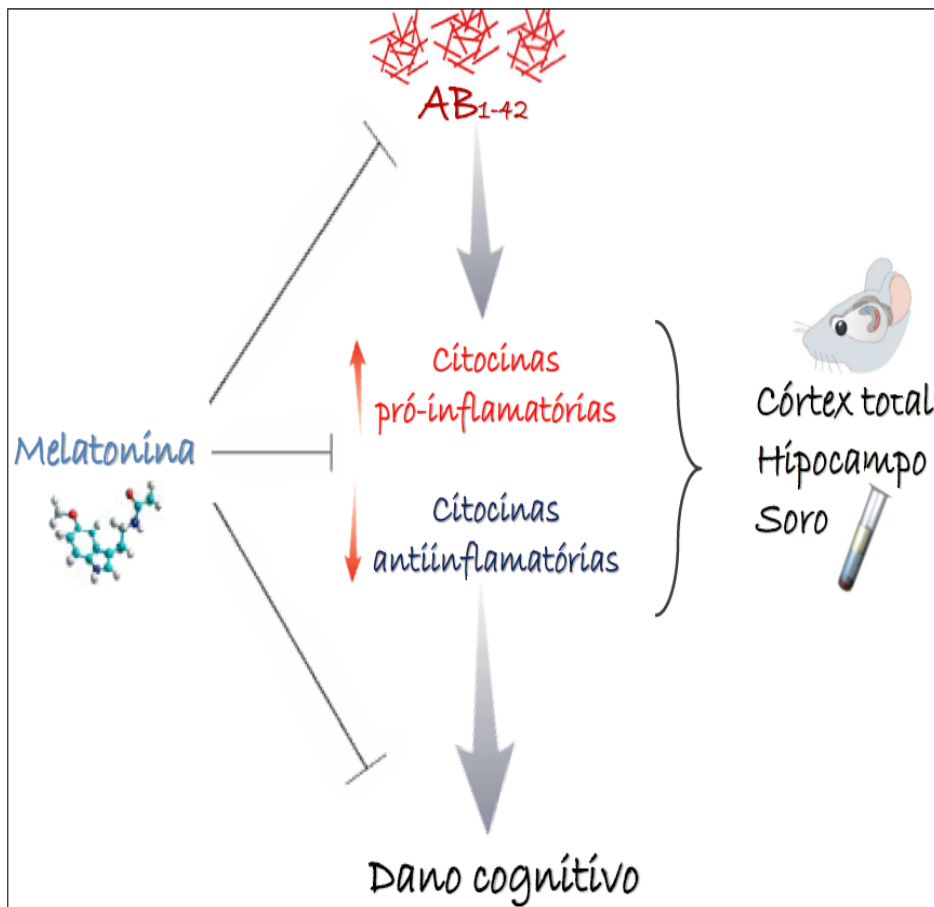
A produção de citocinas pró-inflamatórias é dependente da ativação de proteínas, entre elas pode-se destacar o fator nuclear kappa B (NF-kB), que após sua fosforilação é translocado para o núcleo para iniciar a síntese. Interessante que melatonina tem sido apontado para ser um potente inibidor da translocação de NF-kB para o núcleo. Em estudo dirigido por Xia Liang et al. (2012), melatonina reduziu a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 via supressão de NF-kB. Outra proteína envolvida na síntese das citocinas é a MAP quinase (MAPK). Em estudo com modelo de neuroinflamação induzido pelo LPS e fumaça de cigarro, houve fosforilação de MAPK e a melatonina atenuou a resposta inflamatória pela supressão desta via (Shin, Shin et al. 2015). Estes resultados corroboram com o estudo de Kireev Tresguerres et al. (2008) que encontrou o mesmo efeito no hipocampo em modelo de DA em ratas idosas. Para justificar essa reversão, o autor relacionou a capacidade da melatonina em aumentar atividade de sirtuína 1 (SIRT 1), que apresenta propriedade antiinflamatória. Adicionalmente, em modelo de hemorragia sub-aracnóide, a melatonina foi capaz de diminuir a expressão dos receptores TLR4, diminuindo assim os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Wang, Wu et al. 2013). Deste modo, a melatonina por diversas vias, é eficaz em atenuar o processo inflamatório, seja no SNC ou na periferia, através da regulação das concentrações de citocinas pró-inflamatórias.

