

RAPHAEL AFONSO DE MATOS

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE A NEUROGÊNESE E
NEUROINFLAMAÇÃO EM RATOS ESPONTANEAMENTE
DIABÉTICOS DO TIPO 2 (GOTO-KAKIZAKI)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2019

RAPHAEL AFONSO DE MATOS

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE A NEUROGÊNESE E
NEUROINFLAMAÇÃO EM RATOS ESPONTANEAMENTE
DIABÉTICOS DO TIPO 2 (GOTO-KAKIZAKI)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Afonso de Matos, Raphael
Influência da melatonina sobre a neurogênese e
neuroinflamação em ratos espontaneamente diabéticos
do tipo 2 (Goto-Kakizaki) / Raphael Afonso de
Matos; orientador José Cipolla-Neto. -- São Paulo,
2019.
109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melatonina. 2. Diabetes tipo 2. 3.
Neurogênese. 4. Neuroinflamação. I. Cipolla-Neto,
José, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.019/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 199/11/CEUA, datado de 24.01.12 e por solicitação do Prof. Dr. **José Cipolla Neto**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Raphael Afonso de Matos** ao Projeto de Pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de março de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e pelas portas que se abriram no meu caminho.

Ao meu pai por sempre incentivar minhas atividades intelectuais e fazer de tudo por mim.

A minha mãe, grande mulher, guerreira e vencedora, te amo e admiro incondicionalmente.

Minhas amadas irmãs, Amanda e Fernanda.

Meu avô Artur, exemplo de homem, o tenho em minha memória e coração.

Minha tão amada e doce avó Maria Amélia, meu grande amor.

Meus sobrinhos Alice e Arthur.

Aos meus queridos amigos de laboratório, em especial ao meu grande amigo e parceiro científico, José

Sinésio, minha eterna gratidão.

Meus amigos presentes em todos os momentos, Lucas Valerin e Thiago Torrubia.

Ao homem que durante minha graduação chamei de professor e hoje tenho a honra de chamá-lo de amigo,

Ronaldo Melo.

Ao meu orientador professor José Cipolla-Neto, grande cientista dotado de um humanismo ímpar. Minha

eterna admiração.

Meu forte agradecimento à FAPESP e ao CNPQ (número de processo 141132/2015-9) pelo incondicional apoio e suporte financeiro.

“E aqueles que foram vistos dançando, foram julgados insanos, por aqueles que não podiam escutar a música”

Nietzsche

RESUMO

MATOS, R.A. **Influência da melatonina sobre a neurogênese e neuroinflamação de ratos espontaneamente diabéticos do tipo 2 (Goto-kakizaki)**. 2019. 109 f. Tese de doutorado (Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A glândula pineal é responsável pela produção circadiana do hormônio melatonina, o qual possui além da bem documentada propriedade cronobiótica, ações relacionadas à neurogênese e atividade anti-inflamatória. A prevalência do distúrbio do metabolismo dos carboidratos conhecido como *diabetes mellitus* afeta cada vez mais a população mundial em decorrência do aumento da expectativa de vida, alimentação inadequada, obesidade e detrimento de atividade física regular, caracterizando além dos sintomas clássicos como hiperglicemia, polifagia, polidipsia e glicosúria, problemas relacionados a plasticidade cerebral, neuroinflamação e maior probabilidade do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A hiperglicemia crônica influencia negativamente a síntese e secreção de melatonina, fato que contribui ainda mais para o agravamento dos sintomas do quadro de diabetes, formando um ciclo de retroalimentação positiva. Tendo em vista as recentes pesquisas que mostram que a molécula de melatonina atua como agente anti-inflamatório, neuroprotetor e indutor da neurogênese, nos propomos a investigar, com este trabalho, se a suplementação via oral de melatonina em ratos modelo de diabetes tipo 2 (Goto-Kakizaki) é capaz de reverter ou amenizar os danos cerebrais associados ao quadro diabético. Nossos resultados demonstram que a suplementação de melatonina não foi capaz de alterar a glicemia de jejum dos animais, tampouco torná-los mais sensíveis à insulina mediante teste de tolerância à glicose. Entretanto, a mesma atuou sobre o peso corporal dos animais diabéticos, fato ainda a ser elucidado do ponto de vista molecular. Foi possível demonstrar que alguns dos fatores fisiopatológicos associados ao diabetes tipo 2, aparentemente, dependem mais do quadro hiperglicêmico do que da redução da produção de melatonina pineal. No entanto, a alteração patológica de outros parâmetros, parecem estar mais diretamente dependentes da redução da produção de melatonina nos animais diabéticos, como a expressão da caspase e consequente processo de regulação de morte celular hipocampale, expressão de VEGF e a consequente vasogênese anômala neural. Demonstrou-se, ainda, que os animais Goto-Kakizaki não apresentam processos inflamatórios no hipocampo e hipotálamo.

Palavras-chave: Melatonina; Diabetes tipo 2; Neurogênese; Neuroinflamação.

ABSTRACT

MATOS, R.A. **Influence of melatonin on neurogenesis and neuroinflammation of spontaneously type 2 diabetic rats (Goto-kakizaki)**. 2019. 109 p. PhD thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The pineal gland is responsible for the circadian production of the hormone melatonin, which has besides well documented chronobiotic properties, actions related to neurogenesis and anti-inflammatory activity. The prevalence of carbohydrate metabolism disorder known as diabetes mellitus increasingly affects the world population due to increased life expectancy, inadequate diet, obesity, and the detriment of regular physical activity, characterizing in addition to classic symptoms such as hyperglycemia, polyphagia, polydipsia and glycosuria, problems related to brain plasticity, neuroinflammation, and increased likelihood of developing neurodegenerative diseases. Chronic hyperglycemia negatively influences the synthesis and secretion of melatonin, a fact that contributes even more to the worsening symptoms of diabetes, forming a positive feedback loop. Given the recent research showing that the melatonin molecule acts as an anti-inflammatory, neuroprotective and neurogenesis inducer, we propose to investigate whether oral supplementation of melatonin in type 2 diabetes mellitus (Goto-Kakizaki) is able to reverse or ameliorate the brain damage associated with the diabetic condition. Our results demonstrate that melatonin supplementation was not able to alter the fasting glycemia of the animals, nor did it make them more sensitive to insulin through a glucose tolerance test. However, it acted on the body weight of diabetic animals, a fact still to be elucidated from the molecular point of view. It was possible to demonstrate that some of the pathophysiological factors associated with type 2 diabetes apparently depend more on the hyperglycemic picture than on the reduction of pineal melatonin production. However, the pathological alteration of other parameters seems to be more directly dependent on the reduction of melatonin production in diabetic animals, such as the expression of caspase and consequent regulation of hippocampal cell death and VEGF expression and consequent anomalous neural vasogenesis . It was also demonstrated that Goto-Kakizaki animals do not present inflammatory processes in the hippocampus and hypothalamus.

Keywords: Melatonin; Type 2 diabetes; Neurogenesis; Neuroinflammation.

SUMÁRIO

1 Introdução	11
1.1 A neurogênese	11
1.1.2 Regiões onde a neurogênese é observada	12
1.1.3 Fatores que podem influenciar estes processos	13
1.2 Processo inflamatório no cérebro (Neuroinflamação)	13
1.3 <i>Diabetes mellitus</i>	14
1.4 Glândula pineal e melatonina	16
2 Justificativa	22
3 Objetivo geral	22
3.1 Objetivos específicos	22
4 Materiais e Métodos	23
4.1 Animais	23
4.2 Determinação do peso corporal	23
4.3 Aferição da glicemia	23
4.4 Suplementação de melatonina	24
4.5 Eutanásia e extração dos tecidos	24
4.6 Extração de RNA	25
4.7 Obtenção de cDNA	26
4.8 PCR <i>real time</i>	26
4.9 Western blot	29
4.10 Análise estatística	29
5 Resultados	30
6 Discussão	86
7 Conclusão	95
Referências	96

1. Introdução

1.1 Neurogênese

A palavra neurogênese refere-se ao surgimento de novos neurônios no encéfalo adulto, tal fenômeno tem início com a multiplicação de células tronco neurais (CTNs), fato seguido pela diferenciação destas, bem como sua maturação e possível integração aos circuitos neurais (KEMPERMANN, 2011).

Este processo fisiológico nem sempre foi aceito no meio científico, tendo em vista a declaração dada pelo famoso histologista espanhol Santiago Ramón y Cajal na década de 20, na qual este afirmava que o sistema nervoso central (SNC) não possuía capacidade de se regenerar, conseqüentemente, este tecido só apresentaria apoptose celular no decorrer da vida, sendo impossível sua regeneração como é observado em tecidos como o músculo esquelético. Essa afirmação feita por um cientista de renome à época tornou-se um grande dogma.

Tal idéia foi mantida até os albores dos anos 60, período onde tivemos o desenvolvimento de drogas que se incorporam a célula durante seu processo mitótico, o que permitia realizar marcações posteriores pela técnica de autorradiografia. Diante disso, pouco tempo depois, foram publicados trabalhos relatando a presença de novos neurônios em roedores, em diferentes estruturas encefálicas (SMART, 1961; ALTMAN, 1962, 1966, 1969; ALTMAN e DAS, 1965). Em decorrência do axioma acerca da incapacidade de regeneração do SNC, estes relatos não foram alçados a algo de fato relevante.

No final dos anos 70 e início dos anos 80, outros trabalhos surgiram relatando a marcação de células que supostamente teriam passado pelo processo de divisão no SNC, mais especificamente no hipocampo e bulbo olfatório de roedores, ainda, relatando que estas células possuíam características de neurônios, fato que novamente não foi levado em consideração pela comunidade científica da época (KAPLAN, 1977; KAPLAN e BELL, 1983)

O olhar sobre a neurogênese passou a ser diferente somente na década de 90 com a utilização da droga conhecida como BrdU. Esta é incorporada às células durante a fase S do ciclo celular, sendo, portanto, um indicador de proliferação.

Diferentemente das células marcadas com outras drogas de décadas passadas, as células marcadas com BrdU não necessitavam de autorradiografia para serem visualizadas, podendo ser empregada a técnica de imunohistoquímica, fato que permitia que fossem feitas duplas marcações com anticorpos específicos para proteínas expressas unicamente em

neurônios (DCX, Nestina, NeuN) ou células da glia (GFAP). Diante disso o dogma acerca da imutabilidade do SNC foi desfeito, confirmando-se o surgimento de novas células neurais e gliais em diversos mamíferos (CAMERON et al., 1993; SEKI e ARAI,1993; GOULD et al., 1997; KUHN et al., 1997; RIKSSON et al., 1998; GOULD et al., 1999; KORNACK e RAKIC, 1999).

1.1.2 Regiões onde a neurogênese é observada

Com relação aos locais onde a neurogênese ocorre, existem dois nichos clássicos amplamente descritos na literatura, o bulbo olfatório e o giro denteado hipocampal. Contudo, existem trabalhos que relatam a marcação de novos neurônios também em outras estruturas encefálicas (BERNIER et al., 2002; FOWLER et al., 2002; GOULD, 2007; OKUDA et al., 2009; LEE, BLACKSHAW, 2012; CHENG, 2013).

Na zona subventricular dos ventrículos laterais (ZSV) observa-se CTNs, as quais após alguns processos, são capazes de migrar por uma via bem descrita chamada corrente migratória rostral (CMR), e se diferenciam em neurônios no bulbo olfatório. Já no hipocampo, as CTNs se encontram na zona subgranular do giro denteado (ZSG) que se constitui de uma estrutura dividida em três camadas distintas: a camada molecular, a camada granular e a camada polimórfica. Nessa estrutura, os neurônios novos migram para dentro da camada de células granulares aonde tem início a projeção do axônio e dos dendritos para a área CA3 e camada molecular (GOULD, 2007; KEMPERMANN, 2011).

1.1.3 Fatores que podem influenciar este processo

A neurogênese definitivamente não é um processo plasticamente rígido, podendo sofrer modulações por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos.

Fatores que modulam positivamente este fenômeno: interação social e enriquecimento ambiental (LEAL-GALICIA et al., 2007; OKUDA et al., 2009), exercício físico forçado e numa magnitude ainda maior ao feito espontaneamente (voluntário) (VAN PRAAG et al., 1999; UDA et al., 2006), neurotrofinas (ALBERG et al., 2000; PENCEA et al., 2001; JIN et al., 2002), hormônios sexuais e insulina (TANAPAT et al., 1997; BRANNVALL et al., 2005), etc.

Fatores que modulam negativamente este fenômeno: isolamento social, stress (CAMERON e GOULD, 1994; SCACCIANOCE et al., 2006; LIEBERWIRTH et al., 2012), dieta hipercalórica (LINDQVIST et al., 2006) e diabetes (HO; SOMMERS; LUCKI, 2013) são vistos como os principais.

1.2 Processo inflamatório no cérebro (Neuroinflamação)

O processo inflamatório é uma resposta de defesa que acontece após determinada injúria tecidual, seja por agentes químicos, físicos ou imunológicos (ABBAS e JANEWAY, 2000). A reação inflamatória momentânea é definida por uma sequência de acontecimentos dentre os quais observamos: elevação do fluxo sanguíneo na região, permeabilidade vascular com conseqüente edema e migração de células do sistema imunológico para a área lesada. Estas células especializadas realizam a fagocitose dos elementos que estão originando o processo inflamatório e produzem mediadores químicos, dentre os quais estão as citocinas, as quimiocinas, a bradicinina, as prostaglandinas e leucotrienos. O que se observa posteriormente é a reparação do dano que desencadeou essa cascata de eventos bioquímicos (WHITNEY et al., 2009).

A resposta inflamatória possui a cooperação de diversos tipos celulares como os neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dentríticas, células endoteliais e fibroblastos (ABBAS e JANEWAY, 2000; WYSS-CORAY e MUCKE, 2002). Essas respostas imunológicas mediante um insulto, normalmente são benéficas ao organismo, contudo, um processo inflamatório exacerbado ou crônico pode ter efeito adverso e ser extremamente deletério ao indivíduo.

No sistema nervoso central, em decorrência das suas características inerentes, sua resposta inflamatória difere de outros tecidos. Principalmente pela presença da barreira hematoencefálica (BHE), a penetração de moléculas de tamanho acentuado e células circulantes é escassa e justamente por isso, durante muito tempo esse tecido ganhou a alcunha de imunologicamente privilegiado.

Após injúria tecidual de qualquer espécie, um processo inflamatório é iniciado por ativação da microglia (que é a menor célula glial e responsável pela defesa do sistema nervoso central) e astrócitos residentes, este processo acarreta um aumento das fenestrações da BHE, culminando em infiltração de macrófagos e linfócitos periféricos, fato que culmina com a liberação de uma série de substâncias por estas células como: citocinas anti e pró-inflamatórias, quimiocinas, neurotransmissores e espécies reativas de oxigênio (KEMPURAJ et al., 2016).

O aumento do processo inflamatório atrai uma quantidade maior de células do sistema imune para a região acometida, criando um *feedback positivo* no processo, o que, caso não seja controlado, invariavelmente suscita dano ao sistema nervoso com morte neuronal (DAS e BASU, 2008; WANG e JIN, 2015), fato este que está atrelado a diversas patologias neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington (WHITNEY et al., 2009) e patologias de ordem metabólica como o *diabetes mellitus* do tipo 2, quando a estrutura afetada pelo processo inflamatório é o hipotálamo (CALEGARI et al., 2011; ARRUDA et al., 2011; MILANSKI et al., 2012).

1.3 *Diabetes mellitus*

O *diabetes mellitus* é uma patologia caracterizada pela hiperglicemia crônica em decorrência de um distúrbio metabólico dos carboidratos. Este se deve ou a ausência na produção de insulina pelo pâncreas endócrino ou quando as células do organismo não conseguem utilizar apropriadamente a insulina produzida por este órgão, ou, ainda, ambos. Desta forma temos prejudicada a incorporação de glicose sanguínea pelas células, circunstância que está associada a alterações degenerativas em diversos sistemas do organismo (SILVERTHORN, 2010; GUYTON e HALL, 2011), dentre eles o sistema nervoso central. Observa-se neuroinflamação e comprometimento no processo de neurogênese em modelos de animais diabéticos (JACKSON-GUILFORD, LEANDER, NISENBAUM, 2000; HO, SOMMERS, LUCKI, 2013; HAN et al., 2016). O diabetes constitui um problema de saúde mundial, acarretando gastos exacerbados aos governos para

tratamento populacional em larga escala (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O diabetes tipo 1 está diretamente veiculado a destruição das células β pancreáticas (responsáveis pela síntese e secreção da insulina), por meio de mecanismos /autoimunes. Nesta patologia, invariavelmente, existe imprescindibilidade de insulinoterapia (ANDERSSON et al., 2001; GUYTON e HALL, 2011; NATHAN, 2015).

O diabetes tipo 2 (responsável por cerca de 95% dos casos da doença), caracteriza-se pelo decréscimo da ação da insulina nas células do organismo, o que é chamado de resistência insulínica. A médio/longo prazo observa-se, por consequência, redução da secreção de insulina em decorrência da falência das células β pancreáticas. A maior ocorrência é em indivíduos adultos, contudo, podemos observar estes eventos ocorrendo cada vez mais cedo (infância ou adolescência) (GUYTON e HALL, 2011). Existem alguns tipos específicos de *diabetes mellitus* como o MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) e o diabetes gestacional, que não serão abordados.

Um modelo animal de diabetes experimental do tipo 2 é a linhagem de ratos Goto-Kakizaki (GK). Estes animais são um modelo de diabetes tipo 2, sem obesidade, obtido por seleção genética feita por reprodução seletiva e repetitiva de ratos Wistar com intolerância a glicose (GOTO, KAKISAKI, MASAKI, 1976; AKASH, REHMAN, CHEN, 2013). Nesta linhagem de animais observamos níveis moderadamente elevados de glicemia (120mg/dL) após oito semanas de vida (BISBIS et al., 1993).

Alguns trabalhos mostram que roedores diabéticos possuem uma redução significativa na produção hormonal de melatonina (FRESE et al., 2009; AMARAL et al., 2014). Importante salientar que essa queda da síntese e secreção hormonal não ocorre por apoptose dos pinealócitos (células da glândula pineal, a qual produz melatonina e está descrita no capítulo adiante) o que temos na realidade é um desarranjo metabólico da glândula em decorrência da hiperglicemia com consequente nível reduzido de melatonina circulante. Proporcionando, desta forma, um cenário de elevação do estresse oxidativo, ruptura dos ritmos biológicos e atenuação da ação da insulina, contribuindo ainda mais para o agravamento dos sintomas típicos da doença (AMARAL et al., 2014; RAMOS-LOBO; BUONFIGLIO; CIPOLLA-NETO, 2015; SHARMA et al., 2015). A insulina intensifica a síntese e secreção de melatonina em ratos através da modulação de enzimas envolvidas na sua via de síntese (GARCIA et al., 2008; 2010), sendo, portanto, fundamental sua presença para que tenhamos íntegra a produção do hormônio pineal.

1.4 Glândula pineal e melatonina

Durante muito tempo a glândula pineal foi assinalada somente como um órgão vestigial sem função específica. No século XVII a mesma foi descrita por René Descartes como a estrutura incumbida de distribuir os fluidos do encéfalo para os músculos. Em 1958 o dermatologista Aaron Lerner identificou e isolou um hormônio produzido na pineal, chamando-o de melatonina (ARENDR, 1995).

A gênese embriológica desta glândula se dá como uma evaginação dorsal do teto do terceiro ventrículo (EKSTROM e MEISSL, 2003) sendo uma pequena estrutura epitalâmica estabelecida dorsalmente à região caudal do diencéfalo, composta por tecido glandular detentor de células características denominadas pinealócitos. Em roedores, a pineal não é diretamente fotossensível e possui três porções distintas: a pineal profunda, o pedúnculo pineal e a pineal superficial (MOLLER, 1992) (**Figura 1**).

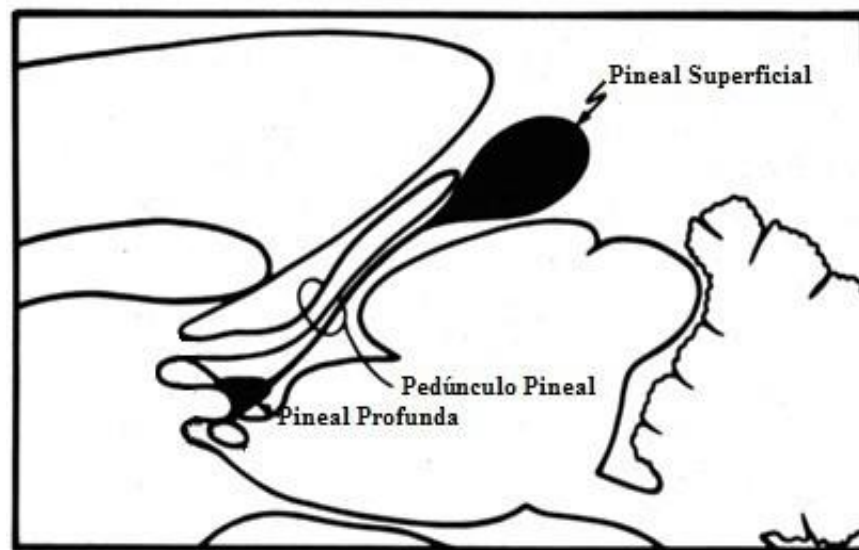


Figura 1. Localização anatômica da glândula pineal de rato apresentando suas três porções distintas: pineal superficial, pedúnculo pineal e pineal profunda (Modificado de Swanson, L.W. 1998).

A via neural que controla a síntese de melatonina tem início nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPV), estes estabelecem uma conexão com a coluna intermediolateral da medula espinhal (IML), para, então, através de neurônios pré-ganglionares simpáticos, enviar projeções sobre os gânglios cervicais superiores (GCS). Ali se originam os neurônios pós-ganglionares simpáticos responsáveis por inervar a glândula pineal (P). Esta via neural é temporizada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo que através de sinalização excitatória (glutamato) e inibitória (GABA) controla a atividade neural circadiana dessa via e, conseqüentemente, da produção de melatonina. A síntese deste hormônio se dá exclusivamente à noite devido à sincronização do NSQ ao ciclo de luminosidade ambiental, cuja informação é transmitida pela via retino-hipotalâmica (Figura 2).

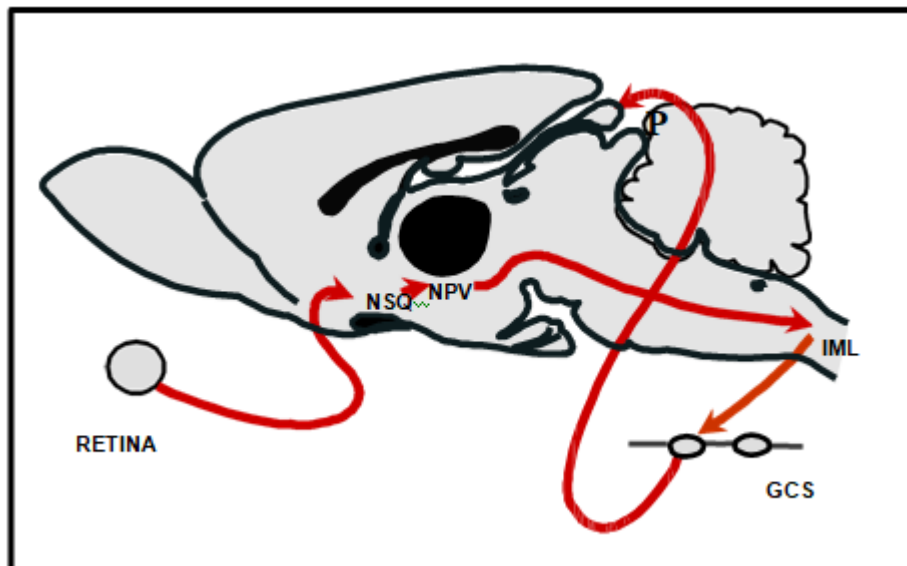


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização neural da síntese de melatonina em rato. NSQ: núcleo supraquiasmático; NPV: núcleo paraventricular; IML: coluna intermediolateral; GCS: gânglio cervical superior; P: glândula pineal (Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche, 2008).