Além da capacidade em aumentar as citocinas pró-inflamatórias, o modelo para demência utilizado no presente estudo, afetou a concentração nos níveis de citocinas antiinflamatórias. No hipocampo, foi observada redução significativa nos níveis de IL-10 e IL-4 no grupo peptídeo comparado ao grupo controle. Porém no grupo peptídeo tratado com melatonina, os níveis foram restaurados significativamente. Esta manutenção dos níveis de citocinas antiinflamatórias, promovida pela melatonina, no hipocampo frente ao estímulo de A $\beta$ , pode explicar a redução também no hipocampo dos níveis das citocinas pró-inflamatórias no grupo peptídeo tratado com este hormônio. Sabe-se que, tanto IL-10 quanto IL-4, tem a capacidade de diminuir a secreção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Hart, Cooper et al. 1991, Zhang, Zhang et al. 2011).

Desta forma a melatonina diminui a neuroinflamação regulando os níveis de citocinas antiinflamatórias, que por sua vez, modulam a liberação das citocinas pró-inflamatórias. Assim, o presente trabalho contribui com o fato de que a melatonina pode ser um hormônio imunomodulador, corroborando com outros estudos similares. Da mesma forma, resultados similares foram observados no estudo de Katkar Sundaram et al. (2014), no qual melatonina reverteu à inflamação aumentando os níveis de IL-10 em um modelo de toxicidade induzido pelo veneno de cobra em camundongos e ratos. Além disso, Carrilo Vico, Lardone et al. (2005) mostraram que a melatonina aumentou os níveis de IL-10 em um modelo de choque séptico.

No presente estudo, dosagens realizadas no córtex total não revelaram alterações nas concentrações das citocinas antiinflamatórias entre os grupos, pois todos os grupos experimentais apresentaram níveis proteicos aproximados entre si, sem diferenças significativas. É possível que, por esta razão, a melatonina não tenha revertido o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  provocados pelo peptídeo A $\beta$  no córtex total. Uma das dificuldades em avaliar o córtex total no cérebro de camundongos é a sua grande dimensão. Assim, os resultados podem ser comprometidos, uma vez que algumas micro-regiões podem ter aumento das citocinas e outras regiões redução.

Frente a essa situação, a melatonina conseguiu combater o processo inflamatório tanto no SNC quanto no SNP, pela modulação, tanto das citocinas pró-inflamatórias quanto das antiinflamatórias. Além disso, foi capaz de reverter o dano cognitivo, possivelmente por sua ação regulatória sobre a inflamação (figura 7).



**Figura 7:** Esquema representando ação protetora da melatonina frente à toxicidade do peptídeo  $A\beta$ . A melatonina pode regular os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, restaurando o dano cognitivo, observado no presente estudo. Fonte: ilustração elaborada pelo autor.

## **6. CONCLUSÃO**

No presente trabalho foi observado que a indução do peptídeo A $\beta$  promoveu inflamação tanto no SNC quanto no SNP, em camundongos Balb/c, sendo comprovado pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias e redução das citocinas antiinflamatórias. Esse processo inflamatório pode ser a explicação do comprometimento da memória espacial. Portanto, o tratamento com melatonina pode ser uma boa alternativa para a terapêutica de doenças que tem como característica a inflamação relacionada ao dano cognitivo, em especial a DA.