A liberação de noradrenalina no interstício pineal e sua interação com os receptores adrenérgicos β_1 e α_1 , inicia a síntese e secreção da melatonina. Este hormônio está envolvido na regulação de diversas e importantes funções no organismo de inúmeras espécies. Pelo fato de a melatonina ser produzida e secretada na fase de escuro, de forma rítmica e consistente, tem o papel de sincronizador dos ritmos circadianos ou cronobiótico (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018). Questões como período reprodutivo, ciclo

atividade/repouso, sono/vigília e atividade do sistema imunológico estão atrelados aos ritmos secretórios desta indolamina (CIPOLLA-NETO e AFEICHE, 2008). A produção de melatonina varia com a duração do dia e da noite de tal forma que, noites mais longas (características do inverno) acarretam uma maior duração no tempo de secreção deste neuro- hormônio, enquanto que, ao contrário, noites mais curtas (características do verão) acarretam uma menor duração no seu período secretório. Essa característica funcional do sistema neural de controle da produção de melatonina pineal faz com que esse hormônio, adicionalmente, exerça o importante papel de um sincronizador sazonal para diversas funções críticas à sobrevivência do indivíduo e da espécie (REITER, 1993) (**Figura 3**).

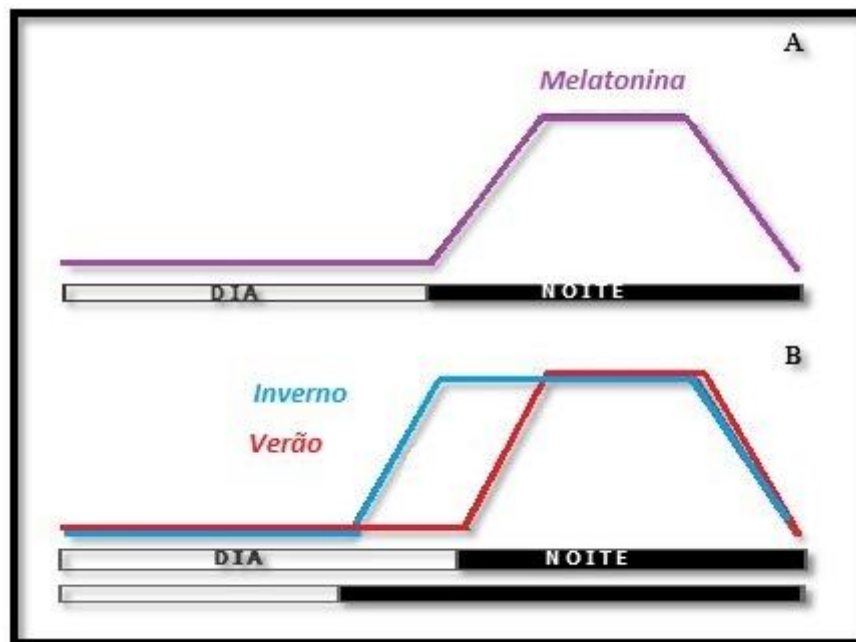


Figura 3. Representação esquemática da informação fotoperiódica transmitida pela síntese de melatonina em duas estações do ano, mostrando suas variações circadiana (A) e sazonal (B) (Adaptado de Cipolla- Neto e Afeche, 2008).

A síntese de melatonina na glândula pineal envolve um conjunto de reações enzimáticas que tem início com a hidroxilação do aminoácido triptofano, o qual é o precursor básico para produção do hormônio (KLEIN et al.,1997). Essa conversão a 5-hidroxitriptofano é feita pela enzima triptofano hidroxilase (TPH). O 5- hidroxitriptofano por sua vez, passa por uma descarboxilação (através de uma descarboxilase inespecífica) resultando na formação de serotonina. Posteriormente, a serotonina sofre a ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) sendo convertida em N-acetilserotonina. Finalmente o grupamento hidroxila da N-acetilserotonina é trocado por um

metil pela ação da enzima acetilserotonina metil transferase (ASMT), também chamada dehidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT), dando origem a melatonina (CIPOLLANETO et al., 1999) (**Figura 4**). A melatonina produzida é imediatamente liberada uma vez que, graças as suas características de solubilidade (anfifilicidade devido a presença dos grupamentos metoxi no carbono 5 e acetil, ligado ao nitrogênio do grupo amina) ela não é armazenada em vesículas no citoplasma dos pinealócitos.

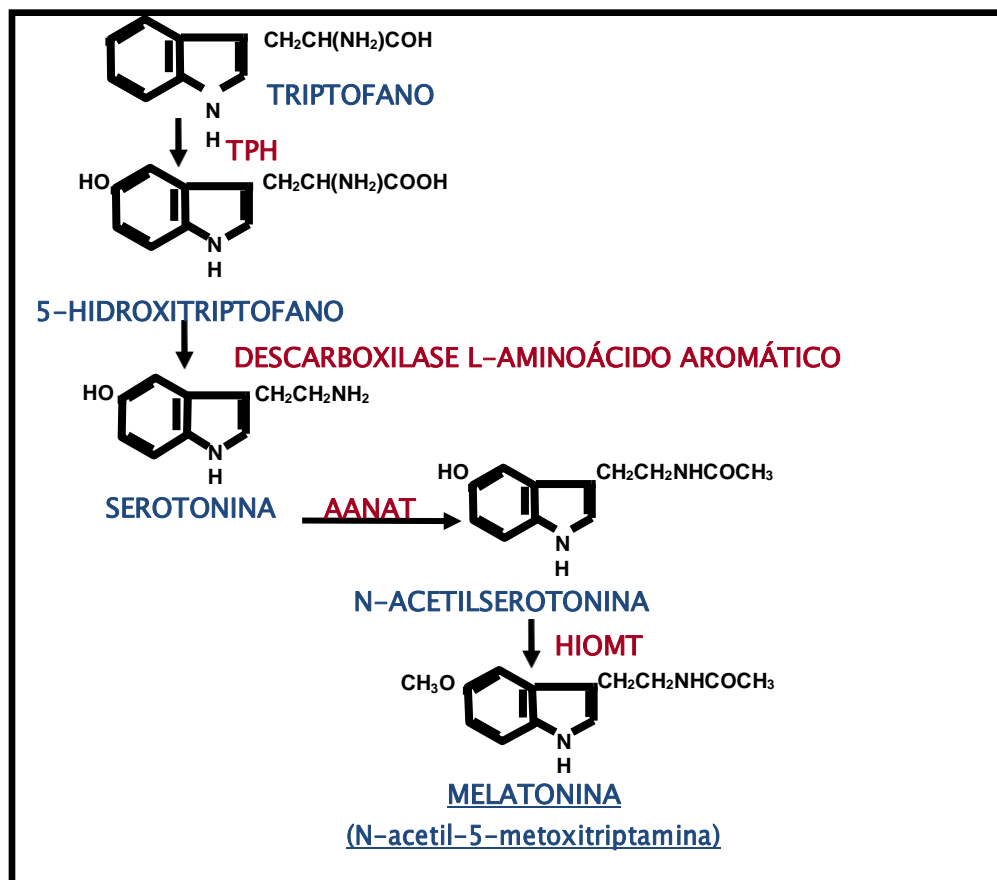


Figura 4. Via bioquímica com os precursores e o local de atuação das enzimas envolvidas na síntese de melatonina. TPH: triptofanohidroxilase; AANAT: arilalquilamina-N-acetiltransferase; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase (Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche, 2008).

A melatonina possui poderosa função antioxidante, uma vez que os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico apresentam capacidade redutora (CARPENTIERI et al., 2012; CIPOLLANETO e AFECHÉ, 2008) (**Figura 5**). Além da ação direta, a melatonina

exerce seus efeitos através da interação com receptores de membrana específicos de alta afinidade, MT1 e MT2, ambos ligados à proteína G (REPPERT; WEAVER; GODSON, 1996). Uma vez que a melatonina pode cruzar membranas celulares livremente, pode também atuar através da sua ligação a receptores nucleares da classe dos receptores órfãos do ácido retinóico, RZR-ROR, subtipos α e β (CARLBERG et al., 1995; CARDINALI et al., 1997). É importante salientar que os receptores para a melatonina estão presentes em mais de 110 regiões do encéfalo e em diversas estruturas periféricas (VANECEK, 1998). A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos em ratos, e a metabolização periférica de 90% desta ocorre principalmente pela transformação hepática em 6-hidroxi melatonina que após conjugação com sulfatos ou com glucoronídeos é eliminada na urina sob a forma de 6-sulfatoxi melatonina. (CIPOLLA-NETO e AFECHÉ, 2008).

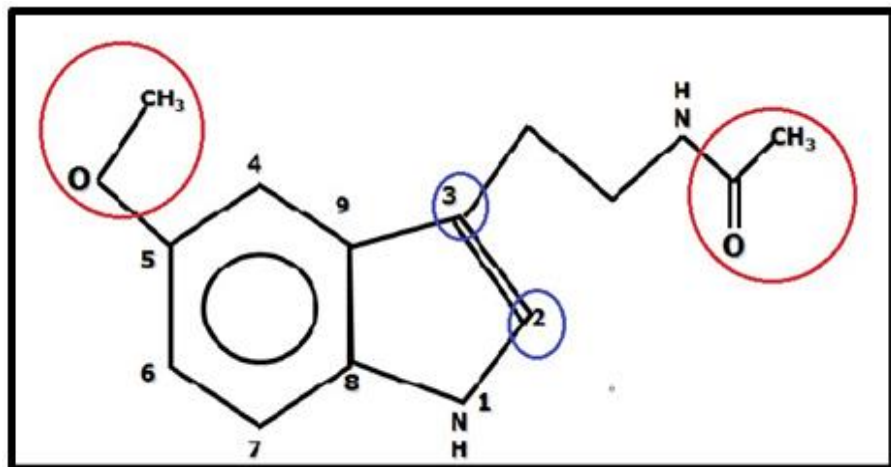


Figura 5. Esquema representativo da molécula de melatonina com destaque em vermelho para os grupamentos metoxi e amina (anfifilicidade) e em azul para os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico (antioxidante) (Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche, 2008).

Uma série de elegantes trabalhos colocam a melatonina como um agente que poderia exercer um importante papel na regulação da neurogênese e de processos inflamatórios no cérebro de roedores (RAMÍREZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; ESPOSITO e CUZZOCREA, 2010; RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011), visto que pode atuar aumentando a secreção de neurotrofinas como o Bdnf (Fator neurotrófico derivado do cérebro) e exercer ação proliferadora e diferenciadora de células progenitoras na zona subgranular do giro dentado do hipocampo (SGZ) (SOTTHIBUNDHU; PHANSUWAN-PUJITO; GOVITRAPONG, 2010), aumentando a viabilidade e facilitando a diferenciação destas em neurônios (RAMÍREZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; SARLAK et al., 2013) (**Figura 6**). Além de possuir propriedades antiinflamatórias (MAURIZ et al., 2013) por atuar na cascata de sinalização

desta via, principalmente sobre a enzima COX-2. Importante salientar também que como um potente agente antioxidante, contribuiu para a redução de eventuais quantidades elevadas de radicais livres, que sabidamente exercem influência negativa sobre a plasticidade cerebral e estão presentes no processo de inflamação (MANDA e REITER, 2010).

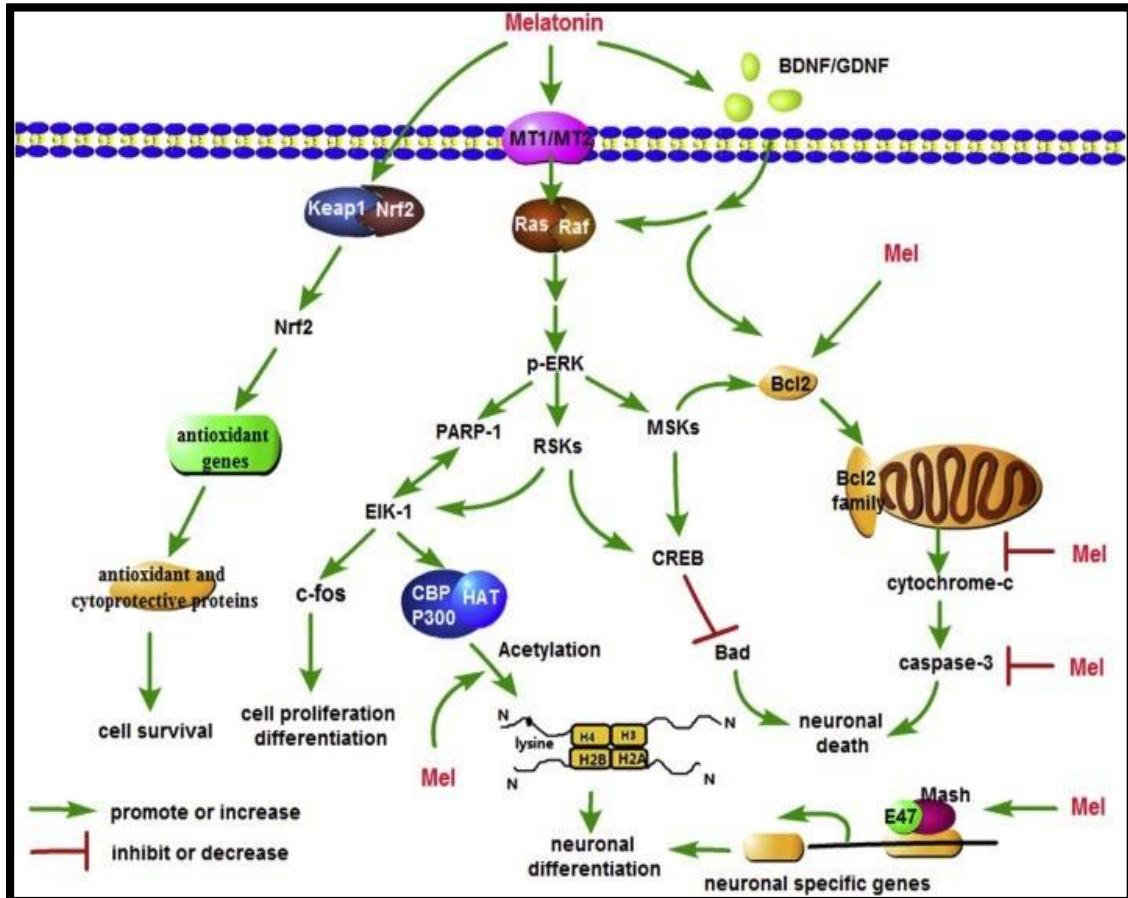


Figura 6. Esquema representativo dos mecanismos moleculares de ação do hormônio melatonina no processo de neurogênese (Retirado de CHU et al., 2016).

2 Justificativa

Trabalhos do nosso grupo e dados da literatura mostram que a síntese de melatonina pineal está reduzida em animais diabéticos, em decorrência da hiperglicemia. Em paralelo, observamos trabalhos que citam comprometimento da neurogênese cerebral nestes mesmos animais, com possível neuroinflamação presente. Sabendo do poderoso efeito neuroprotetor e neurotrófico da melatonina, além da sua ação anti-inflamatória, faz-se necessário avaliar se o tratamento farmacológico com esta indolamina é capaz de amenizar os danos cerebrais acarretados pela hiperglicemia crônica.

3 Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos terapêuticos da suplementação oral de melatonina sobre a neurogênese e possível neuroinflamação cerebral de ratos diabéticos tipo 2 da linhagem Goto-Kakizaki.

3.1 Objetivos específicos

- ▶ Avaliação da glicemia e peso dos animais diabéticos tratados ou não com melatonina;
- ▶ Avaliação, nos mesmos animais, da expressão gênica diária de proteínas envolvidas na neurogênese e neuroinflamação;
- ▶ Quantificação das mesmas mediante Western blot em diferentes pontos do dia.

4 Materiais e métodos

4.1 Animais

Os animais utilizados para experimentação foram ratos Wistar e ratos da linhagem Goto-Kakizaki, com 2 meses de idade e peso no início do protocolo experimental, entre 250 e 300g.

Estes animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), em caixas coletivas (46 x 24 x 20 cm, com 5 animais / gaiola), sob condições de temperatura ambiental controlada de 25°C e ciclo de iluminação claro / escuro (12 / 12h). Os animais foram divididos em 3 diferentes grupos:

- 1) Ratos Wistar (Controle);
- 2) Ratos diabéticos tipo 2 da linhagem Goto-Kakizaki (GK)
- 3) Ratos diabéticos tipo 2 da linhagem Goto-Kakizaki suplementados com melatonina (GK + Mel).

4.2 Determinação do peso corporal

Os ratos foram pesados em balança de prato (0 a 5 kg, Filizola) semanalmente, durante todo o período experimental.

4.3 Aferição da glicemia

O procedimento para aferição da glicemia consiste em obter uma pequena amostra de sangue da ponta do rabo dos animais, e pingá-la na tira reagente (OptiumBlood Glucose Test Strips, Medisense®, United Kingdom) conectada ao glicosímetro Optium Xceed® (Medisense®, United Kingdom) que afere a glicemia após 5 segundos de análise. O aparelho foi previamente calibrado de acordo com as instruções do fabricante e a cada troca de lote de tiras reagentes.

4.4 Suplementação de melatonina

Iniciamos a suplementação de melatonina após a confirmação da instalação do quadro de diabetes (que se dá por volta da 8ª semana de vida dos animais GK) e mantivemos a mesma por 3 meses, ininterruptamente. Os animais receberam a melatonina administrada por via oral solubilizada na água que o animal consumiu durante a fase de escuro do ciclo de iluminação ambiental, na dosagem de 3mg de melatonina / kg de peso corporal.

A melatonina foi inicialmente diluída em 40 µl de etanol absoluto, adicionando 960 µl de água para um volume final de 1 ml. Após este procedimento, a melatonina preparada foi solubilizada na água dos bebedouros, seguindo rigorosamente a proporção citada acima. Durante o período de claro, os animais receberam uma solução veículo preparada com 40 µl de etanol absoluto dissolvido em 100 mL de água. A reposição foi realizada em grupo, colocando-se diversos bebedouros na gaiola de modo que todos os animais tiveram acesso à água.

4.5 Eutanásia e extração dos tecidos

Ao final do protocolo (após a instalação do quadro de diabetes do tipo 2 e 3 meses de suplementação com melatonina), os animais foram eutanasiados em seis diferentes períodos do dia (ZTs 0, 4, 8, 12, 16, 20), por decapitação. Em seguida realizamos a coleta de sangue (aproximadamente 3 mL) em tubos heparinizados. O plasma foi obtido mediante centrifugação refrigerada a 4°C e 2000 rpm durante 10 minutos. Os tecidos de interesse (hipocampo, hipotálamo e glândula pineal) foram extraídos para estudos e testes biológicos. Todos os materiais foram armazenados em freezer -80°C até análise. Foram realizados dois blocos experimentais nestes moldes.

4.6 Extração de RNA

Para realização da extração do RNA, as amostras de hipocampo e hipotálamo foram mantidas em gelo seco, para que seu RNA não se degradasse, em seguida cada amostra foi homogeneizada em 800 μL de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) com o auxílio de um pistilo. Esse macerado foi então deixado durante 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se em cada amostra 160 μL de clorofórmio e estas, posteriormente, foram submetidas a homogeneização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, EUA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 10 minutos (com homogeneização a cada 2 minutos no aparelho acima citado) e então levadas à centrifuga refrigerada (5417R, Eppendorf, Alemanha) durante 15 minutos a 4 °C e 12000 g. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e em cada uma foi acrescentado 400 μL de isopropanol, para então, irem mais uma vez à centrífuga durante 20 minutos a 4 °C e 12000 g, onde obtemos a formação do precipitado. Após a centrifugação dispensou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 800 μL de álcool etílico gelado a uma concentração de 75%. A seguir as amostras foram levadas novamente à centrífuga durante 10 minutos a 4 °C e 12000 g. O precipitado foi então localizado e o sobrenadante descartado, as amostras foram deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente, para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, foi adicionado em cada amostra 12 μL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para dissolução do precipitado. As amostras sofreram então uma rápida centrifugação, para termos certeza de que o precipitado foi dissolvido. Após, as amostras foram armazenadas a -80 °C até a realização do tratamento com DNase.

Após a extração de RNA, as amostras sofreram tratamento com DNase, utilizando-se o kit Turbo DNA-free® (Ambion, Austin, Texas, EUA). Como o volume final da amostra foi de 12 μL , foi adicionada à própria amostra 1,2 μL da enzima Turbo DNase e 1 μL de Tampão Turbo DNase. As amostras foram então misturadas por inversão e levadas à centrífuga para uma rápida centrifugação. Em seguida, deixadas a 37 °C por 30 minutos. Ao término desse período as amostras foram imediatamente colocadas em gelo, quando se adicionou 2,2 μL do reagente de inativação do kit. Foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos, com homogeneização constante. A seguir foram centrifugadas por 1,5 minutos e 10000 g. O sobrenadante foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs, e o precipitado foi então descartado.

As amostras livres de DNA foram quantificadas no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific, EUA). Os dados obtidos a partir dessa análise foram utilizados para calcular o volume necessário da amostra oriunda da extração de RNA total (concentração de 1 µg/µL de RNA em um volume final de 11 µL) e para aferir a qualidade da amostra (amostras com razão 260/280 menor que 1,8 não foram utilizadas).

4.7 Obtenção de cDNA

Com o RNA extraído, mensurado e avaliado, o passo seguinte consistiu na obtenção do cDNA através da reação de transcriptase reversa, para tal utilizou-se kit SuperScript® III Antisense Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Às amostras foi adicionado 1 µL de dNTPmix e 1 µL de *randomprimers*, tendo portado como volume final 13 µL. As mesmas foram colocadas no termociclador MyGene Series Gradient ThermalCycler (LongGene®, EUA) que foi programado de acordo com as seguintes especificações de ciclo descritas pelo fabricante do kit: 65 °C por 5 minutos (momento no qual as amostras foram retiradas e à elas adicionou-se 7 µL de um mix previamente preparado), 25 °C por 5 minutos, depois a 50 °C por 60 minutos e por fim 70 °C por 15 minutos para a desnaturação da enzima. O mix continha para cada amostra: 4 µL de tampão de enzima, 1 µL de DDT, 1µL de transcriptase reversa e 1 µL de H₂O estéril. Ao término da reação as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.8 PCR *real time*

A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 0,96 µL de cDNA previamente sintetizado, que foi adicionado à mistura da reação (Mix) contendo 12,5 µL de *Power SYBR® Green* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA), 8,5 µL de água MilliQ e 10 µM dos *primers* específicos para cada gene.

Os parâmetros de amplificação serão os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 50 °C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos, 2) 40 ciclos que incluem a desnaturação a 95 °C por 15 segundos; o anelamento dos *primerse* a extensão a 60 °C por 1 minuto 3) 1 ciclo para análise do *melting* que consiste em 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de *melting*.

O limiar para desconsideração do ruído na fluorescência de cada amostra será determinado automaticamente pelo software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A sequência genômica dos *primers* utilizados se encontra a seguir, com os genes de interesse em preto e os genes constitutivos em vermelho, desenhados a partir das informações obtidas pela Genbank™ (NCBI–NIH, Bethesda, EUA).

<i>Primer</i>	<i>Sequências</i>
<i>Dcx</i>	5'-AGCAAATCCCATGTTGTCCA-3' 5'-TTCAACAGTCCTCATGCCCA-3'
<i>Ki-67</i>	5'-GGGAGGACTCGCAGTTTGAG-3' 5'-AACGCTCTCTGAAAGCCACA-3'
<i>Vegf</i>	5'-CTGCTCTCTTGGGTGCACTGG-3' 5'-GGTTTGATCCGCATAATCTGCAT-3'
<i>Gfap</i>	5'-CAAGATGAAACCAACCTGAGGCT-3' 5'-GGCTTGGCCACATCCATC T-3'
<i>NeuN</i>	5'-CCACTGAGGGAGACAAGAATA-3' 5'-AATTGCTGCAGAGACAGAGA-3'
<i>Iba1</i>	5'-GTCCTTGAAGCGAATGCTGG -3' 5'-CATTCTCAAGATGGCAGATC-3'
<i>Bdnf</i>	5'-CACTTTTGAGCACGTGATCGA-3' 5'-AGAAGGTTTCGGCCCAACG-3'
<i>Cx3cl1</i>	5'-CGAGTTCTGCTGTCTACCAATCTG-3' 5'-GAAGTGGTGGACGCTTGAGTAG-3'
<i>Caspase 3</i>	5'-TACCCTGAAATGGGCTTGTGT-3' 5'-GTTAACACGAGTGAGGATGTG-3'
<i>IL1β</i>	5'-AAATGCCTCGTGCTGTCTGA-3' 5'-AGGCCACAGGGATTTTGTGCG-3'
<i>TNFα</i>	5'-CTGTGCCTCAGCCTCTTCTC-3' 5'-ACTGATGAGAGGGAGCCCAT-3'
<i>β-actina</i>	5'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3' 5'-AAGACCTCTATGCCAACACAGTG-3'
<i>Hdac</i>	5'-TACCCTATTGAGCACGGCAT-3' 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'
<i>Ppia</i>	5'-CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG-3' 5'-GCCACTGTTTTTCATGCAGGAAC-3'

4.9 Western blot

Os tecidos hipocámpal e hipotalâmico foram rapidamente lisados pela adição de 300 μ L, de tampão RIPA com cocktail de inibidor de protease (Roche Diagnostics) e 10% de PMSF 0,1M. Tampão Laemeli (BioRad) foi adicionado aos extratos proteicos na proporção de 1:2, seguindo-se de aquecimento das amostras a 95°C por 5 minutos. Alíquotas destas amostras foram separadas por SDS-PAGE (20 μ g/poço). As proteínas separadas foram transferidas imediatamente, eletroforéticamente, para membranas de nitrocelulose utilizando-se o kit de transferência e equipamento FASTBLOT (BioRad) conforme instruções do fabricante. Membranas foram bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente com 5% de BSA em TBST [20 mM Tris-HCl(pH 7,6) contendo 150 mM NaCl e 0,1% de Tween 20. Em seguida, membranas foram incubadas, overnight a 4°C, com os seguintes anticorpos primários (diluição 1:1.000): Dcx (Santa Cruz Biotechnology), Caspase 3 (Abcam), Iba1 (Santa Cruz Biotechnology), NeuN (Merck Millipore), IL1 β (Abcam) e γ -Tubulina (Abcam). Membranas foram então incubadas com os anticorpos secundários conjugados a fluorescentes (Invitrogen, diluição 1:10.000) em TBST por 1 h a temperatura ambiente. A fluorescência das bandas foi detectada através do equipamento ODYSSEY (Licor). Blots foram normalizados pelo constitutivo γ -Tubulina e a densidade óptica das bandas foi determinada através do software Image J (NIH).

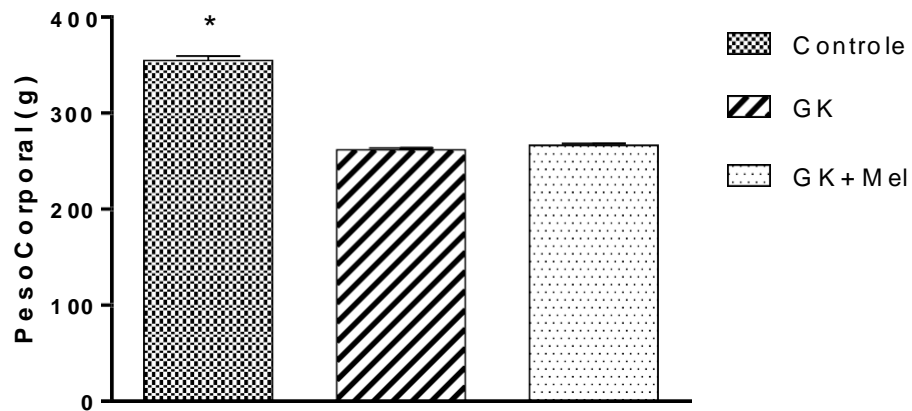
4.10 Análise estatística

As análises estatísticas, escolhidas de acordo com o desenho experimental, foram realizadas utilizando-se o programa computacional Prisma v 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 Resultados

Figura 7 - Peso corporal no início do protocolo experimental

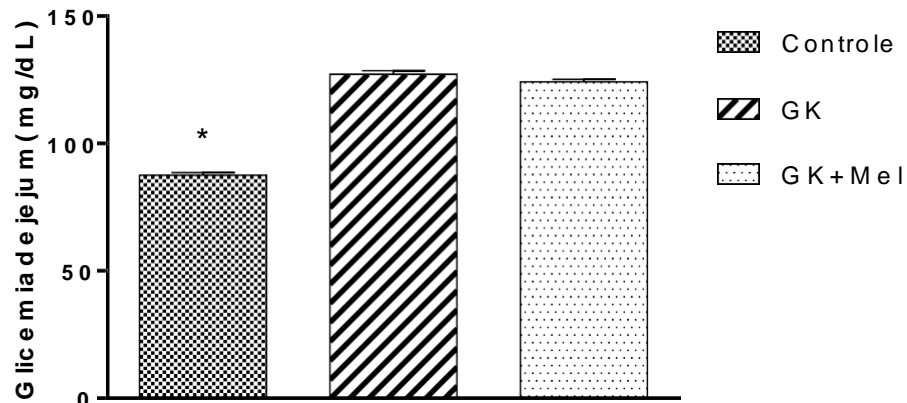
Na figura 7 observamos o peso dos animais Controle e Goto-Kakizaki. Observe que o grupo GK+ Mel é o grupo na fase inicial, antes da introdução do tratamento com melatonina por 3 meses.



Peso corporal dos animais no início do protocolo experimental. Valores expressos em gramas (g), representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. $n=40$ para os animais do grupo Controle, $n=45$ para os animais dos grupos GK e GK+ Mel. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 8- Glicemia de jejum no início do protocolo experimental

Na figura 8 observamos a glicemia de jejum do grupo Controle, GK e GK + Mel. Observe que o grupo GK+ Mel é o grupo na fase inicial, antes da introdução do tratamento com melatonina por 3 meses.

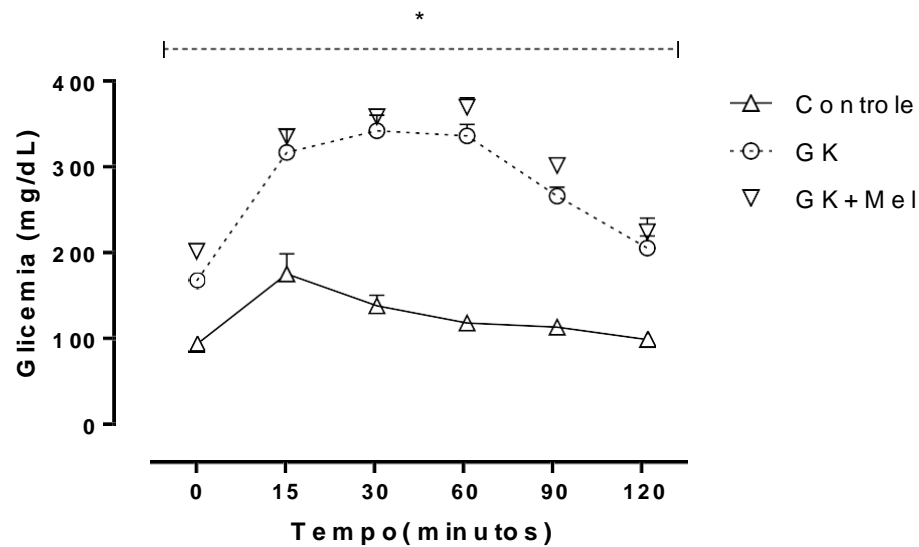


Glicemia após 10 horas de jejum diurno, no início do protocolo experimental. Valores expressos em mg/dl, representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n=40 para os animais do grupo Controle, n=45 para os animais dos grupos GK e GK + Mel. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 9 – Teste de tolerância à glicose (GTT) no início do protocolo experimental

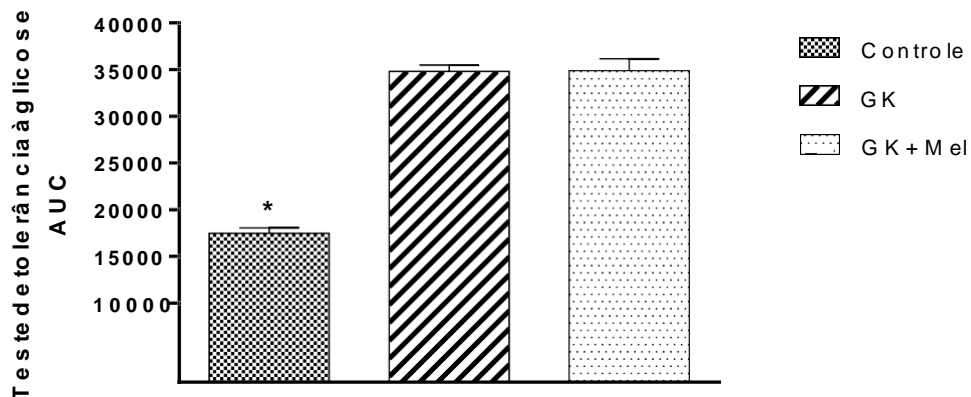
No GTT, observamos que os animais GK apresentaram intolerância à glicose quando comparados ao grupo Controle no início do protocolo experimental. Observe que o grupo GK+Mel é o grupo na fase inicial, antes da introdução do tratamento com melatonina por 3 meses.

A



Teste de tolerância à Glicose (GTT) realizado no ZT 10 antes do protocolo experimental. Valores expressos em mg/dl, representados com média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias, n=9. * Controle vs GK e GK + Mel em todos os pontos.

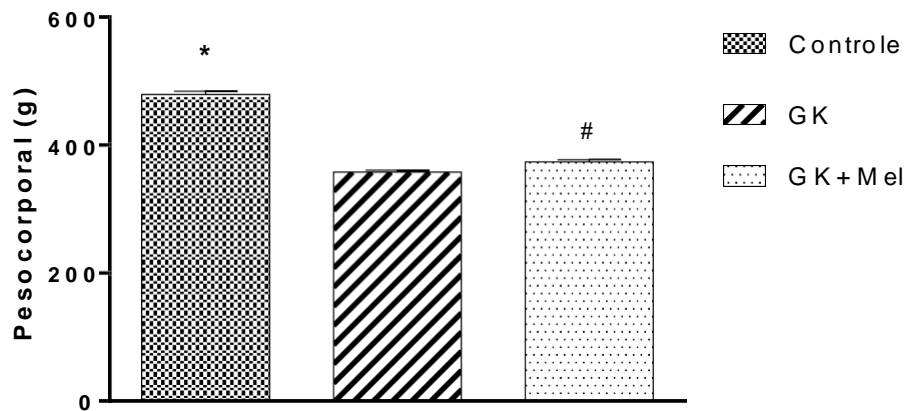
B



Área sob a curva (AUC) do GTT no início do protocolo experimental. Valores expressos em mg/dl, representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias, n=9. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 10 - Peso corporal no término do protocolo experimental

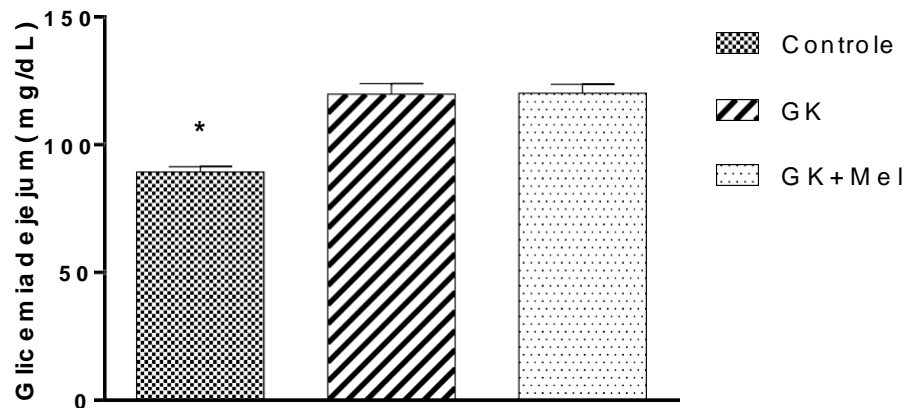
Na figura 10 observamos o peso dos animais do grupo Controle, bem como GK e GK + Mel após 3 meses de suplementação de melatonina, aqui observamos que o grupo Controle se mantém mais pesado que os demais grupos, entretanto, o grupo GK + Mel, teve uma elevação do peso corpóreo quando comparado ao grupo GK.



Peso corporal dos animais no término do protocolo experimental. Valores expressos em gramas (g), representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n=40 para os animais do grupo Controle, n=45 para os animais dos grupos GK e GK+ Mel. * Controle vs GK e GK + Mel. # GK + Mel vs GK.

Figura 11 - Glicemia de jejum no término do protocolo experimental

Na figura 11 observamos a glicemia de jejum do grupo Controle, GK e GK + Mel, após 3 meses de suplementação de melatonina, a mesma não foi alterada pela administração desta indolamina via oral (GK + Mel), portanto, ambos grupos de animais GK permaneceram hiperglicêmicos

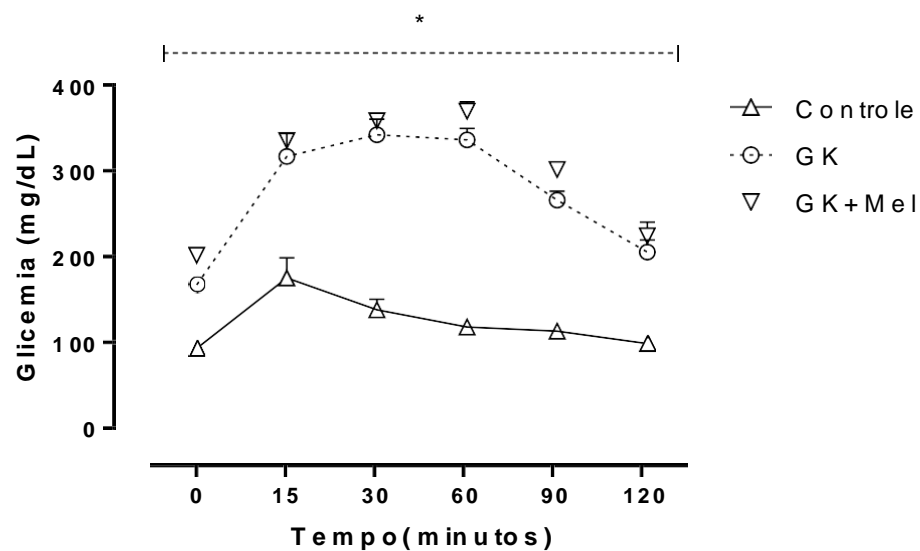


Glicemia após 10 horas de jejum diurno, no término do protocolo experimental. Valores expressos em mg/dl, representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n=10 por grupo. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 12 – Teste de tolerância à glicose (GTT) na décima semana do protocolo experimental

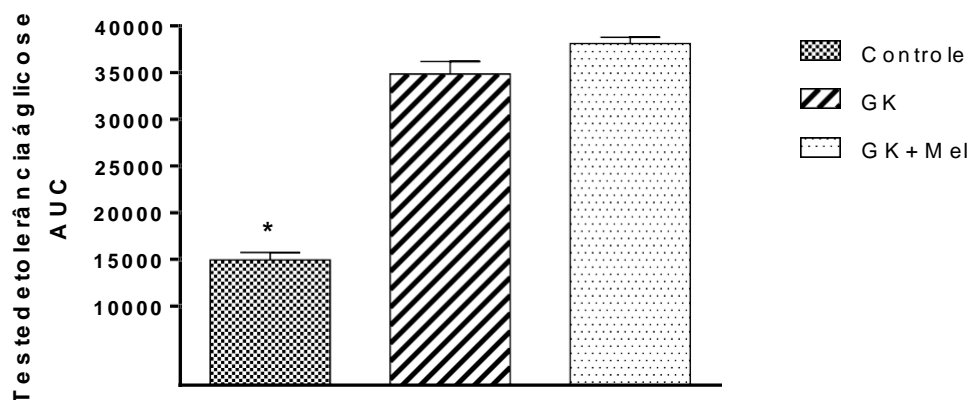
No GTT após 3 meses de suplementação de melatonina, observamos que os animais GK tratados com a indolamina em questão ainda apresentaram intolerância à glicose na mesma proporção dos animais GK não tratados. A diferença se dá apenas com relação aos animais Controle.

A



Teste de tolerância à Glicose (GTT) realizado no ZT 10 na decimal semana do protocolo experimental. Valores expressos em mg/dl, representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n=9$. * Controle vs GK e GK + Mel.

B

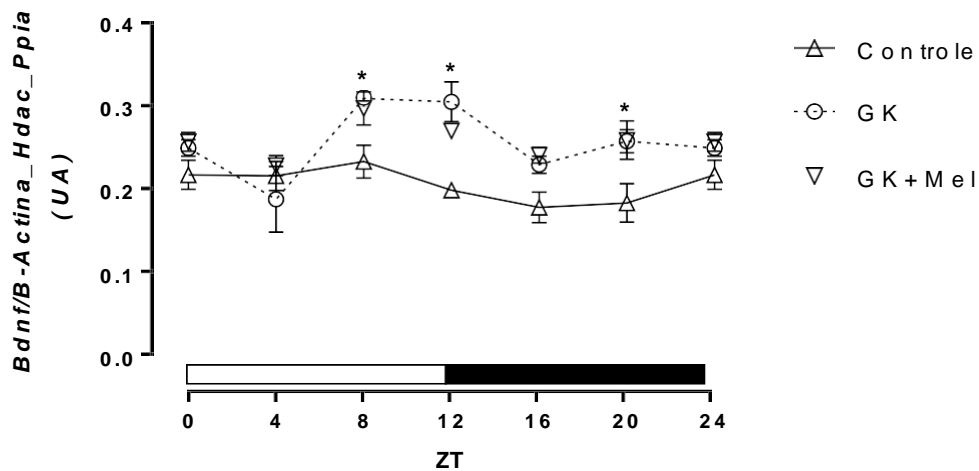


Área sob a curva (AUC) do GTT no início do protocolo experimental. Valores expressos em mg/dl, representados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n=9$. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 13 - Expressão gênica diária commédiadas fase de claro, escuro e média nas 24h de *Bdnf* no hipocampo dos animais

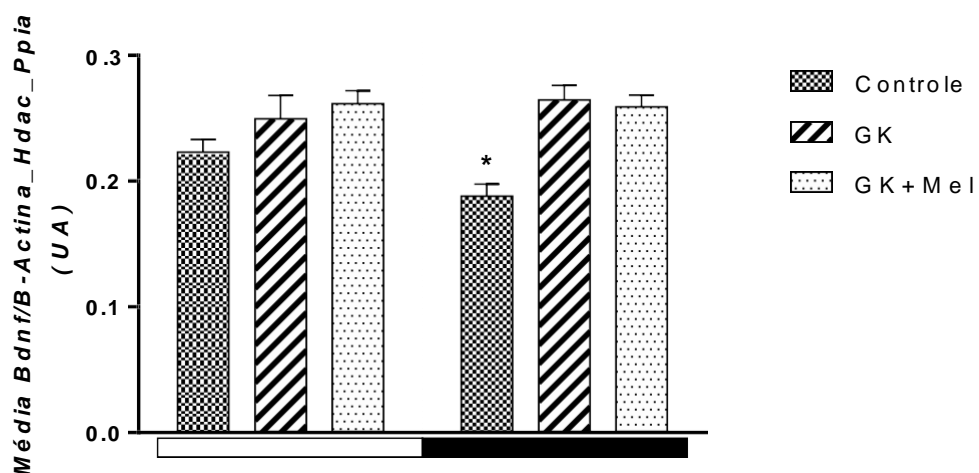
Na figura 13 observamos dados referentes ao “fator neurotrófico derivado do cérebro” (*Bdnf*) no hipocampo dos animais. Esta é a principal neurotrofina do sistema nervoso central e está diretamente envolvida nos processos de neurogênese e neuroproteção. No ZT 8, 12 e 20 os grupos GK e GK + Mel apresentam maior expressão gênica do que o grupo Controle. Notamos diferença também na média da fase escura e na média das 24h.

A



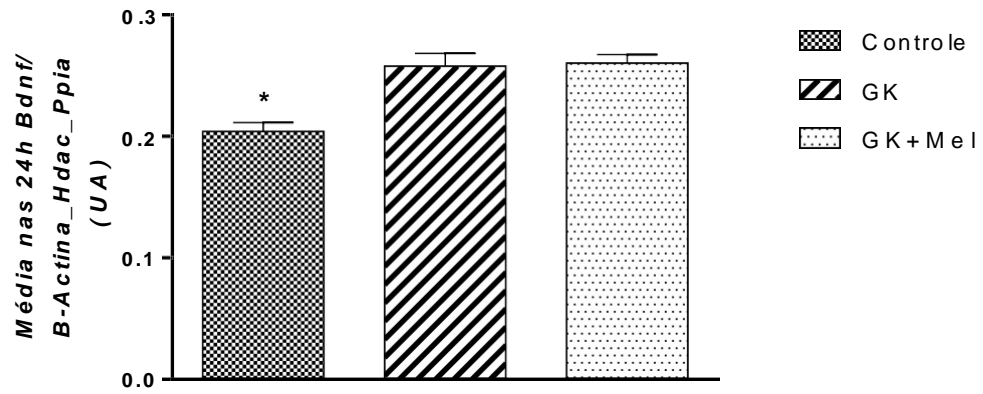
Análise da expressão gênica diária de *Bdnf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n = 5$ a 7 por grupo e por ZT. *Controle vs GK e GK + Mel.

B



Análise da média nas fase de claro e escuro da expressão gênica de *Bdnf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. $n = 30$ a 42 por grupo e por período. * Controle (fase escura) vs GK e GK + Mel (fase escura).