## REFERÊNCIAS

- Ali T, Kim MO. Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI3/Akt/GSk3 $\beta$  pathway in the mouse hippocampus. *Journal of Pineal Research*. 2015;59(1):47-59.
- Alzheimer Association 2015 Website. <http://www.alz.org>. Acessado em junho de 2016.
- Bachstetter AD, Norris CM, Sompol P, Wilcock DM, Goulding D, Neltner JH, Clair DS, Watterson DM, Van Eldik LJ. Early stage drug treatment that normalizes proinflammatory cytokine production attenuates synaptic dysfunction in a mouse model that exhibits age-dependent progression of Alzheimer's disease-related pathology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(30):10201-10.
- Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2006(1):Cd005593.
- Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, Sommer B, Jucker M, Staufenbiel M. A $\beta$ -induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *The American journal of pathology*. 2001;158(1):63-73.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(40):14515-20.
- Busche MA, Kekus M, Forstl H. [Connections between sleep and Alzheimer's disease : Insomnia, amnesia and amyloid]. *Der Nervenarzt*. 2016.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005a;27(2):189-200.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res*. 2005b;39(4):400-8.
- Cecon E, Chen M, Marcola M, Fernandes PA, Jockers R, Markus RP. Amyloid beta peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(6):2566-82.

Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, Garcia JA, Lopez LC, Munoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuna-Castroviejo D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res.* 2010;48(3):282-9.

Cárdenas-Aguayo MdC. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. Silva-Lucero MdC, Cortes-Ortiz M, Jiménez-Ramos B, Gómez-Virgilio L, Ramírez-Rodríguez G, Arroyo EV-, et al., editors: InTech; 2014.

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation.* 2014;11:98.

Clapp-Lilly KL, Smith MA, Perry G, Harris PL, Zhu X, Duffy LK. Melatonin acts as antioxidant and pro-oxidant in an organotypic slice culture model of Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 2001;12(6):1277-80.

Corrales A, Martinez P, Garcia S, Vidal V, Garcia E, Florez J, Sanchez-Barcelo EJ, Martinez-Cue C, Rueda N. Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *J Pineal Res.* 2013;54(3):346-58.

Cumming T, Brodtmann A. Dementia and stroke: the present and future epidemic. *International Journal of Stroke.* 2010;5(6):453-4.

Dal Pra I, Chiarini A, Gui L, Chakravarthy B, Pacchiana R, Gardenal E, Whitfield JF, Armato U. Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the "infectious" abeta and Tau drivers of Alzheimer's disease? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.* 2015;21(1):9-29.

Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International journal of geriatric psychiatry.* 2003;18(Suppl 1):S23-32.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez-Sanchez JJ, Kaski JC, Reiter RJ. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *J Pineal Res.* 2010;49(1):14-22.

Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benlucif S, Masana MI. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1998;12(12):1211-20.



- Faden AI, Loane DJ. Chronic neurodegeneration after traumatic brain injury: Alzheimer disease, chronic traumatic encephalopathy, or persistent neuroinflammation? *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2015;12(1):143-50.
- Feng Z, Chang Y, Cheng Y, Zhang BL, Qu ZW, Qin C, Zhang JT. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res*. 2004;37(2):129- 36.
- Ferguson SA, Rajaratnam SM, Dawson D. Melatonin agonists and insomnia. *Expert review of neurotherapeutics*. 2010;10(2):305-18.
- Ferrari E, Fioravanti M, Magri F, Solerte SB. Variability of interactions between neuroendocrine and immunological functions in physiological aging and dementia of the Alzheimer's type. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;917:582-96.
- Fiest KM, Roberts JI, Maxwell CJ, Hogan DB, Smith EE, Frolkis A, Cohen A, Kirk A, Pearson D, Pringsheim T, Venegas-Torres A, Jette N. The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2016;43 Suppl 1:S51-82.
- Fukumoto K, Mizoguchi H, Takeuchi H, Horiuchi H, Kawanokuchi J, Jin S, Mizuno T, Suzumura A. Fingolimod increases brain-derived neurotrophic factor levels and ameliorates amyloid beta-induced memory impairment. *Behavioural brain research*. 2014;268:88-93.
- Gambuzza ME, Sofo V, Salmeri FM, Soraci L, Marino S, Bramanti P. Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2014;13(9):1542-58.
- Gibertini M, Newton C, Friedman H, Klein TW. Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1-beta. *Brain, behavior, and immunity*. 1995;9(2):113-28.
- Gold M, El Khoury J. beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Seminars in immunopathology*. 2015;37(6):607-11.
- Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(2):101-12.
- Hart PH, Cooper RL, Finlay-Jones JJ. IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages. *Immunology*. 1991;72(3):344-9.