C

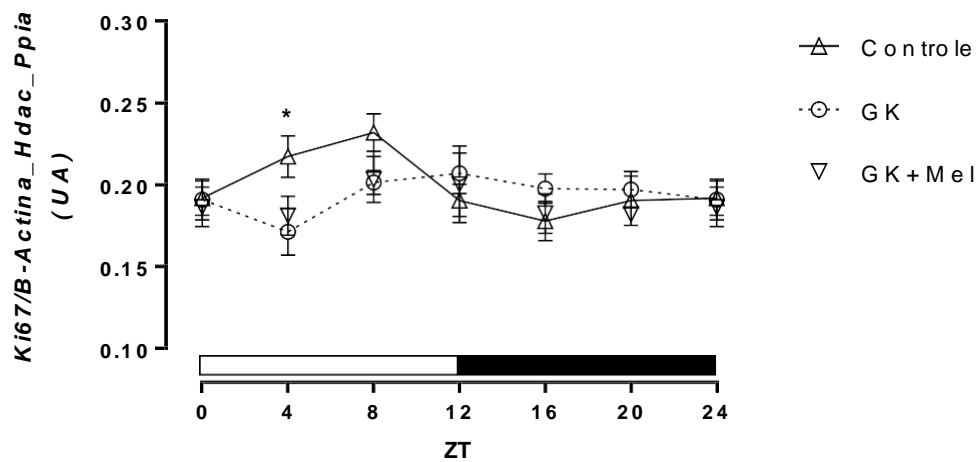


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Bdnf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 14 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Ki67* no hipocampo dos animais

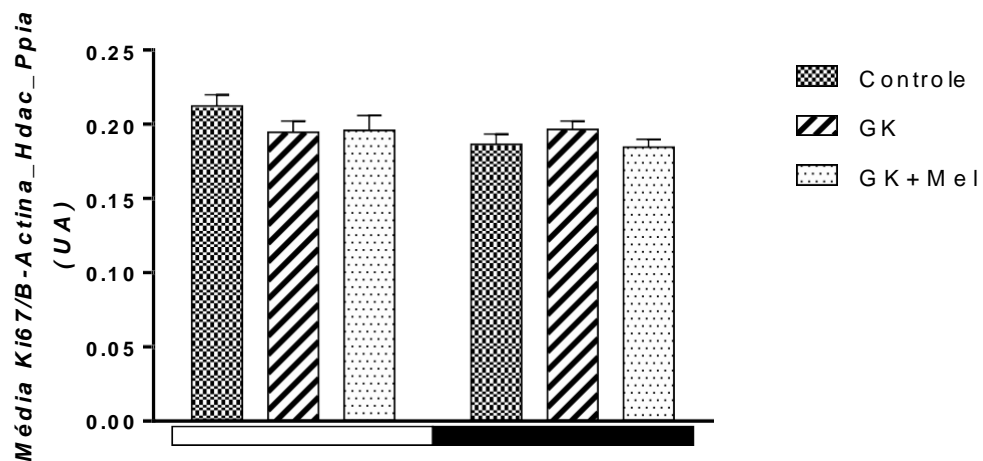
Na figura 14 observamos a expressão gênica de *Ki67* no hipocampo dos animais. Esta é uma proteína nuclear associada a proliferação, expressa nas fases G1, S e G2 do ciclo celular. Observamos diferença estatística no ZT 4, entre o grupo Controle e o grupo GK, fato que não se repete nos demais pontos, tampouco nas médias.

A



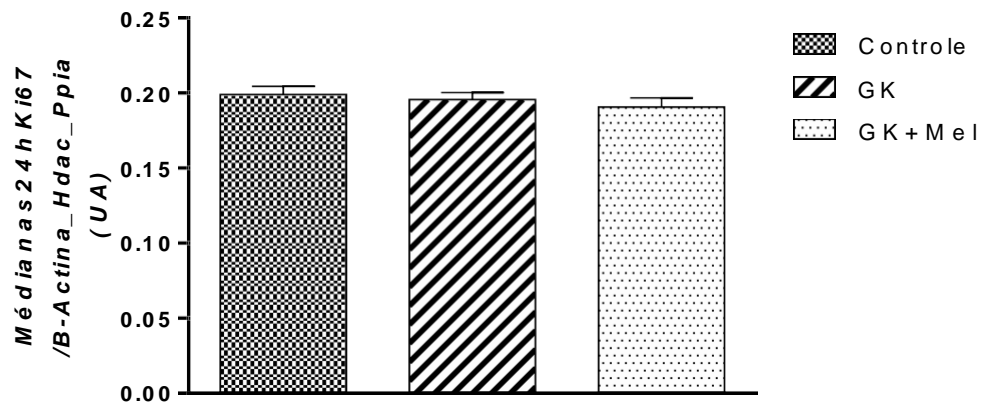
Análise da expressão gênica diária de *Ki67*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.*Controle vs GK.

B



Análise da média nos fases de claro e escuro da expressão gênica de *Ki67*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

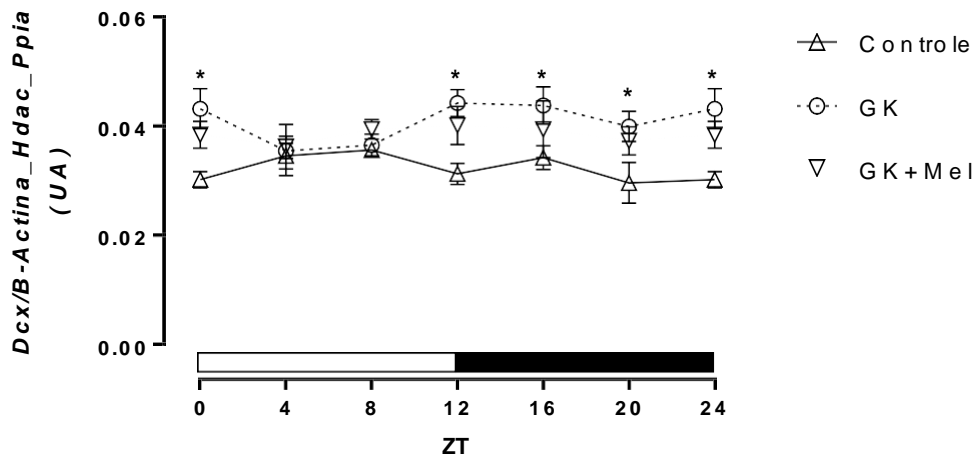


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Ki67*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 15 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Dcx* no hipocampo dos animais

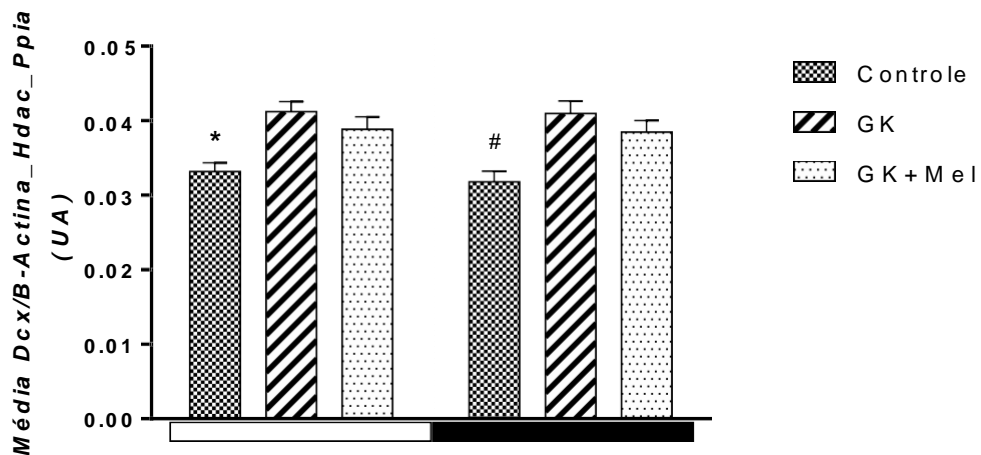
Na figura 15 observamos a expressão gênica de *Dcx*, hipocampo dos animais. Esta proteína está associada aos microtúbulos de neurônios imaturos, e portanto é utilizada como indicador de neurogênese. Observamos diferença estatística no mRNA em 5 pontos ao longo do dia entre os grupos Controle e GK. Nas médias também nota-se discrepância entre os grupos Controle e ambos grupos de animais GK.

A



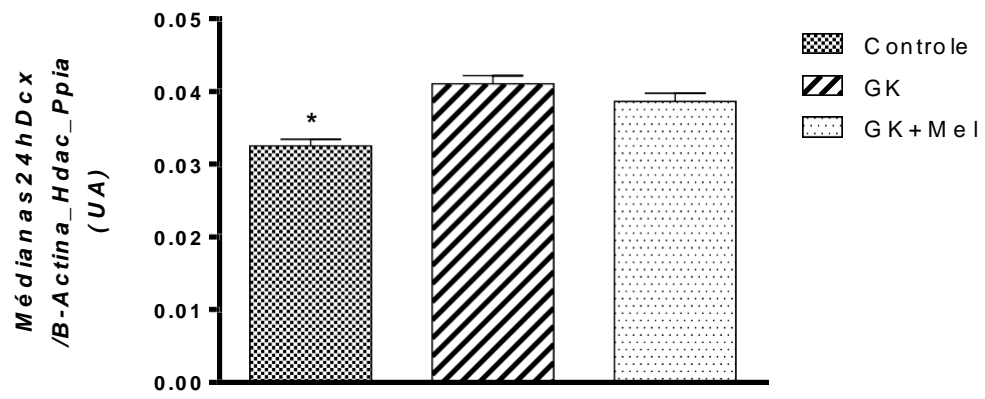
Análise da expressão gênica diária de *Dcx*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT. *Controle vs GK

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Dcx*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período. * Controle (claro) vs GK e GK + Mel (claro). # Controle (escuro) vs GK e GK + Mel (escuro).

C

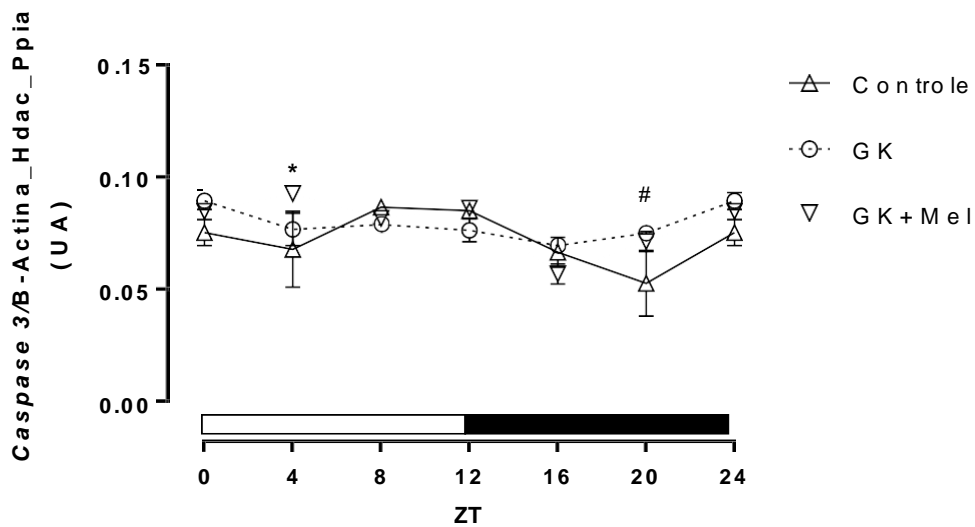


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Dcx*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 16 - Expressão gênica diária com média nas fases de claro, escuro e média nas 24h de *Caspase 3* no hipocampo dos animais

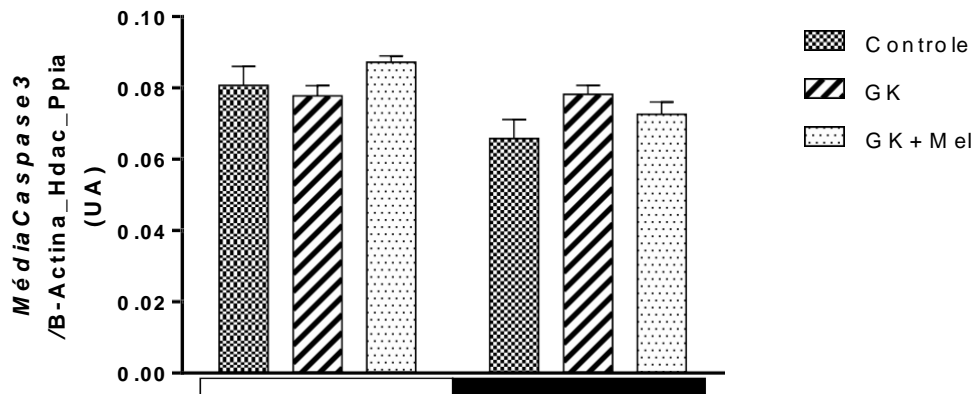
Na figura 16 observamos a expressão gênica de caspase 3 no hipocampo dos animais. Caspases são um grupo de proteases diretamente envolvidas no processo de apoptose celular, aqui, encontramos diferença no ZT 4 entre os grupos Controle e GK + Mel e no ZT 20 entre os grupos Controle e GK. Nas médias não houve qualquer diferença estatística.

A



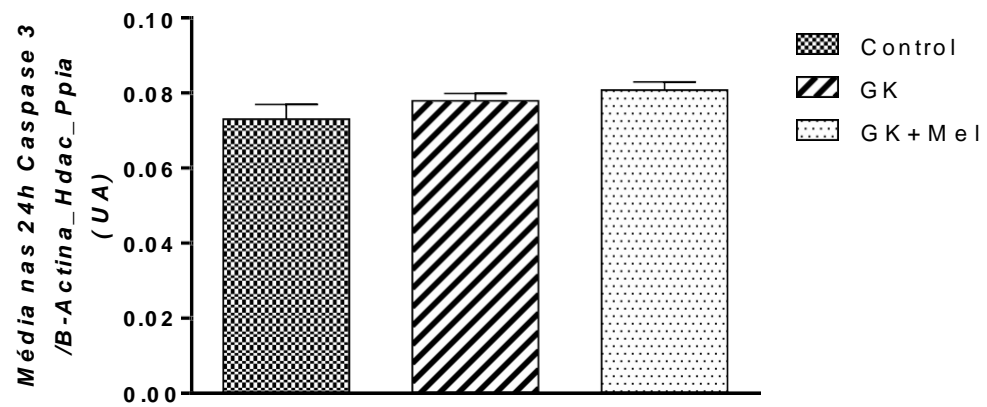
Análise da expressão gênica diária de *Caspase3*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.* Controlevs GK + Mel. # Controlevs GK.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Caspase 3*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

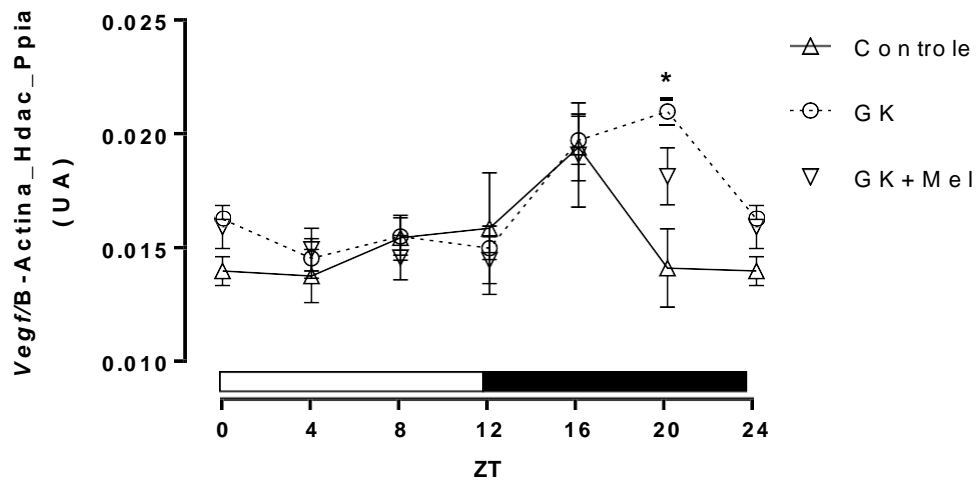


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Caspase 3*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 17 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Vegf* no hipocampo dos animais

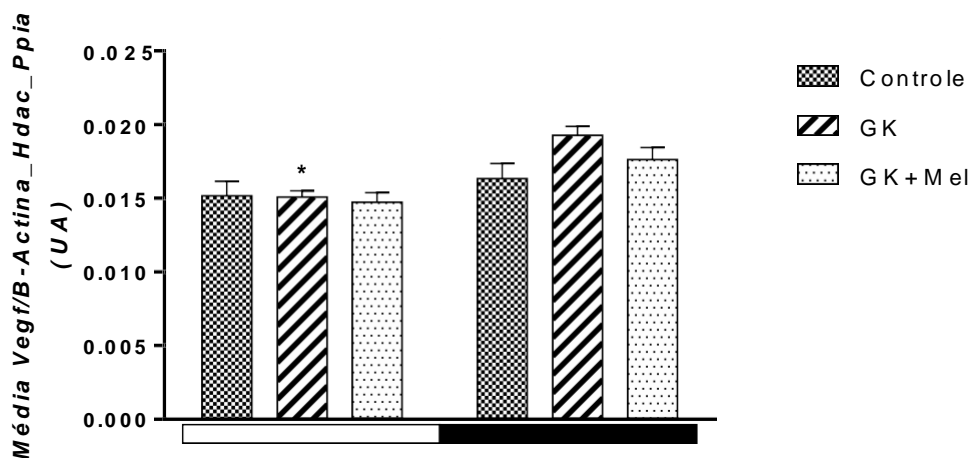
Na figura 17 observamos a expressão gênica de *Vegf* (Fator de crescimento derivado do endotélio) no hipocampo dos animais. Esta proteína possui importante papel no desenvolvimento vascular, bem como no processo de neurogênese. Aqui temos uma diferença entre os grupos Controle e GK no ZT 20. Ainda, nas médias das fases clara e escura, observamos diferença no grupo GK.

A



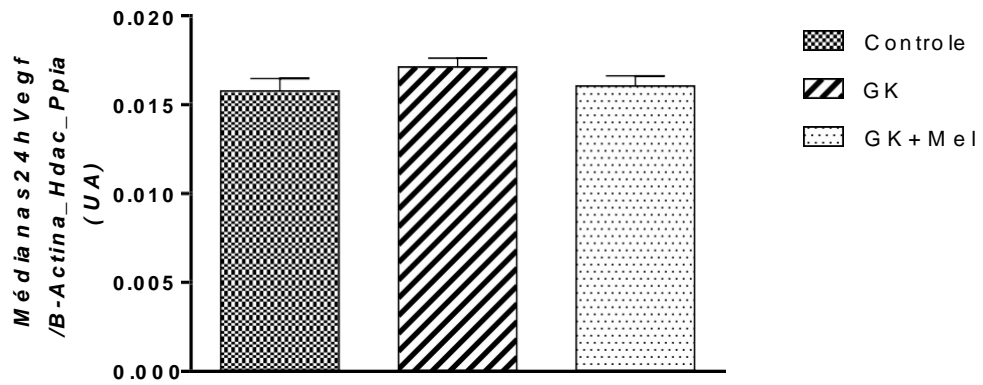
Análise da expressão gênica diária de *Vegf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.* Controle vs GK.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Vegf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.* GK (claro) vs GK (escuro).

C

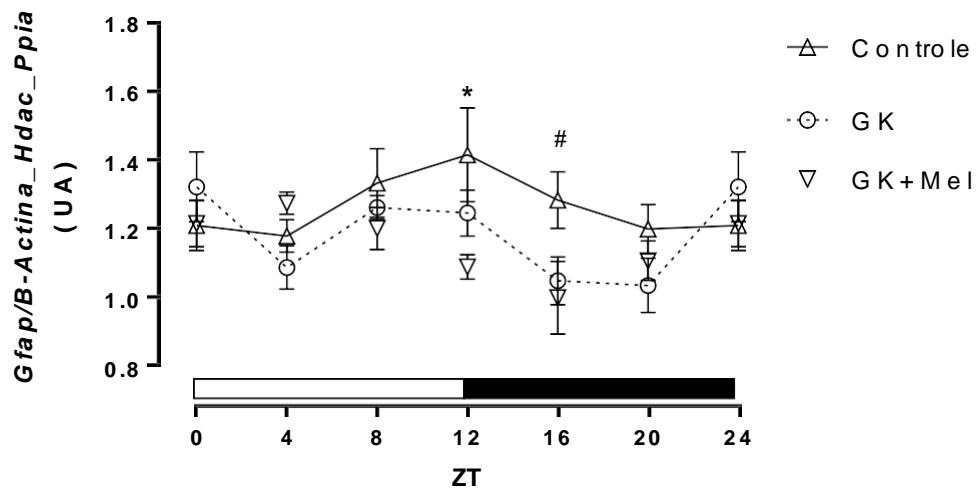


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Vegf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 18 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Gfap* no hipocampo dos animais

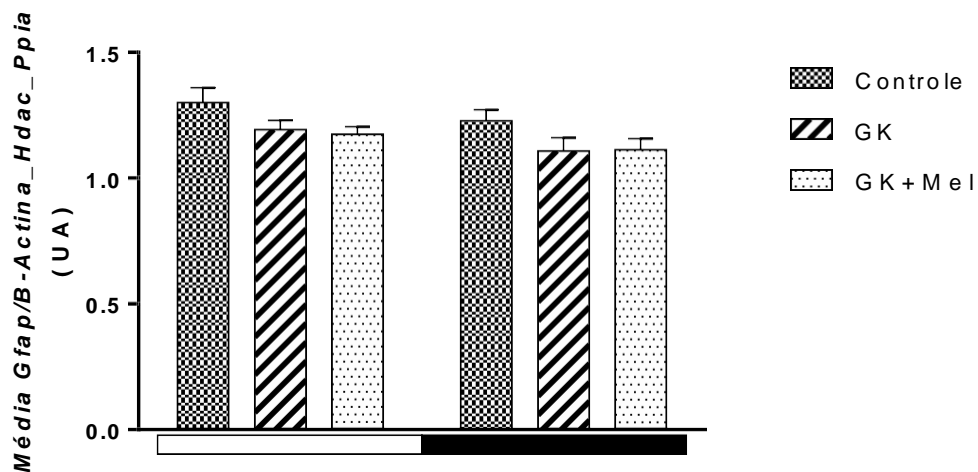
Na figura 18 observamos a expressão gênica de *Gfap* no hipocampo dos animais. Esta proteína está presente principalmente em astrócitos, entretanto, a encontramos também em células tronco neurais. Observa-se diferença no ZT 12 entre os grupos Controle e GK + Mel, no ZT 20 observa-se diferença entre os grupos Controle e ambos grupos de animais GK. Voltamos a observar discrepância somente na média das 24h, com maior expressão nos animais Controle.

A



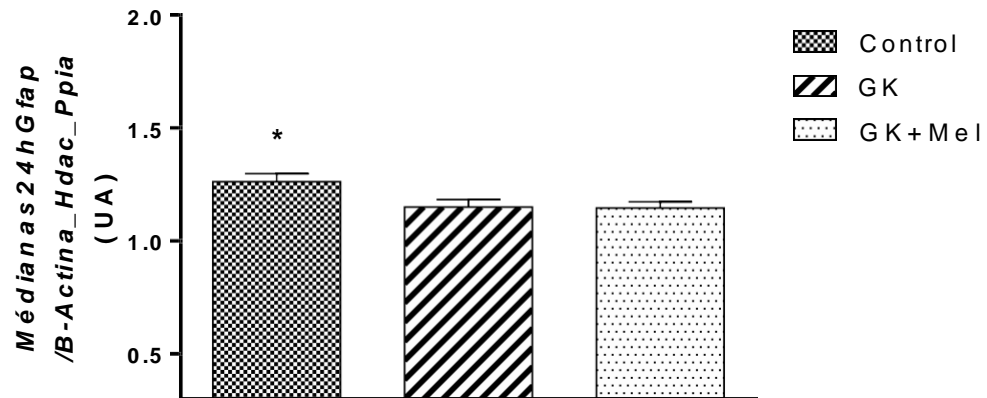
Análise da expressão gênica diária de *Gfap*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.*Controle vs GK + Mel. # Controle vs GK e GK + Mel.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Gfap*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

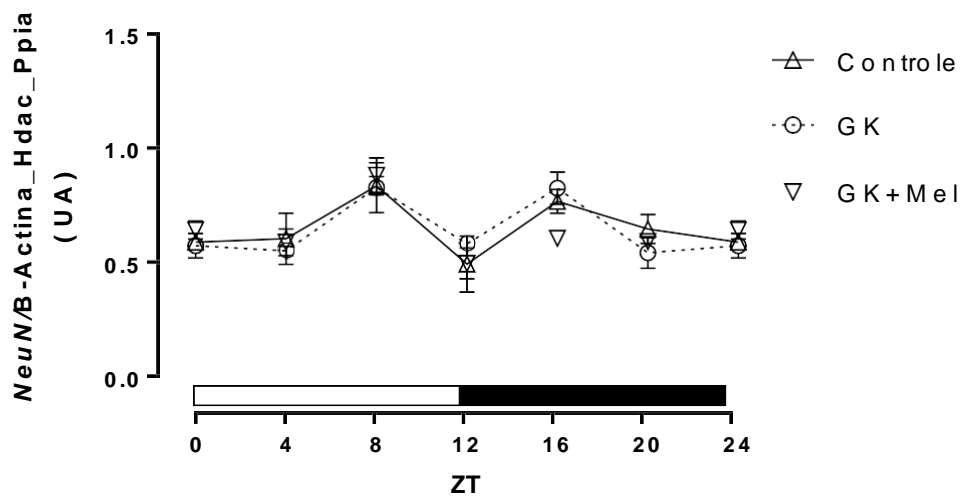


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Gfap*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 19 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *NeuN* no hipocampo dos animais

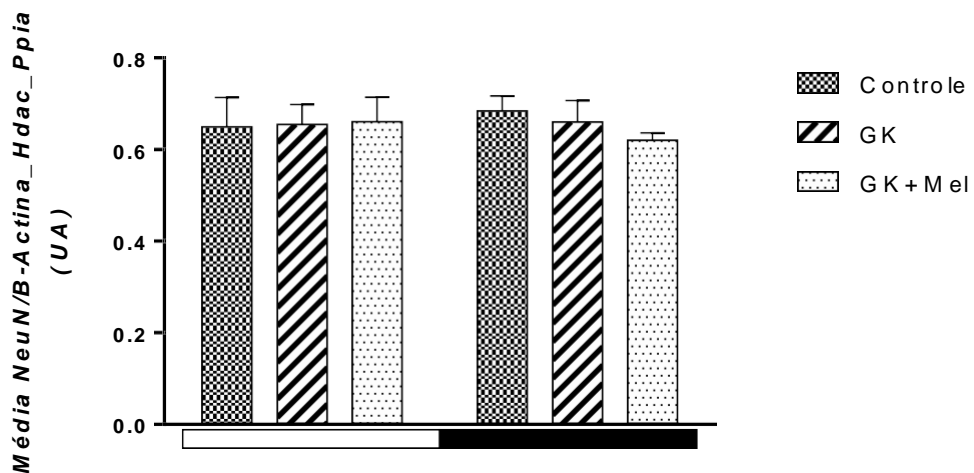
Na figura 19 observamos a expressão gênica de *NeuN* no hipocampo dos animais. Esta proteína é expressa no núcleo de neurônios e é amplamente utilizada na literatura como marcador neuronal. Não observamos diferença estatística em nenhuma das análises.