He P, Ouyang X, Zhou S, Yin W, Tang C, Laudon M, Tian S. A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer' disease. *Hormones and behavior*. 2013;64(1):1-7.

Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2015;14(4):388-405.

Hoppe JB, Frozza RL, Horn AP, Comiran RA, Bernardi A, Campos MM, Battastini AM, Salbego C. Amyloid-beta neurotoxicity in organotypic culture is attenuated by melatonin: involvement of GSK-3beta, tau and neuroinflammation. *J Pineal Res*. 2010;48(3):230-8.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1739(2-3):198-210.

Iranzo A. Sleep in Neurodegenerative Diseases. *Sleep medicine clinics*. 2016;11(1):1- 18.

Jang MH, Jung SB, Lee MH, Kim CJ, Oh YT, Kang I, Kim J, Kim EH. Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neuroscience letters*. 2005;380(1-2):26-31.

Katkar GD, Sundaram MS, Hemshekhar M, Sharma DR, Santhosh MS, Sunitha K, Rangappa KS, Girish KS, Kemparaju K. Melatonin alleviates Echi carinatus venom- induced toxicities by modulating inflammatory mediators and oxidative stress. *J Pineal Res*. 2014;56(3):295-312.

Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res*. 2008;45(4):394-402.

Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease- like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(8):3093-102.

- Kojima G, Taniguchi Y, Iliffe S, Walters K. Frailty as a Predictor of Alzheimer Disease, Vascular Dementia, and All Dementia Among Community-Dwelling Older People: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2016.
- Levings MK, Schrader JW. IL-4 Inhibits the Production of TNF- $\alpha$  and IL-12 by STAT6-Dependent and -Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology*. 1999;162(9):5224-9.
- Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mrak RE, Griffin WS. Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(1):149-55.
- Li Y, Tan M-S, Jiang T, Tan L. Microglia in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. 2014;2014:7.
- Liu R-Y, Zhou J-N, van Heerikhuizen J, Hofman MA, Swaab DF. Decreased Melatonin Levels in Postmortem Cerebrospinal Fluid in Relation to Aging, Alzheimer's Disease, and Apolipoprotein E- $\epsilon$ 4 Genotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(1):323-7.
- Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res*. 2014;79:1-12.
- Magri F, Locatelli M, Balza G, Molla G, Cuzzoni G, Fioravanti M, Solerte SB, Ferrari E. Changes in endocrine circadian rhythms as markers of physiological and pathological brain aging. *Chronobiology international*. 1997;14(4):385-96.
- McAlpine FE, Lee JK, Harms AS, Ruhn KA, Blurton-Jones M, Hong J, Das P, Golde TE, LaFerla FM, Oddo S, Blesch A, Tansey MG. Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol Dis*. 2009;34(1):163-77.
- McLarnon JG. Correlated Inflammatory Responses and Neurodegeneration in Peptide-Injected Animal Models of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*. 2014;2014:9.
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB. Connecting TNF- $\alpha$  signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the

- behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(20):5394-404.
- Minter MR, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2016;136(3):457-74.
- Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Matsumoto Y, Hishikawa Y, Okawa M. Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biological psychiatry*. 1999;45(4):417-21.
- Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981;12(2):239-60.
- Newman M, Musgrave IF, Lardelli M. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1772(3):285-97.
- Noroozian M, Shakiba A, Iran-nejad S. The impact of illiteracy on the assessment of cognition and dementia: a critical issue in the developing countries. *International psychogeriatrics / IPA*. 2014;26(12):2051-60.
- Ohashi Y, Okamoto N, Uchida K, Iyo M, Mori N, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Biological psychiatry*. 1999;45(12):1646-52.
- Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 1976;2(2):97-116.
- Onaolapo OJ, Onaolapo AY, Abiola AA, Lillian EA. Central depressant and nootropic effects of daytime melatonin in mice. *Annals of neurosciences*. 2014;21(3):90-6.
- Ozcanakaya R, Delibas N. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croatian medical journal*. 2002;43(1):28-32.
- Rani V, Deshmukh R, Jaswal P, Kumar P, Bariwal J. Alzheimer's disease: Is this a brain specific diabetic condition? *Physiology & behavior*. 2016;164(Pt A):259-67.
- Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 2003;348(14):1333-41.
- Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of

- melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;939:200-15.
- Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Neurotoxins: Free Radical Mechanisms and Melatonin Protection. *Current Neuropharmacology*. 2010;8(3):194-210.
- Reus GZ, Titus SE, Abelaira HM, Freitas SM, Tuon T, Quevedo J, Budni J. Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases. *Life sciences*. 2016.
- Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, Valdivia-Velazquez M, Martinez-Barboza G, Acosta-Martinez JP, Ortiz GG. Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *J Pineal Res*. 2003;35(2):80-4.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The Scientific World Journal*. 2012;2012.
- Savaskan E, Ayoub MA, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Meier F, Eckert A, Muller- Spahn F, Jockers R. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *J Pineal Res*. 2005;38(1):10-6.
- Shen Y, Zhang G, Liu L, Xu S. Suppressive effects of melatonin on amyloid-beta- induced glial activation in rat hippocampus. *Archives of medical research*. 2007;38(3):284-90.
- Sheng JG, Jones RA, Zhou XQ, McGinness JM, Van Eldik LJ, Mruk RE, Griffin WS. Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation. *Neurochemistry international*. 2001;39(5-6):341-8.
- Shin IS, Shin NR, Park JW, Jeon CM, Hong JM, Kwon OK, Kim JS, Lee IC, Kim JC, Oh SR, Ahn KS. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling. *J Pineal Res*. 2015;58(1):50-60.
- Skene DJ, Swaab DF. Melatonin rhythmicity: effect of age and Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*. 2003;38(1-2):199-206.
- Skene DJ, Vivien-Roels B, Sparks DL, Hunsaker JC, Pevet P, Ravid D, Swaab DF. Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain research*. 1990;528(1):170-4.
- Solito E, Sastre M. Microglia Function in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2012;3.

- Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate immunity*. 2014;20(2):115-25.
- Sothibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res*. 2010;49(3):291-300.
- Sun X, Jin L, Ling P. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug discoveries & therapeutics*. 2012;6(6):285-90.
- Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta- analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010;68(10):930-41.
- Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, Tan L. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*. 2013;48(3):875-82.
- Tedeschi G, Cirillo M, Tessitore A, Cirillo S. Alzheimer's disease and other dementing conditions. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2008;29 Suppl 3:301-7.
- Tong L, Prieto GA, Kramar EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, Cotman CW. Brain- derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin- 1beta via p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(49):17714-24.
- Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2010;640(1- 3):206-10.
- Uchida K, Okamoto N, Ohara K, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. *Brain research*. 1996;717(1-2):154-9.
- Verdile G, Fuller S, Atwood CS, Laws SM, Gandy SE, Martins RN. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacological research*. 2004;50(4):397-409.
- Wang YP, Li XT, Liu SJ, Zhou XW, Wang XC, Wang JZ. Melatonin ameliorated okadaic-acid induced Alzheimer-like lesions. *Acta pharmacologica Sinica*. 2004;25(3):276-80.
- Wang Z, Wu L, You W, Ji C, Chen G. Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway. *J Pineal Res*. 2013;55(4):399- 408.
- Wu UI, Mai FD, Sheu JN, Chen LY, Liu YT, Huang HC, Chang HM. Melatonin inhibits microglial activation, reduces pro-inflammatory