A



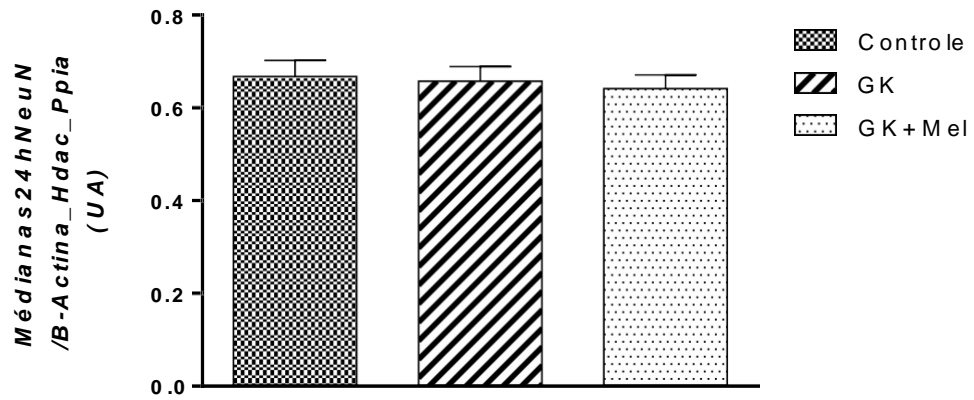
Análise da expressão gênica diária de *NeuN*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *NeuN*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

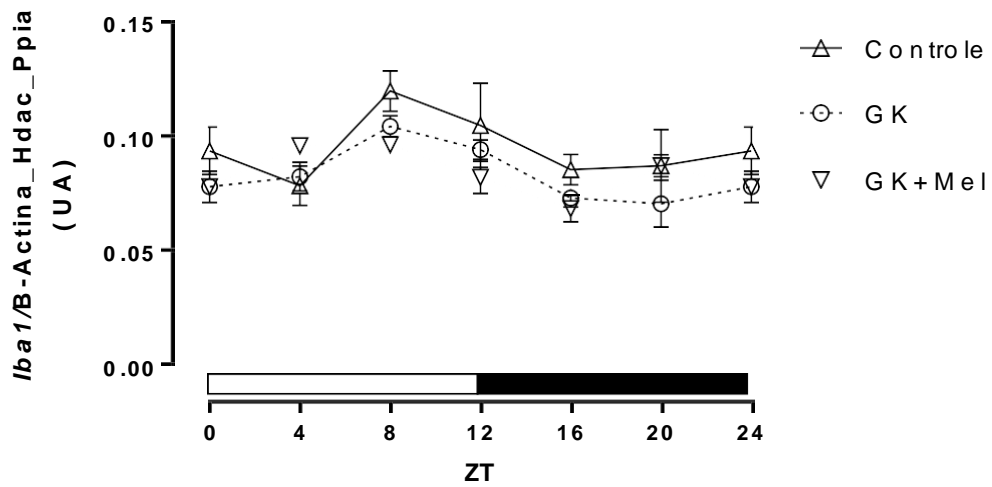


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *NeuN*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 20 - Expressão gênica diária com média das fases claro, escuro e média nas 24h de *Iba1* no hipocampo dos animais

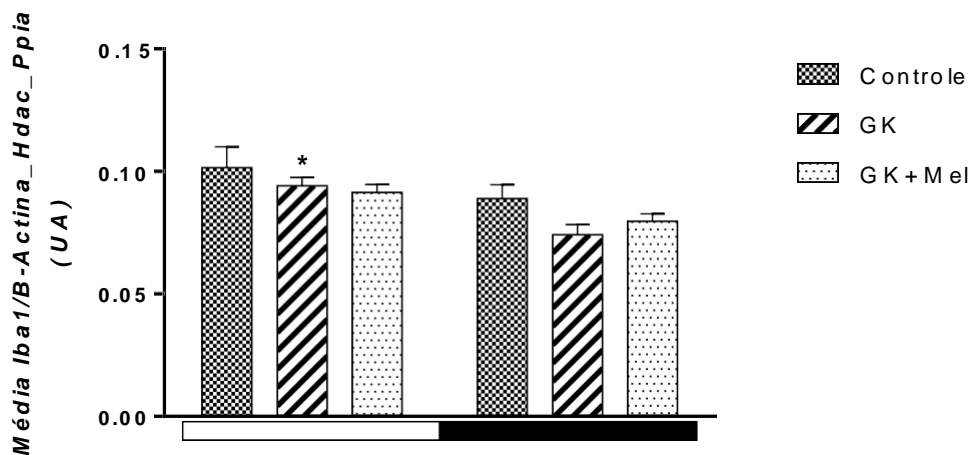
Na figura 20 observamos a expressão gênica hipocampal de *Iba1*, proteína presente na microglia, células do sistema imune residentes do SNC. Aqui observamos diferença estatística somente na média das fases clara e escura no grupo GK.

A



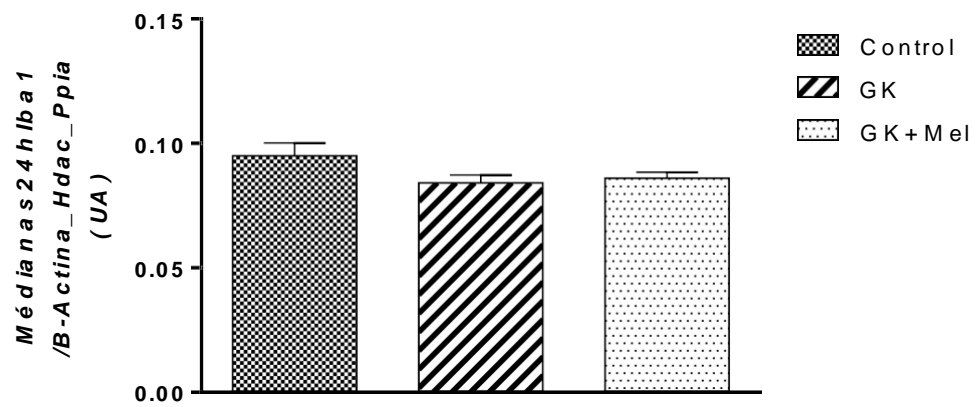
Análise da expressão gênica diária de *Iba1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Iba1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período. * GK (claro) vs GK (escuro).

C

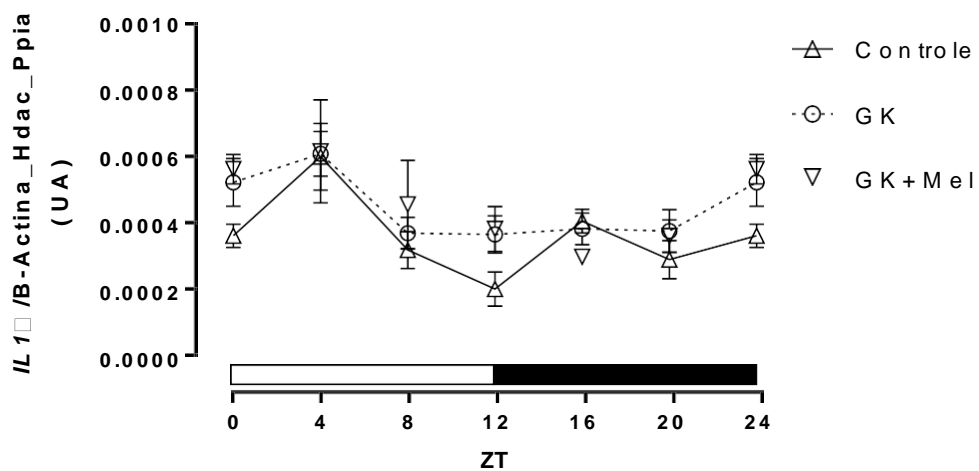


Análise da média das 24h da expressão gênica de *Iba1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 21 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média das 24h de *IL1 β* no hipocampo dos animais

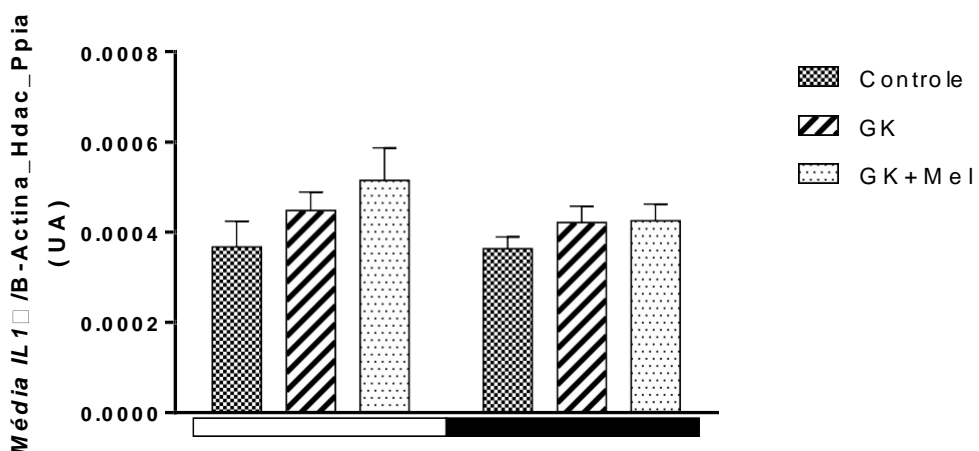
Na figura 21 observamos a expressão gênica de *IL1 β* no hipocampo dos animais. Esta é uma das formas moleculares de *IL1* e é um dos mais importantes marcadores inflamatórios utilizados. Não observamos diferença estatística em nenhuma das análises.

A



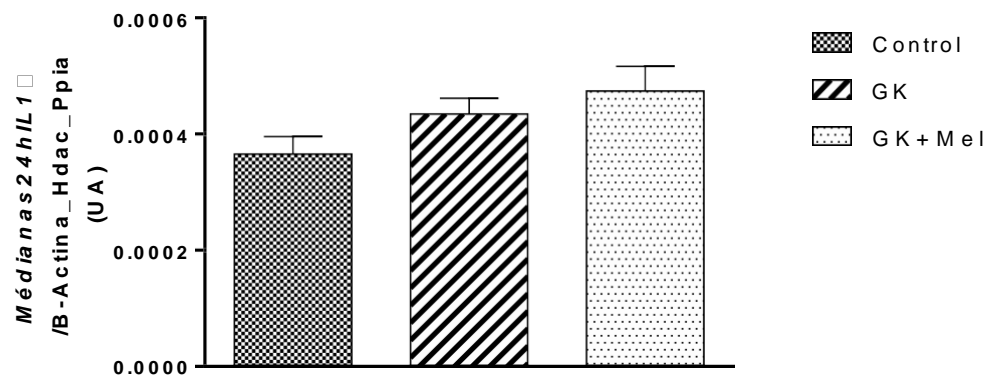
Análise da expressão gênica diária de *IL1 β* . Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *IL1 β* . Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

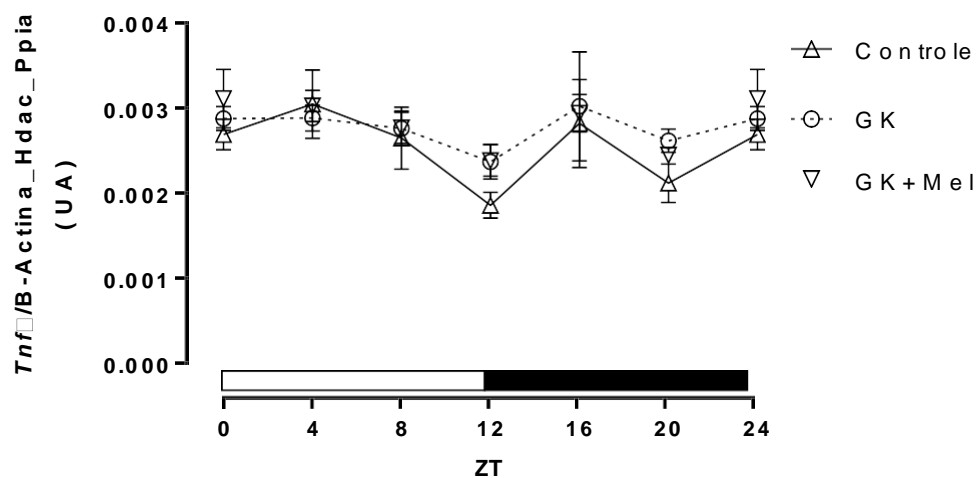


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *IL1β*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 22 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Tnfa* no hipocampo dos animais

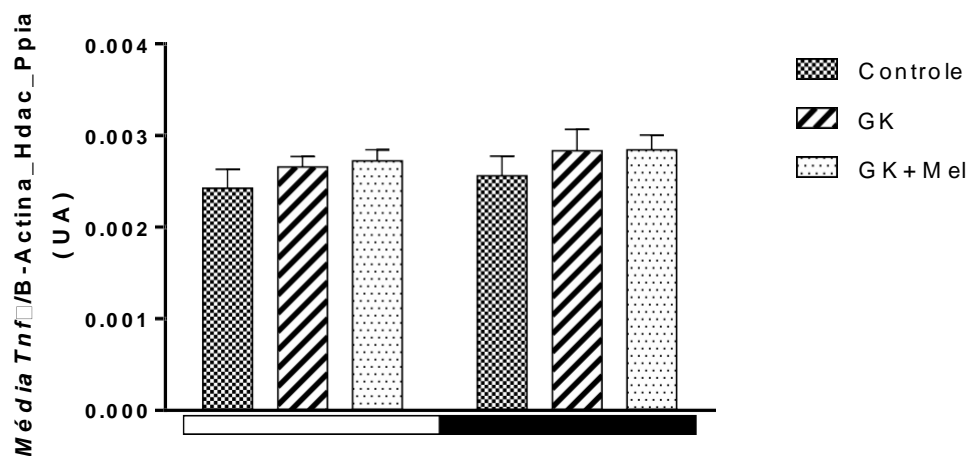
Na figura 22 observamos a expressão gênica do fator de necrose tumoral α (TNF α) no hipocampo dos animais. Esta proteína é o mais importante e mais estudado fator de necrose tumoral, estando diretamente envolvido nos processos inflamatórios. Não observamos diferença estatística em nenhuma das análises.

A



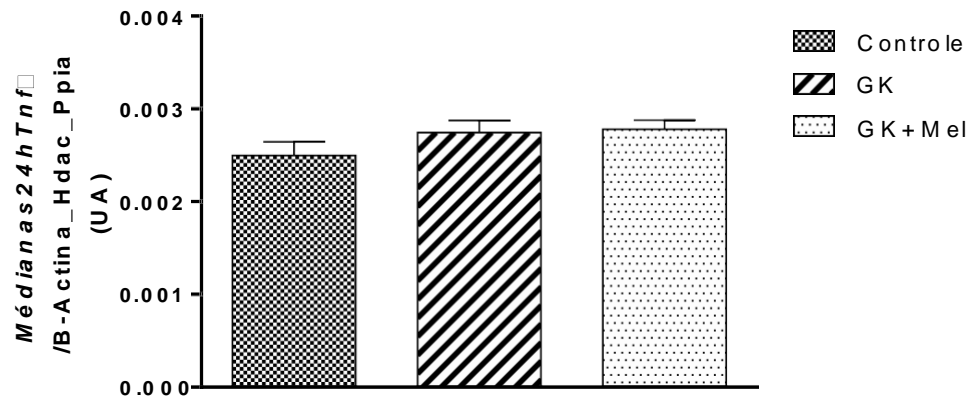
Análise da expressão gênica diária de *Tnfa*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Tnfa*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

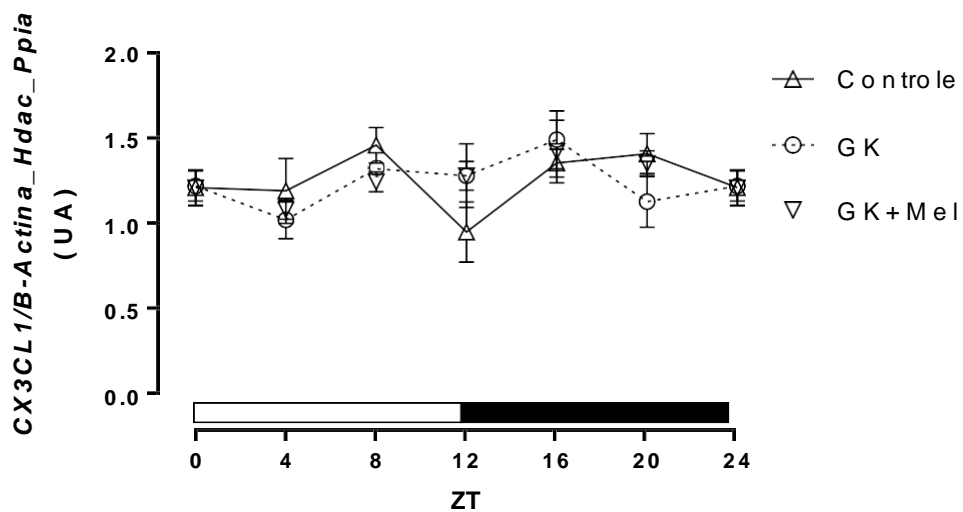


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Tnfα*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 23 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Cx3cll* no hipocampo dos animais

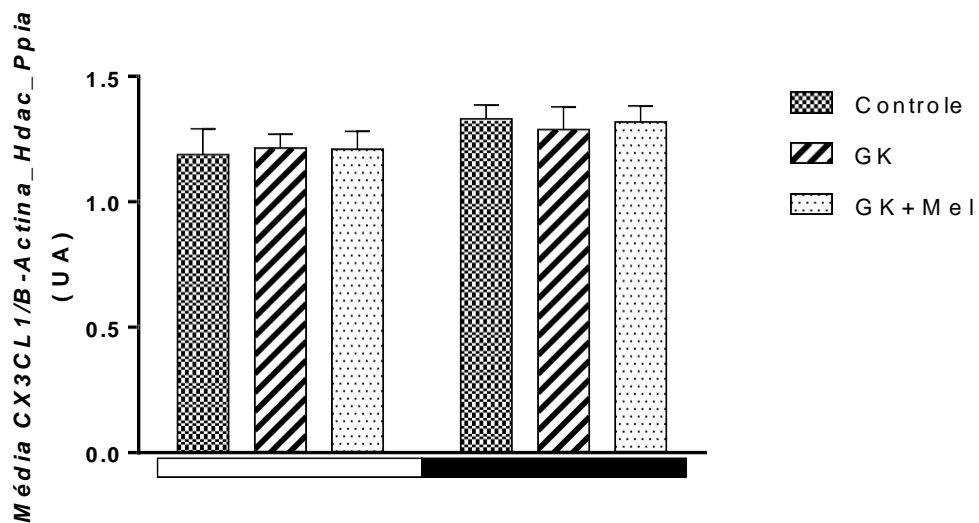
Na figura 23 observamos a expressão gênica de *CX3CL1* no hipocampo dos animais. Também conhecida como Fractalkina, é secretada por neurônios mediando a comunicação destes com a microglia, célula do sistema imune residente no SNC. Não observamos diferença estatística em nenhuma das análises.

A



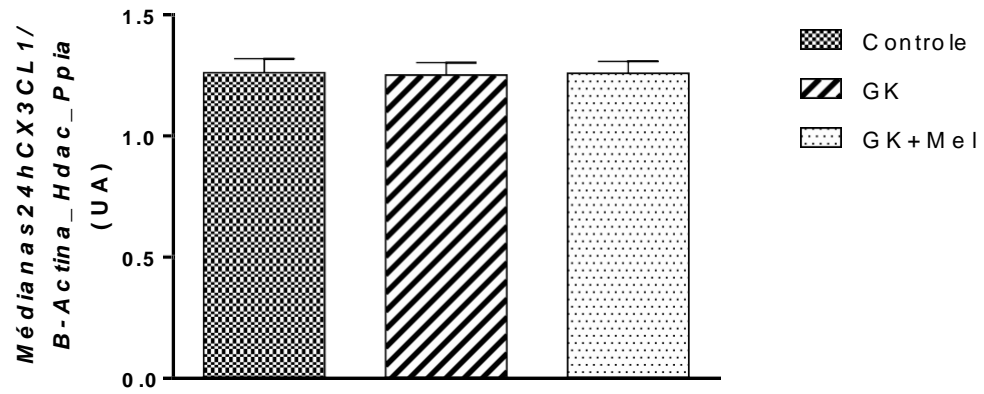
Análise da expressão gênica diária de *Cx3cll*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Cx3cll*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

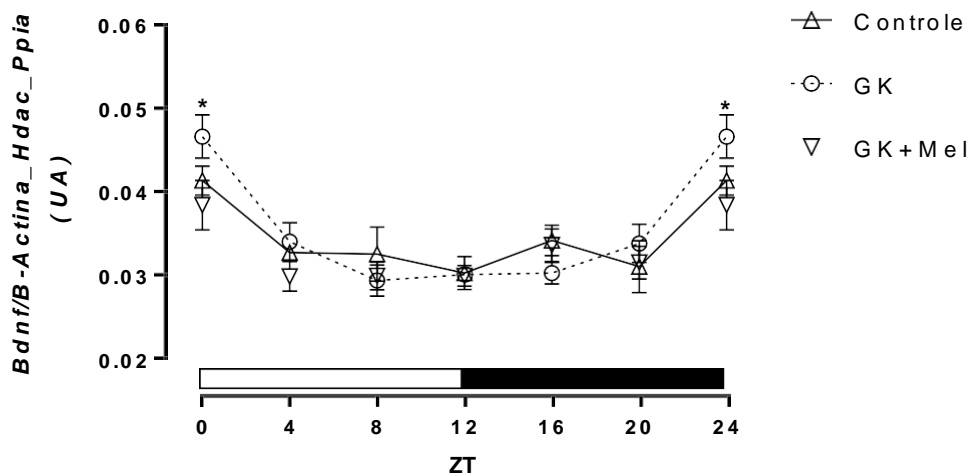


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Cx3cl1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 24 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Bdnf* no hipotálamo dos animais

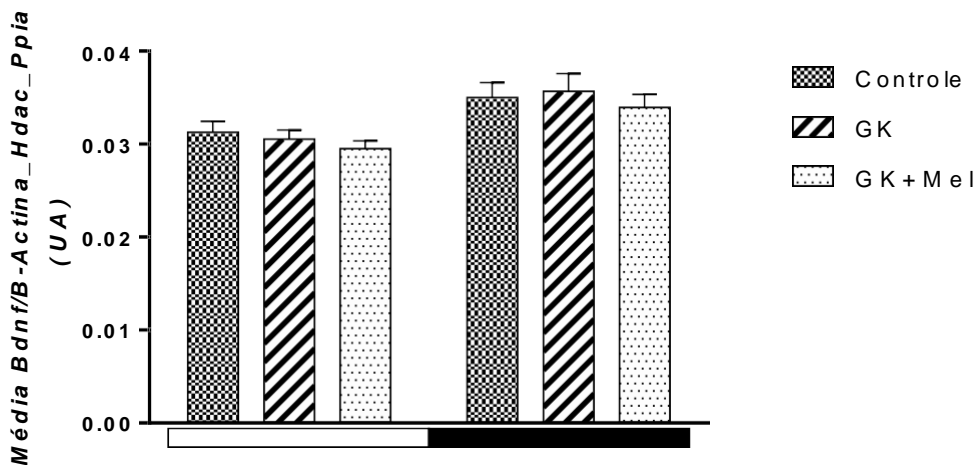
Na figura 24 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *Bdnf*. Com diferença estatística nos ZTs 0 e 24 (transição do escuro para o claro) entre os grupos GK e GK + Mel. Nas demais análises, não observamos diferença estatística.