cytokine levels, and rescues hippocampal neurons of adult rats with acute *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *J Pineal Res.* 2011;50(2):159-70.

Wu YH, Fischer DF, Kalsbeek A, Garidou-Boof ML, van der Vliet J, van Heijningen C, Liu RY, Zhou JN, Swaab DF. Pineal clock gene oscillation is disturbed in Alzheimer's disease, due to functional disconnection from the "master clock". *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2006;20(11):1874-6.

Wu YH, Swaab DF. Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease. *Sleep medicine.* 2007;8(6):623-36.

Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, Chen YH, Zhang C, Zhao M, Xu DX, Song LH. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J Pineal Res.* 2012;53(4):325-34.

Xu J, Wang LL, Dammer EB, Li CB, Xu G, Chen SD, Wang G. Melatonin for sleep disorders and cognition in dementia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias.* 2015;30(5):439-47.

Yang X, Yang Y, Fu Z, Li Y, Feng J, Luo J, Zhang Q, Wang Q, Tian Q. Melatonin ameliorates Alzheimer-like pathological changes and spatial memory retention impairment induced by calyculin A. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England).* 2011;25(8):1118-25.

Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports.* 2009;61(3):383-410.

Zhang W, Chen X-y, Su S-w, Jia Q-z, Ding T, Zhu Z-n, Zhang T. Exogenous melatonin for sleep disorders in neurodegenerative diseases: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Neurological Sciences.* 2016;37(1):57-65.

Zhang Y, Zhang J, Tian C, Xiao Y, Li X, He C, Huang J, Fan H. The -1082G/A polymorphism in IL-10 gene is associated with risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Journal of the neurological sciences.* 2011;303(1-2):133-8.

Zubenko GS, Moossy J, Martinez AJ, Rao G, Claassen D, Rosen J, Kopp U. Neuropathologic and neurochemical correlates of psychosis in primary dementia. *Archives of neurology.* 1991;48(6):619-24.

## ANEXO A – Carta de aprovação na Comissão de Ético no Uso dos Animais



### Universidade do Extremo Sul Catarinense Comissão de Ética no Uso de Animais

#### **CERTIFICADO**

*Certificamos que o projeto intitulado “Efeito profilático e terapêutico da melatonina em um modelo animal de doença de Alzheimer induzido pelo peptídeo  $\beta$ - amilóide (1-42)”, Protocolo nº 031/2015-2 sob a responsabilidade de Josiane Budni equipe: Leonardo Spillere, Michelle Lima Garcez, Francielle Gonçalves Mina, Gustavo Skiavo, Aline Pereira da Luz e Yan Trevisol, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.*

Vigência do Projeto	01/10/2015 a 30/09/2017
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico C57/bl6
Nº. De animais	288
Peso/Idade	30-40g, Adultos
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

*The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:*

**Protocol number: 031/2015-2**


**Principal Investigator:** Josiane Budni

**Researchers:** Leonardo Spillere, Michelle Lima Garcez, Francielle Gonçalves Mina, Gustavo Skiavo, Aline Pereira da Luz e Yan Trevisol.

**Project title:** Prophylactic and therapeutic effect of melatonin in an animal model of Alzheimer's disease induced by amyloid- $\beta$  (1-42) peptide.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

Criciúma, 23 de setembro de 2015.

  
JAIRO JOSÉ ZOCCHE  
Coordenador da CEUA