A



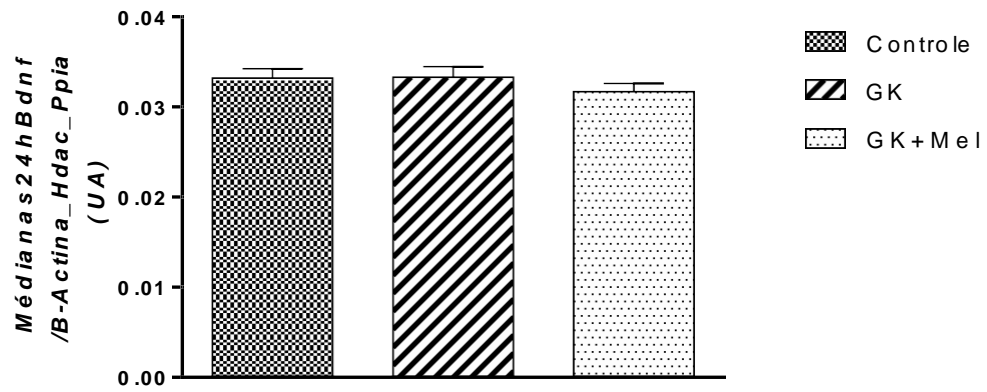
Análise da expressão gênica diária de *Bdnf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.* GK vs GK + Mel.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Bdnf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

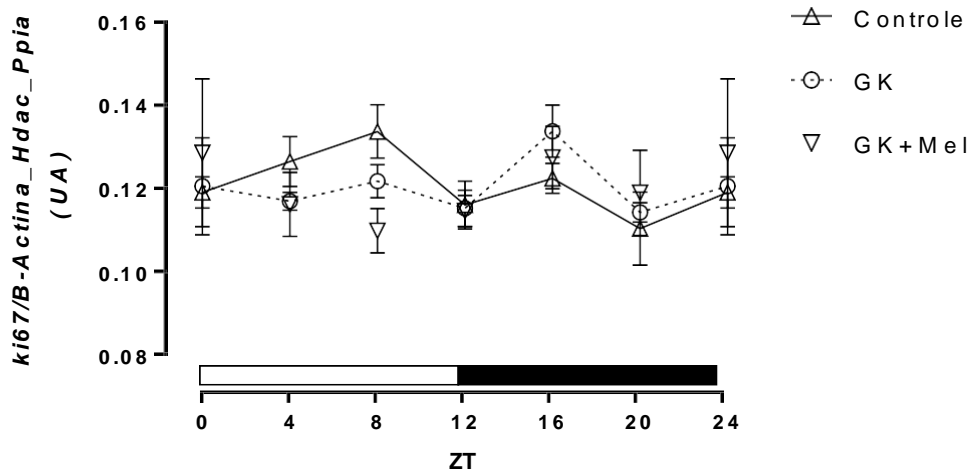


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Bdnf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 25 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Ki67* no hipotálamo dos animais

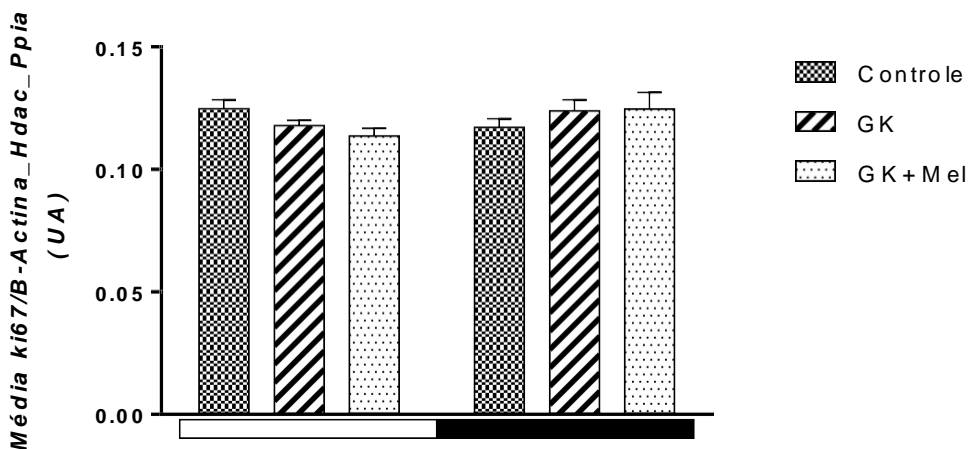
Na figura 25 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *Ki67*. Não houve diferença estatística nas análises realizadas.

A



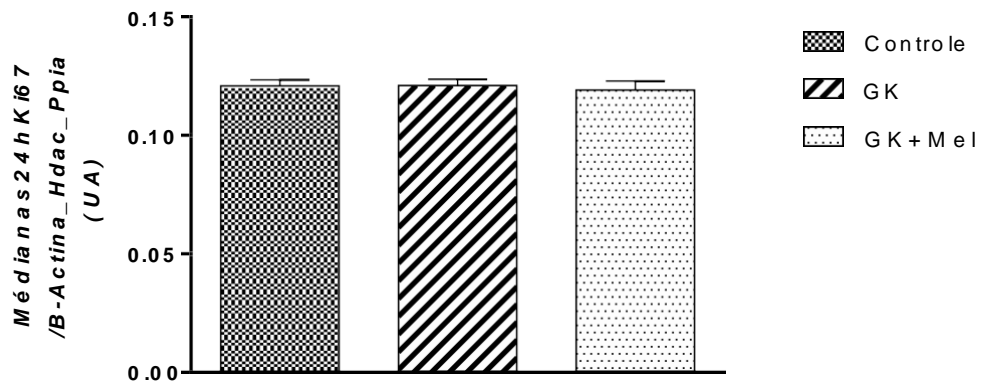
Análise da expressão gênica diária de *Ki67*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Ki67*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

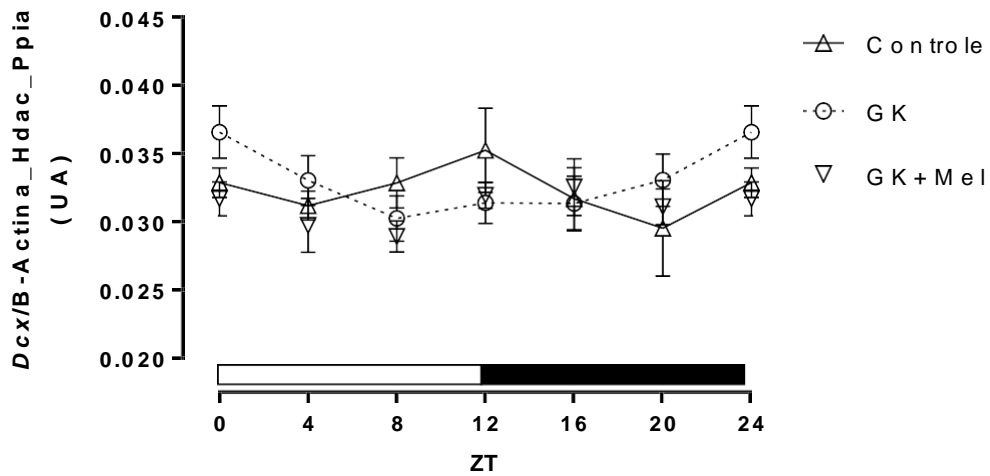


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Ki67*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 26 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Dcx* no hipotálamo dos animais

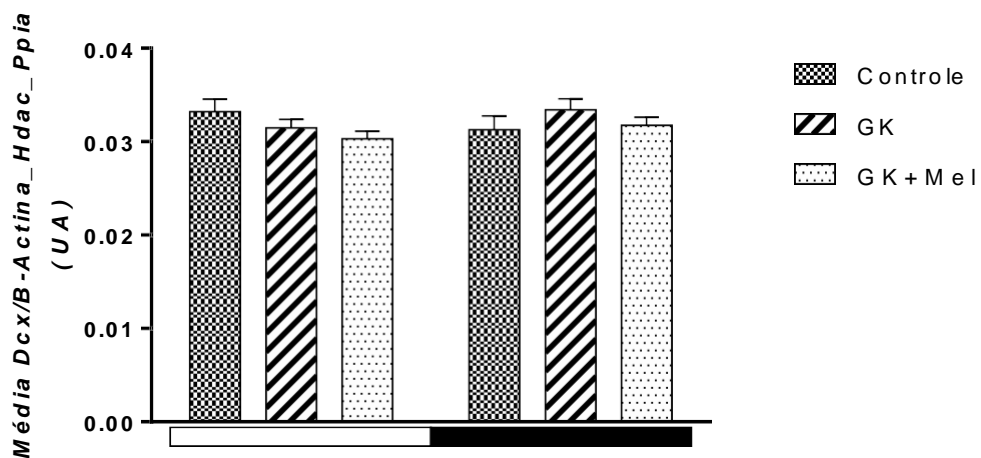
Na figura 26 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *Dcx*. Não houve diferença estatística nas análises realizadas.

A



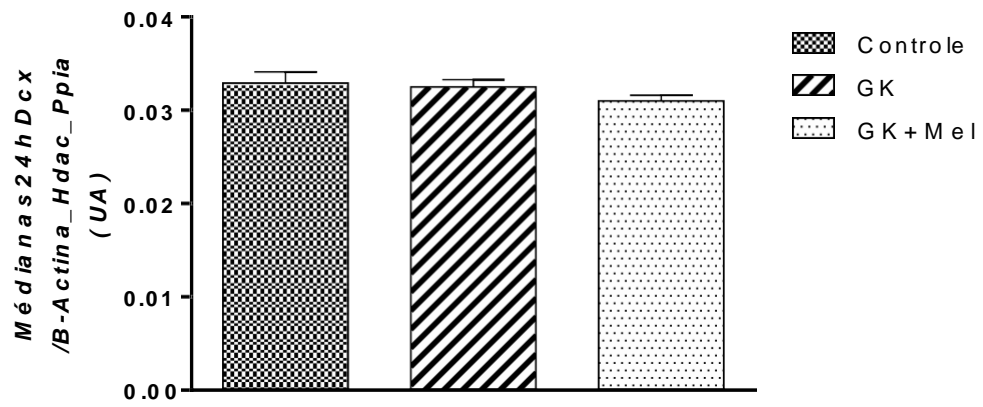
Análise da expressão gênica diária de *Dcx*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Dcx*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

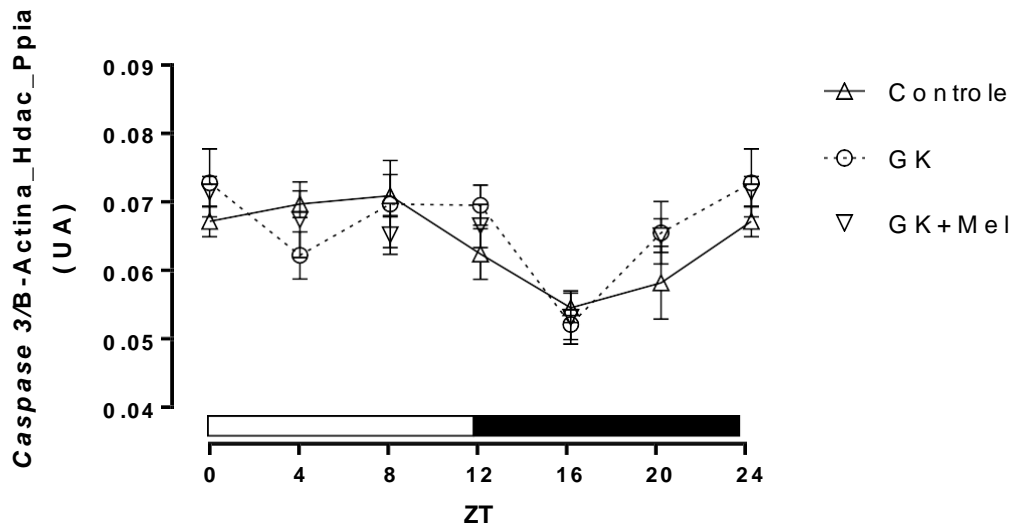


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Dcx*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 27 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Caspase 3* no hipotálamo dos animais

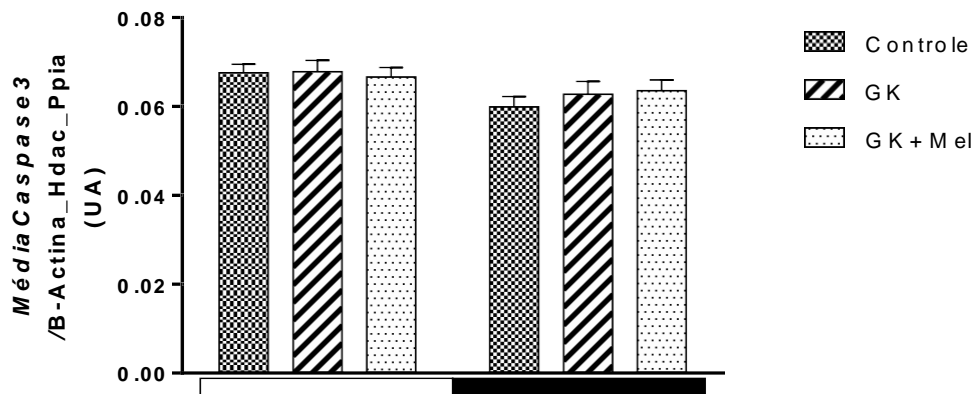
Na figura 27 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *Caspase 3*. Não houve diferença estatística nas análises realizadas, entretanto, vale ressaltar a queda preponderante no mRNA de *Caspase 3* no ZT 16, próximo ao pico secretório de melatonina.

A



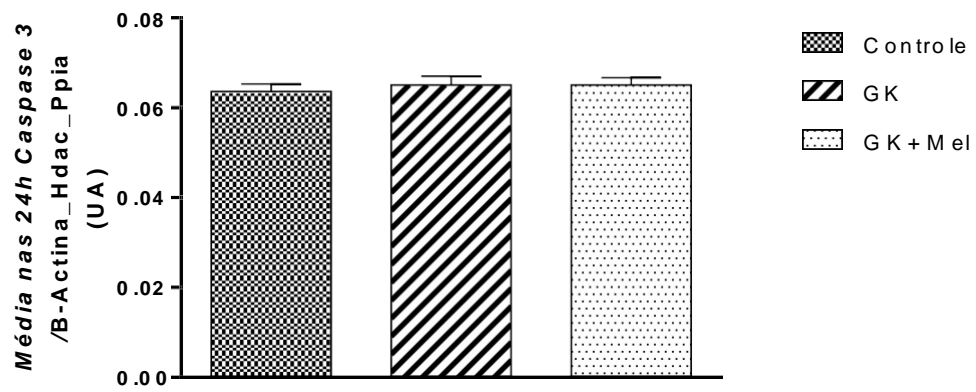
Análise da expressão gênica diária de *Caspase-3*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Caspase 3*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

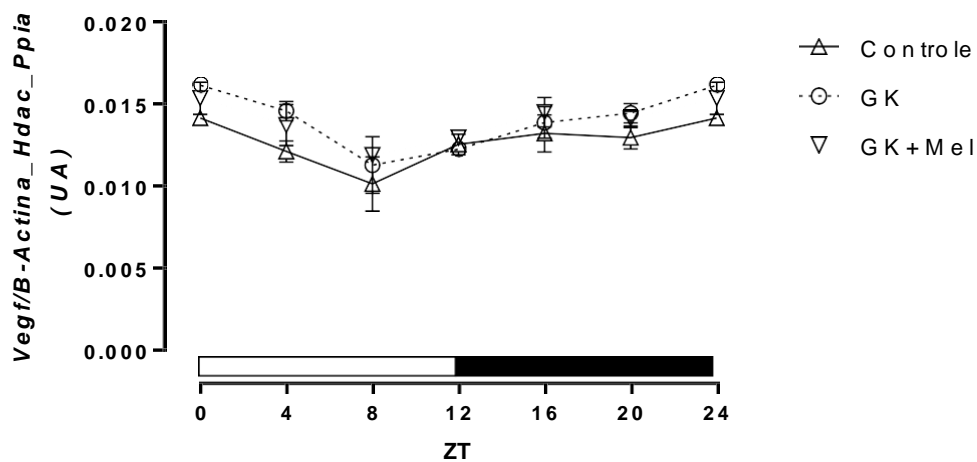


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Caspase 3*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 28 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Vegf* no hipotálamo dos animais

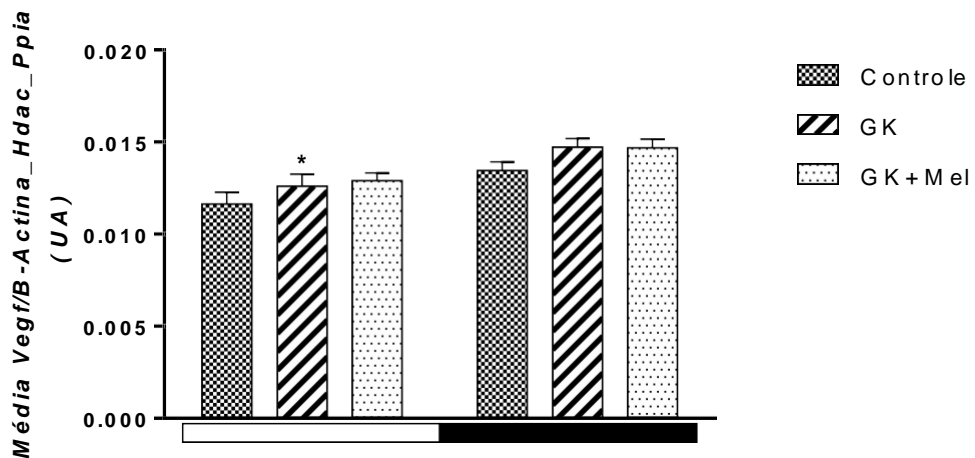
Na figura 28 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária do fator de crescimento derivado do endotélio (*Vegf*). Observamos diferença estatística somente nas médias da fase de claro e escuro no grupo GK.

A



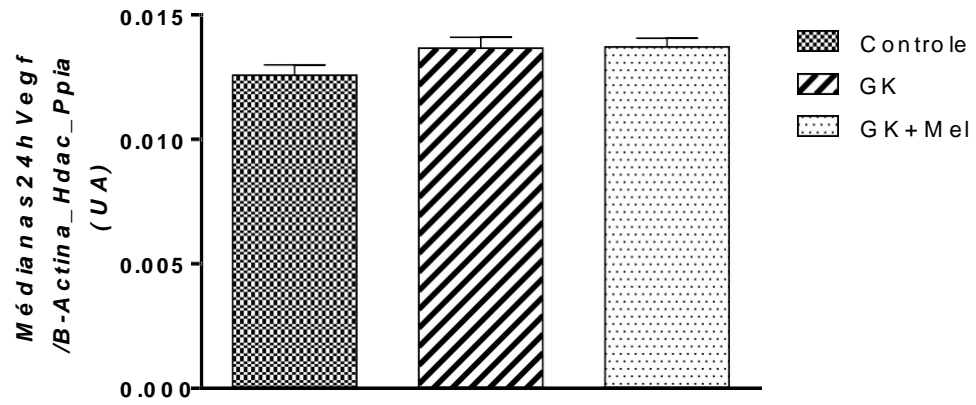
Análise da expressão gênica diária de *Vegf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *Vegf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.*GK (claro) vs GK (escuro).

C

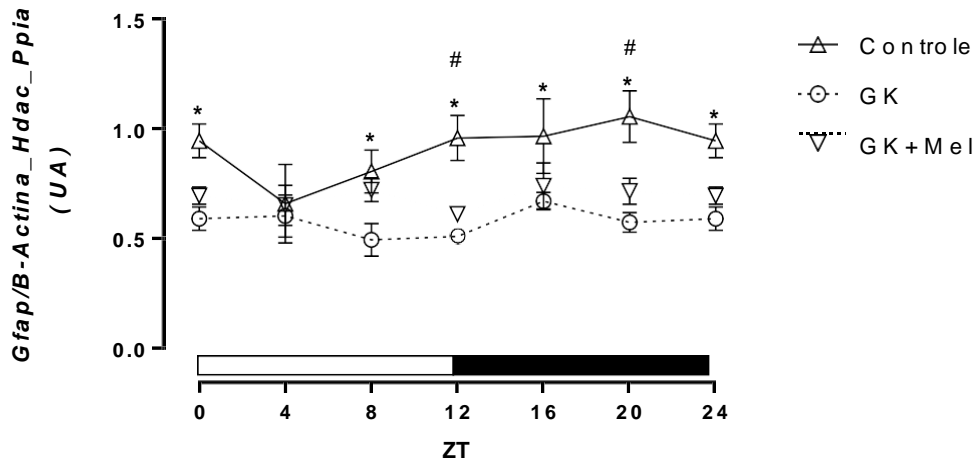


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Vegf*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 29 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Gfap* no hipotálamo dos animais

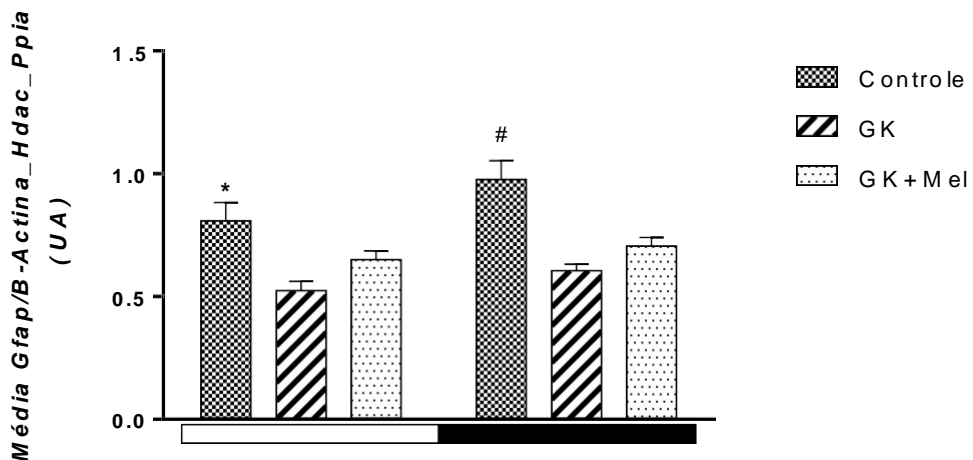
Na figura 29 observamos a expressão gênica de *Gfap* no hipotálamo dos animais. Observamos diferença estatística em seis pontos ao longo do dia (Controle vs GK) em outros dois pontos (Controle vs GK + Mel). Nota-se também discrepâncias entre os grupos nas médias realizadas.

A



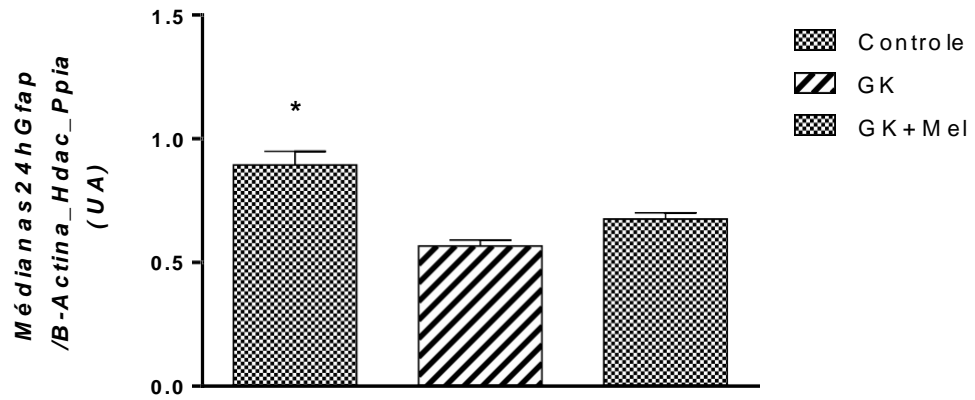
Análise da expressão gênica diária de *Gfap*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT. *Controle vs GK. # Controle vs GK + Mel.

B



Análise da média das fases de claro e escuro da expressão gênica de *Gfap*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=30 a 42 por grupo e por período. * Controle (claro) vs GK (claro). # Controle (escuro) vs GK e GK + Mel (escuro).

C

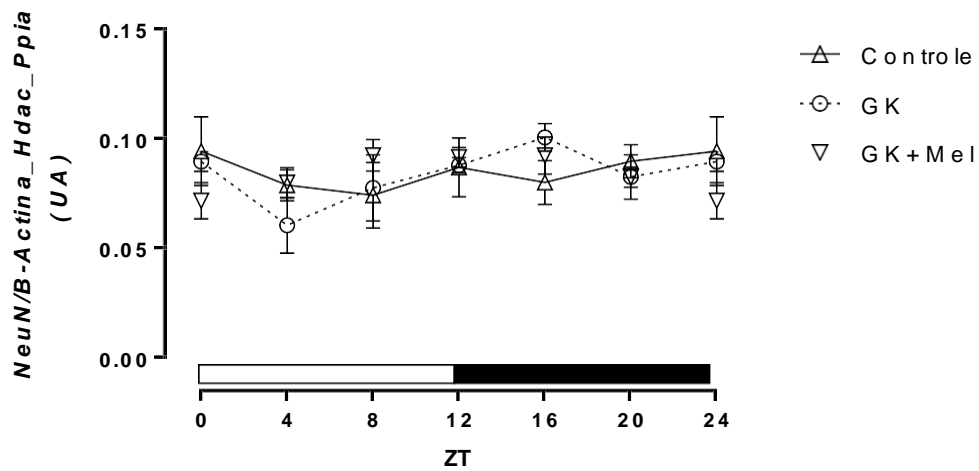


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Gfap*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo. * Controle vs GK e GK + Mel.

Figura 30 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *NeuN* no hipotálamo dos animais

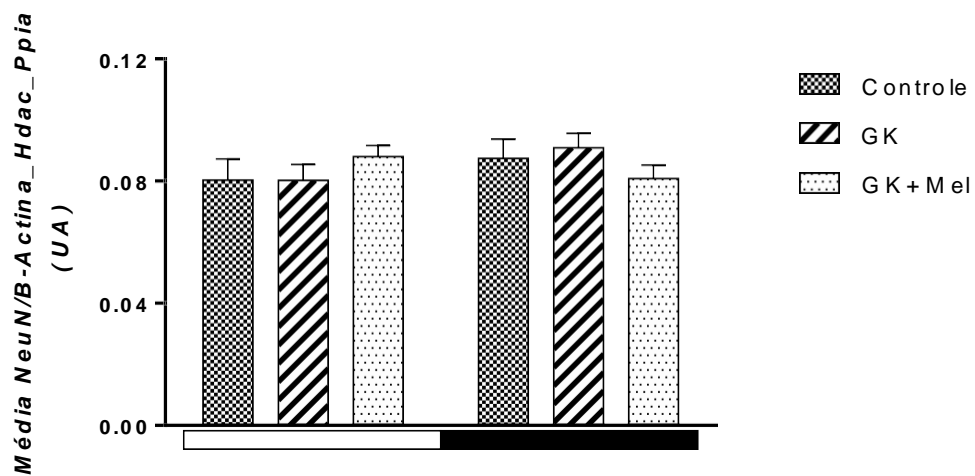
Na figura 30 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *NeuN*. Não existe diferença estatística em nenhuma das análises.

A



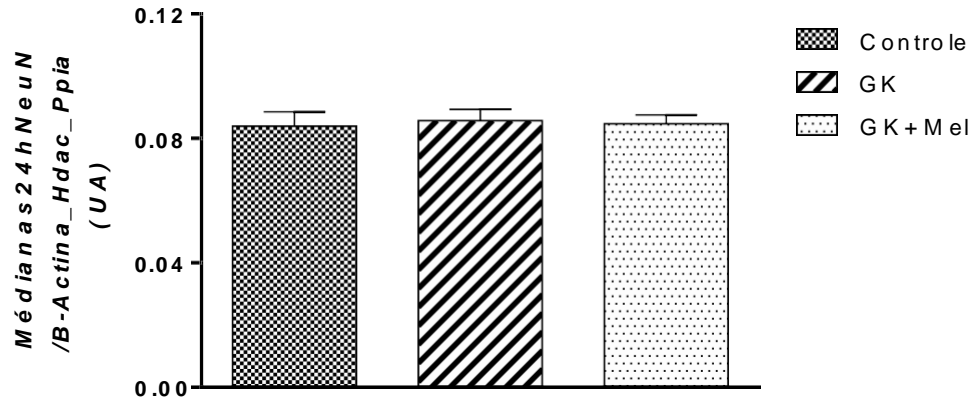
Análise da expressão gênica diária de *NeuN*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média nas fases de claro e escuro da expressão gênica de *NeuN*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

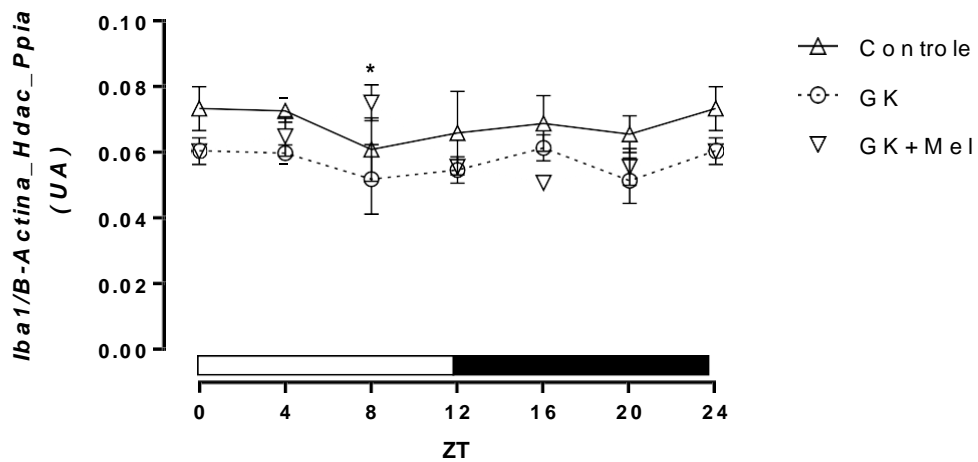


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *NeuN*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 31 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Iba1* no hipotálamo dos animais

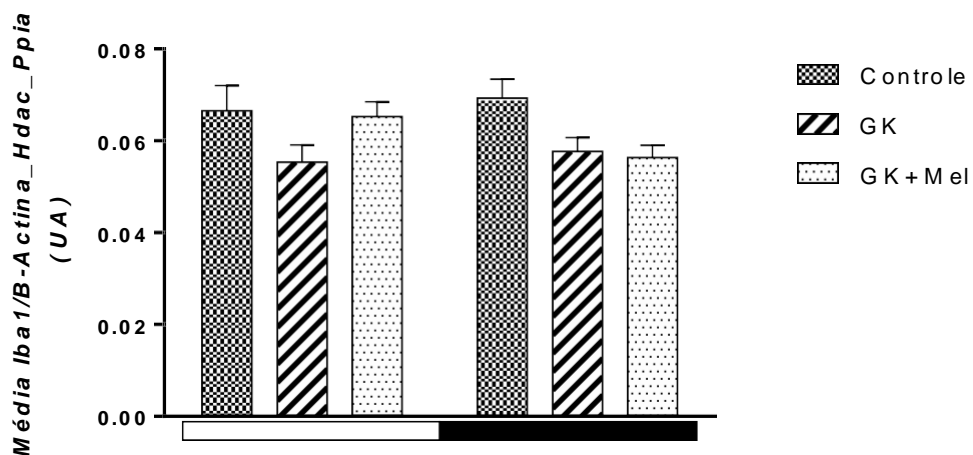
Na figura 31 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *Iba1*. Aqui notamos diferença estatística somente no ZT 8 ente os grupos GK e GK + Mel. Nas demais análises, não houve diferença alguma.

A



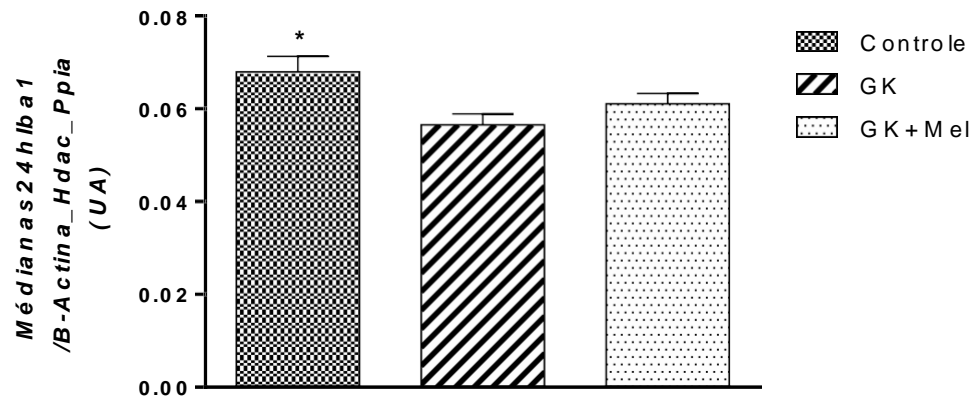
Análise da expressão gênica diária de *Iba1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT. * GK vs GK + Mel.

B



Análise da média das fases de claro e escuro da expressão gênica de *Iba1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

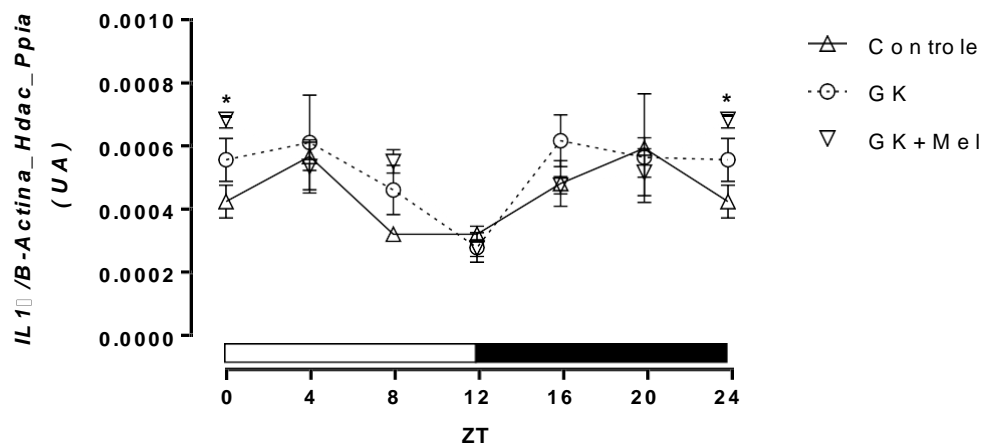


Análise da média de 24h da expressão gênica de *Iba1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo. * Controle vs GK.

Figura 32 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *IL1 β* no hipotálamo dos animais

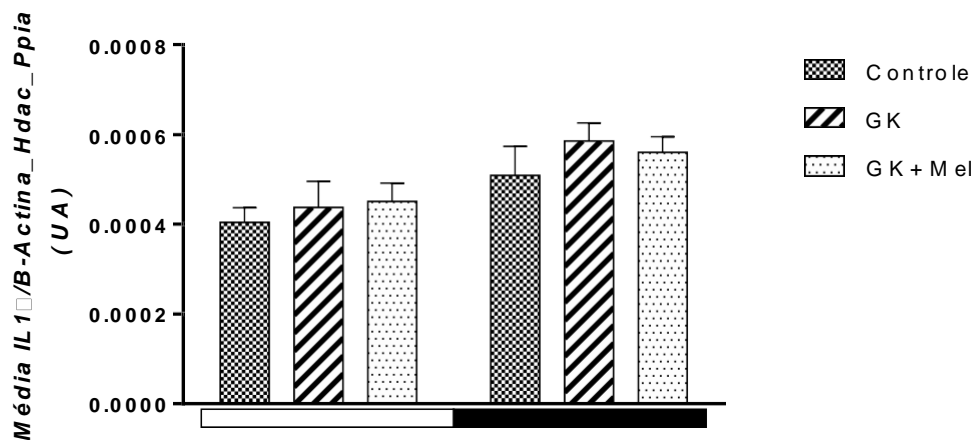
Na figura 32 observamos a expressão gênica hipotalâmica diária de *IL1 β* . Observamos diferença estatística somente na transição da fase de escuro para a fase de claro (ZT 24 e 0) entre os grupos Controle e GK + Mel. Nas demais análises não existem diferenças.

A



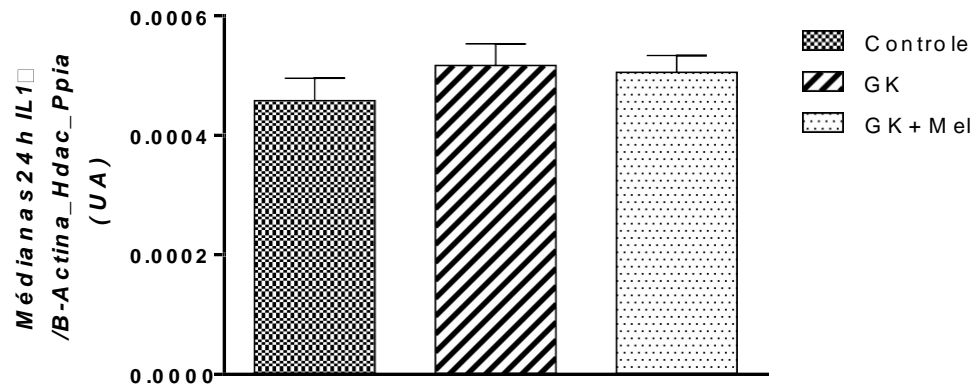
Análise da expressão gênica diária de *IL1 β* . Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.* Controle vs GK + Mel.

B



Análise da média das fases de claro e escuro da expressão gênica de *IL1 β* . Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

C

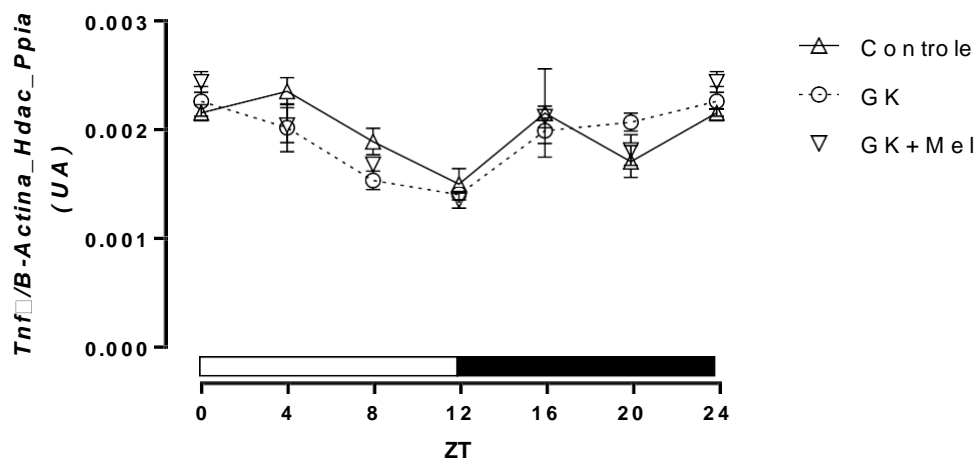


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *IL1β*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 33 - Expressão gênica diária com média dos períodos claro, escuro e média diária de *Tnfa* no hipotálamo dos animais

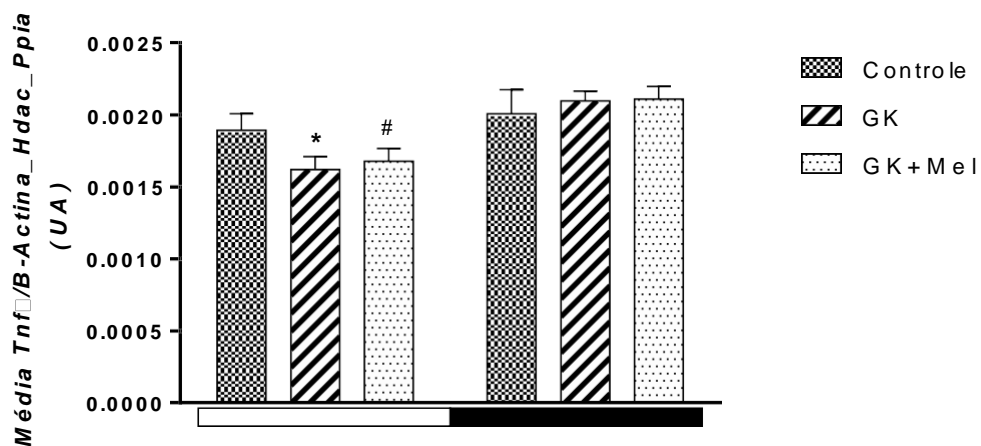
Na figura 33 observamos a expressão gênica de *Tnfa* no hipotálamo dos animais. Observa-se diferença estatística somente na análise das médias das fases de claro e escuro em ambos os grupos de animais GK.

A



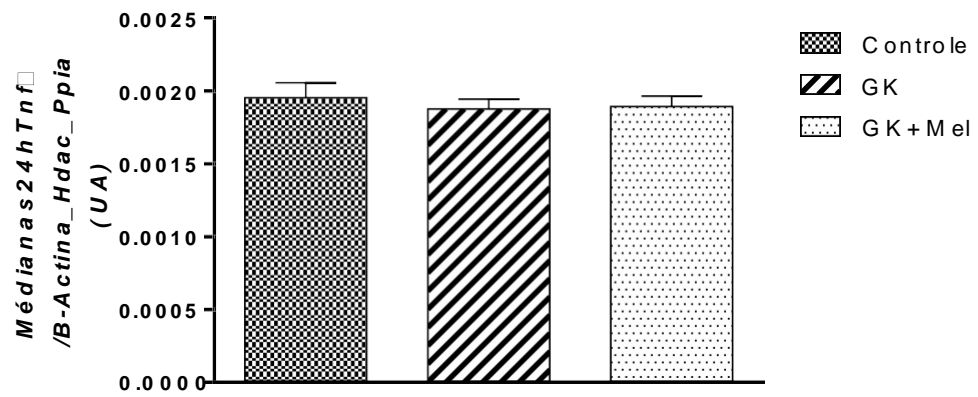
Análise da expressão gênica circadiana do *Tnfa*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média das fases de claro e escuro da expressão gênica de *IL1 β* . Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período. * GK (claro) vs GK (escuro). # GK + Mel (claro) vs GK + Mel (escuro).

C

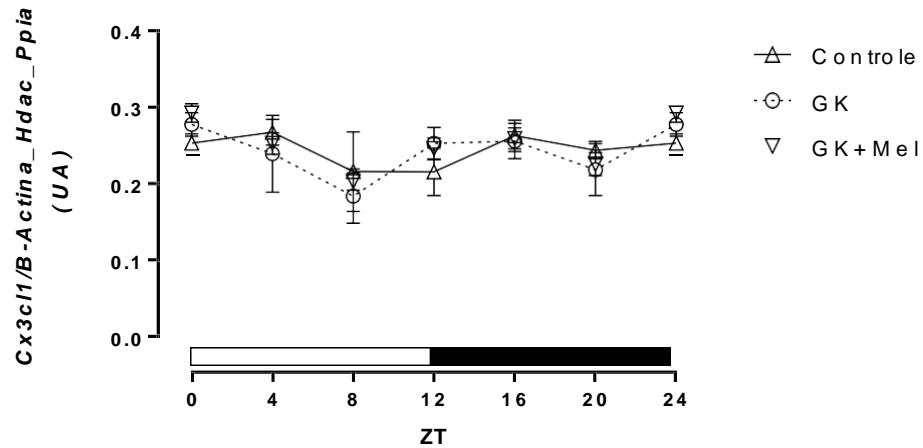


Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Tnfa*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 34 - Expressão gênica diária com média das fases de claro, escuro e média nas 24h de *Cx3c11* no hipotálamo dos animais

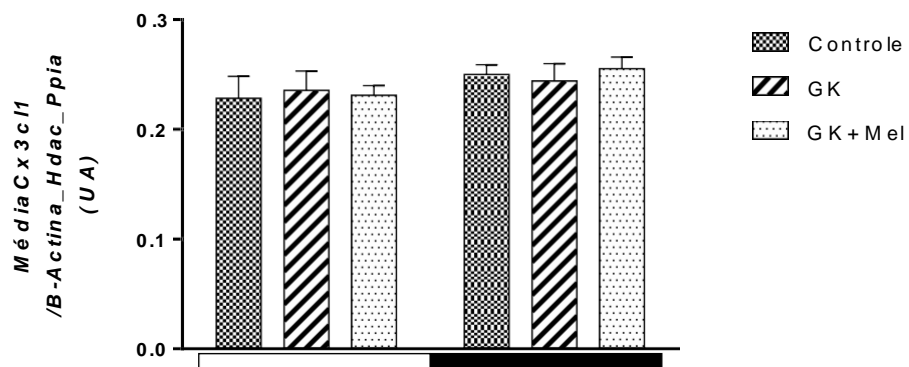
Na figura 34 observamos a expressão gênica diária de *Cx3c11* no hipotálamo dos animais. Não houve diferença estatística em nenhuma das análises.

A



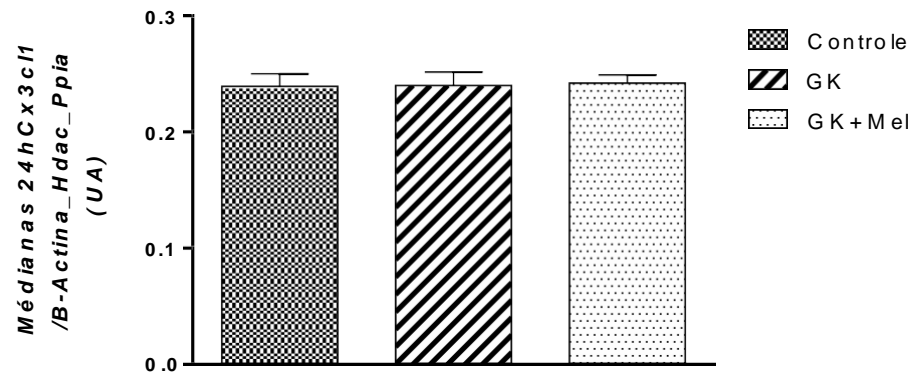
Análise da expressão gênica circadiana do *Cx3c11*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 5 a 7 por grupo e por ZT.

B



Análise da média das fases de claro e escuro da expressão gênica de *Cx3c11*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 30 a 42 por grupo e por período.

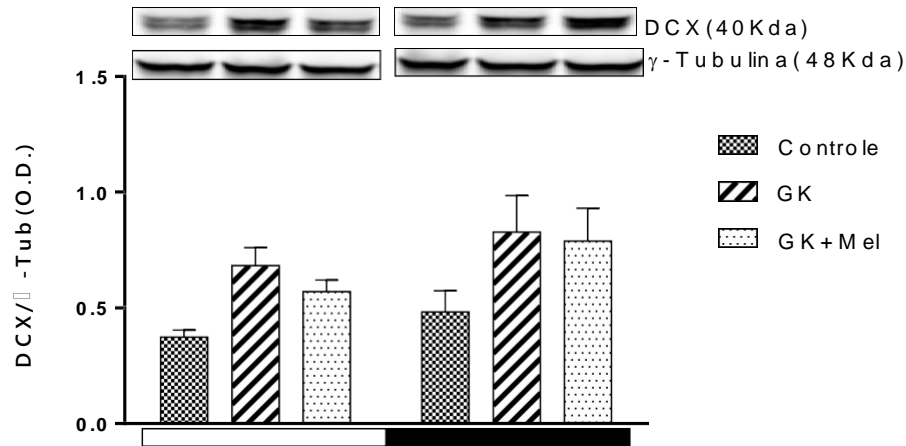
C



Análise da média nas 24h da expressão gênica de *Cx3cl1*. Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de uma via. n= 60 a 84 por grupo.

Figura 35 - Western blot para Dcx no hipocampo dos animais

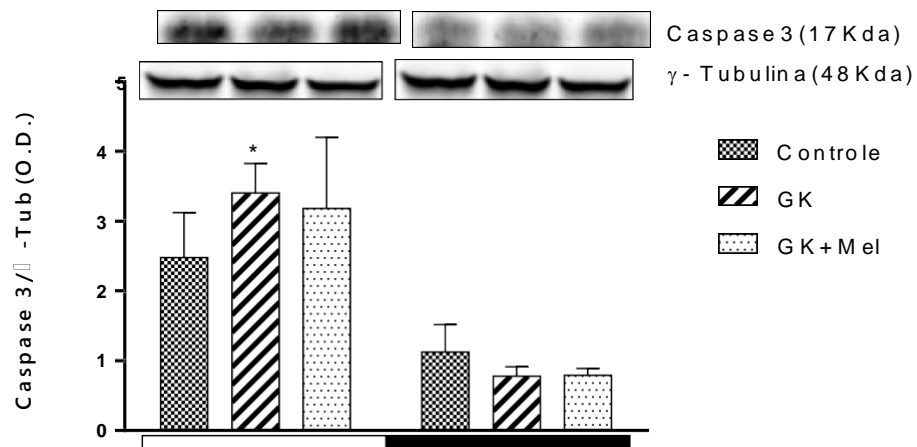
Na quantificação proteica de Dcx hipocampal não observamos diferenças estatísticas entre os grupos, tampouco entre as fases de claro e escuro. Entretanto, é nítida a tendência à maior expressão desta proteína nos animais GK.



Análise da expressão proteica de Dcx no hipocampo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e no meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 36 - Western blot para Caspase 3 (fração de 17 kDa) no hipocampo dos animais

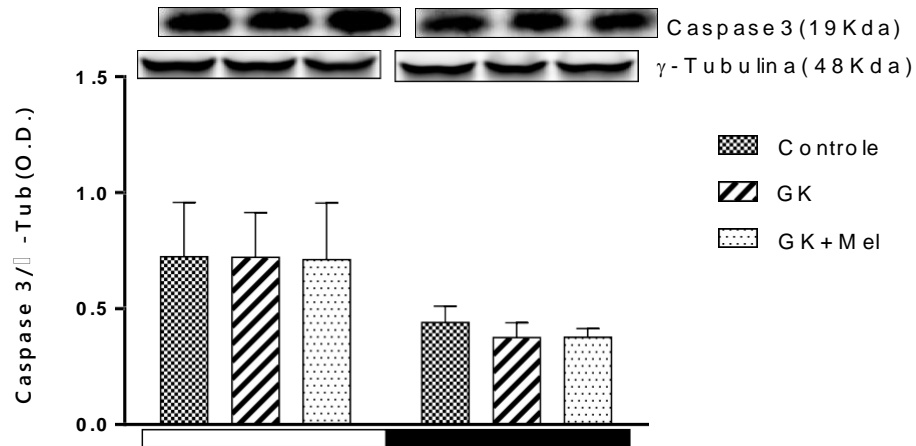
Na expressão proteica de caspase 3 (17 kDa), temos uma significativa redução na fase do escuro, apesar de não obtermos significância estatística. Observamos diferença no grupo GK (claro) vs GK (escuro)



Análise da expressão proteica de Caspase 3 (17 kDa) no hipocampo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e no meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT. * GK (ZT4) vs GK (ZT16).

Figura 37 - Western blot para Caspase 3 (fração de 19 kDa) no hipocampo dos animais

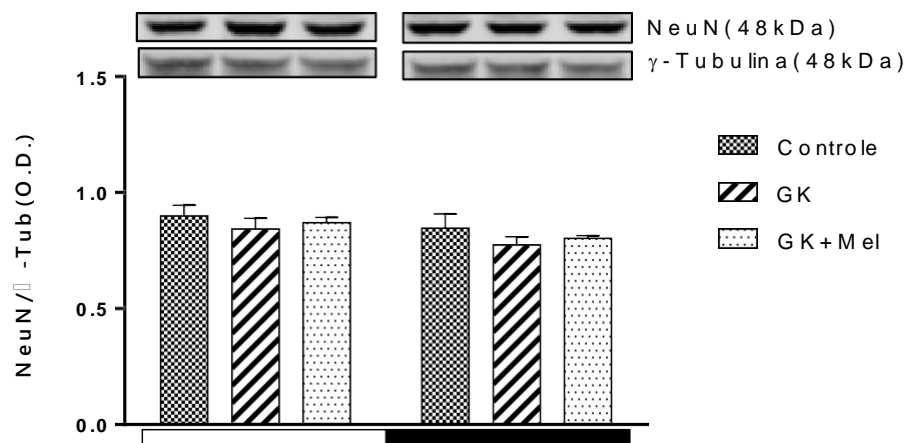
Na expressão proteica de caspase 3 (19 kDa), temos uma significativa redução na fase do escuro, apesar de não obtermos significância estatística e em menos magnitude do que a fração de 17 kDa.



Análise da expressão proteica de Caspase 3 (19 kDa) no hipocampo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 38 - Western blot para NeuN no hipocampo dos animais

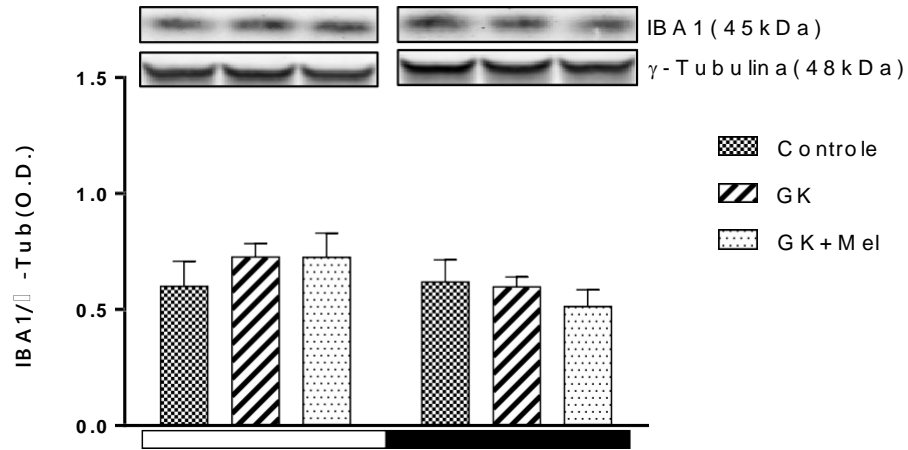
Na quantificação proteica de NeuN, não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro.



Análise da expressão proteica de NeuN no hipocampo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 39 - Western blot para IBA1 no hipocampo dos animais

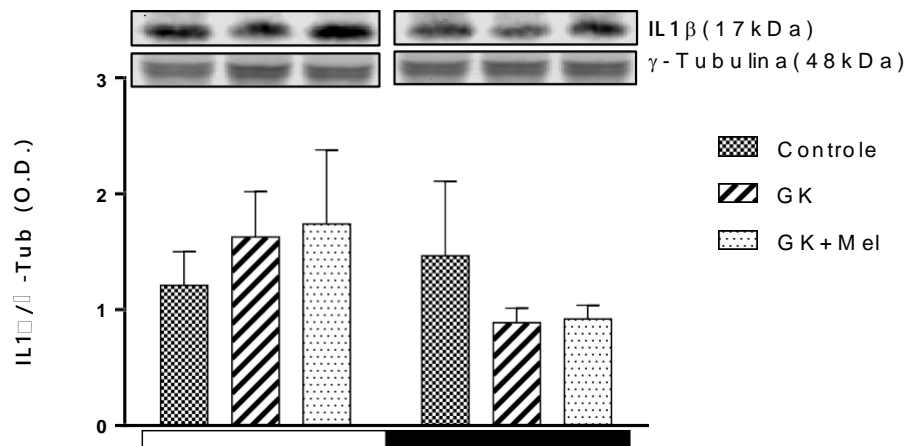
Na quantificação proteica de IBA1, não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro.



Análise da expressão proteica de Iba1 no hipocampo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 40 - Western blot para IL1 β no hipocampo dos animais

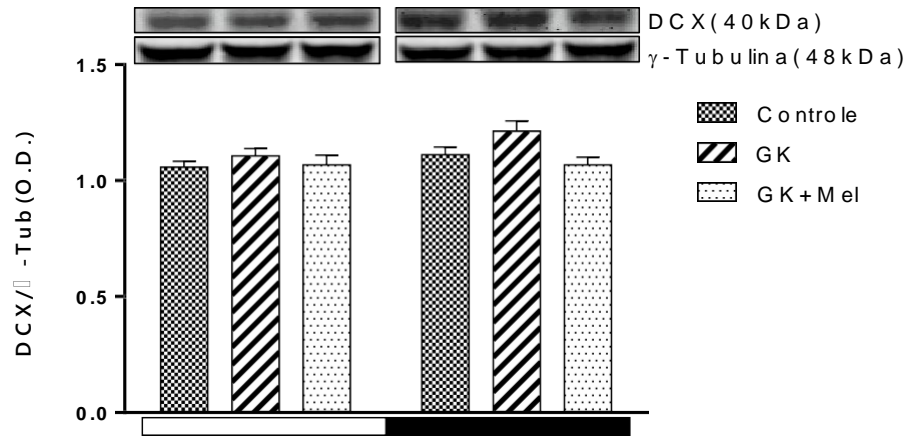
Na quantificação proteica de IL1 β , não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro.



Análise da expressão proteica de IL1 β no hipocampo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 41 - Western blot para Dcx no hipotálamo dos animais

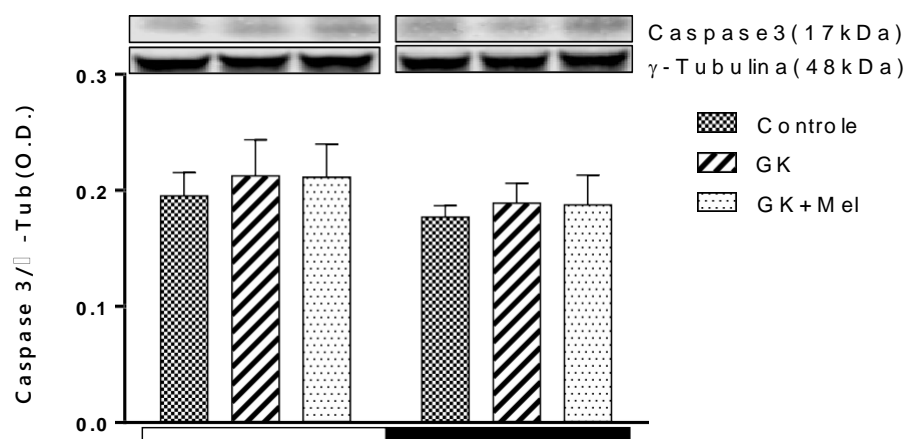
Na quantificação proteica de Dcx, não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro.



Análise da expressão proteica de Dcx no hipotálamo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 42 - Western blot para Caspase 3 (fração de 17 kDa) no hipotálamo dos animais

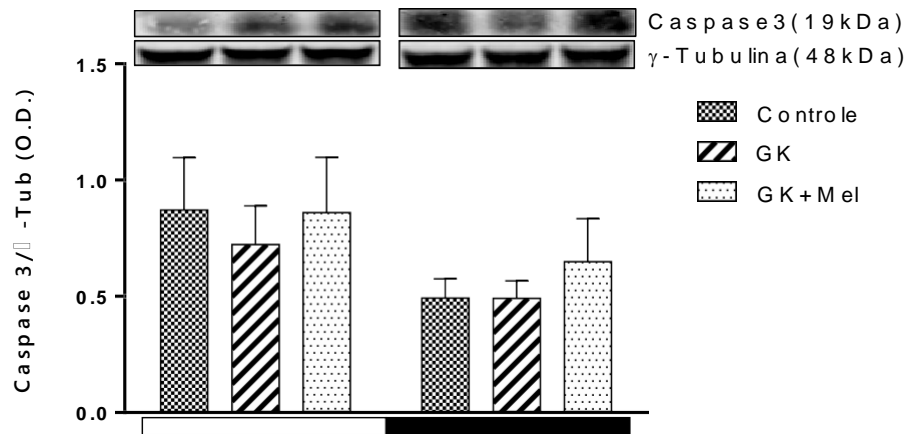
Na quantificação proteica de Caspase 3 (17 kDa), não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro.



Análise da expressão proteica de Caspase 3 (17 kDa) no hipotálamo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 43 - Western blot para Caspase 3 (fração de 19 kDa) no hipotálamo dos animais

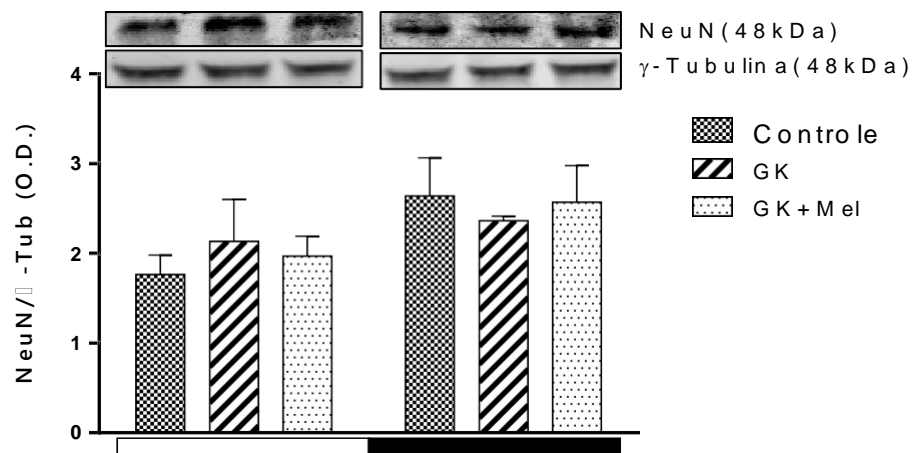
Na quantificação proteica de Caspase 3 (19kDa), não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro. Contudo, parece existir uma tendência à menor expressão desta na fase de escuro, na presença de melatonina.



Análise da expressão proteica de Caspase 3 (19 kDa) no hipotálamo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 44 - Western blot para NeuN no hipotálamo dos animais

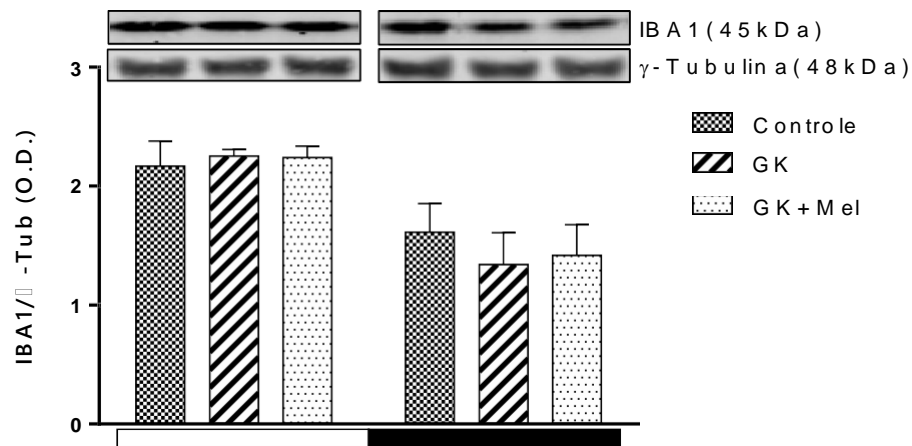
Na quantificação proteica de NeuN, não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro. Contudo, parece existir uma tendência à maior expressão desta na fase de escuro, na presença de melatonina.



Análise da expressão proteica de NeuN no hipotálamo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 45 - Western blot para IBA1 no hipotálamo dos animais

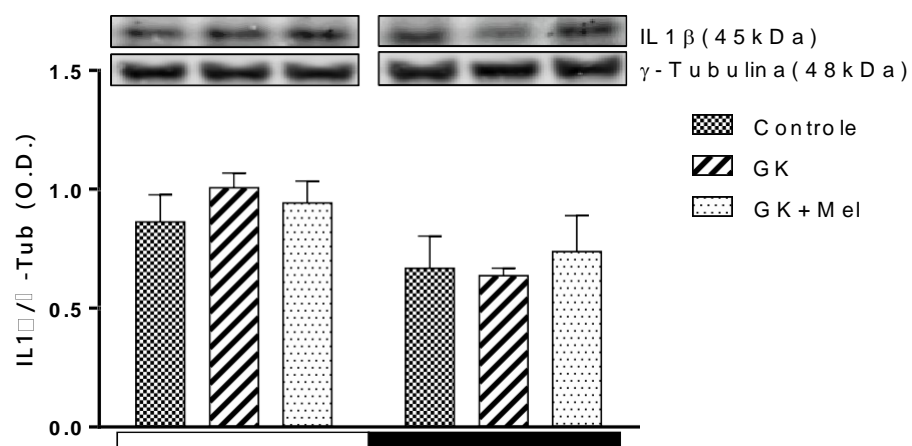
Na quantificação proteica de IBA1, não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro. Entretanto, parece existir uma tendência à menor expressão desta na fase de escuro, na presença de melatonina.



Análise da expressão proteica de IBA1 no hipotálamo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

Figura 46 - Western blot para IL1 β no hipotálamo dos animais

Na quantificação proteica de IL1 β , não observamos diferença entre os grupos experimentais, tampouco entre as fases de claro e escuro.



Análise da expressão proteica de IL1 β no hipotálamo dos animais no meio da fase de claro (ZT4) e meio da fase de escuro (ZT16). Os valores são mostrados como média \pm E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 4 por grupo e por ZT.

6 Discussão

Neste trabalho está sendo investigada a ação do hormônio melatonina bem como da sua suplementação sobre a neurogênese e possível neuroinflamação presente no modelo de rato diabético do tipo 2, Goto-Kakizaki (GK). Nesta linhagem de animais, observa-se uma redução da síntese e secreção de melatonina pineal em torno de 50% (FRESE et al., 2009), fato provavelmente decorrente da hiperglicemia crônica apresentada (AMARAL et al., 2014), ainda, dados na literatura apontam um comprometimento da neurogênese hipocampal neste modelo (LANG et al., 2009) além de sugerirem que uma inflamação hipotalâmica pode preceder a instalação do quadro de diabetes tipo 2 e que a reversão da mesma acarretaria uma melhora na condição acima citada (ARRUDA et al., 2011; MILANSKI et al., 2012). Faz-se importante ressaltar que a melatonina, possui bem documentada ação neuroprotetora e neurotrófica (MANDA e REITER, 2010; RAMÍREZ-RODRIGUEZ et al., 2010; MUELLER; MEAR; MISTLBERGER, 2011; TOCHARUS et al., 2014; CHU et al., 2016) além de ação anti-inflamatória (MAURIZ et al., 2013). Diante disso, nos propusemos a realizar a suplementação de melatonina (3mg/kg de peso corporal) na linhagem GK, durante 3 meses, ininterruptamente. Posteriormente, avaliamos a expressão gênica diária e quantificação de proteínas envolvidas nos processos de neurogênese e neuroinflamação nas estruturas hipocampal e hipotalâmica, mediante técnicas de PCR *real time* e Western blot.

Nos ratos GK, observamos uma hiperglicemia de jejum em torno de 120 a 140 mg/dL após a 8ª semana de vida (BISBIS et al., 1993), com pouca diferença com relação ao seu grupo controle no que diz respeito a ingestão hídrica, bem como dos demais problemas associados ao quadro de diabetes que são extremamente mais pronunciados em outros modelos animais desta doença. Vale ressaltar que diante do quadro de resistência insulínica desta linhagem, é observada uma redução do peso corporal dos ratos GK, com relação ao seu controle, de cerca de 20 a 30% (AKASH; REHMAN; CHEN, 2013).

É bem descrita na literatura a ação anorexigênica da melatonina, bem como sua ação sobre o peso corpóreo (FISCHER et al., 2016; BUONFIGLIO et al., 2018; MONTALBANO et al., 2018). Diversos dados do nosso grupo de estudos demonstram uma redução no peso corporal e menor ingestão alimentar em ratos da linhagem Wistar suplementados com melatonina por via oral. Entretanto, o oposto é observado nos animais GK suplementados com a melatonina (GK + Mel). Neste grupo, observamos uma elevação do peso corpóreo com relação ao grupo GK. Um trabalho do nosso laboratório, em andamento, demonstra que estes animais diferentemente dos animais Wistar, passam a ter uma ingestão alimentar

ampliada quando são submetidos a suplementação de melatonina. Contudo, este fato não se reflete num aumento dos depósitos de gordura inguinal e periepididimal. Portanto, supomos que a melatonina esteja melhorando a sinalização insulínica destes animais, apesar de não termos observado melhora na glicemia de jejum, tampouco no GTT realizado no ZT 10. Contudo, um trabalho paralelo do nosso grupo (J. Sinésio Silva, tese de doutoramento), encontrou diferenças significativas no GTT e glicemia de jejum (grupo GK vs GK + Mel) quando este é realizado no ZT 14, investigações a respeito estão sendo realizadas para elucidar tal fato.

Com relação a expressão gênica diária, média nas fases de claro e de escuro e na média nas 24 horas, além dos blots para fatores envolvidos nos processos de neurogênese e neuroinflamação no hipocampo e hipotálamo encontramos:

Bdnf - A principal neurotrofina do sistema nervoso central, possui papel chave na neurogênese e neuroproteção, observamos maior expressão gênica em ambos os grupos de animais hiperglicêmicos (GK e GK + Mel) nos ZTs 8, 12 e 20 no hipocampo. Alguns trabalhos na literatura relatam maior quantidade sérica de Bdnf em humanos diabéticos do tipo 2 do que em indivíduos normoglicêmicos (CIVELEK et al., 2013; BOYUK et al., 2014), com a observação de que quando estes se encontram num estado de hiperinsulinemia, como os nossos ratos GK (KUWABARA et al., 2017), os níveis de Bdnf são maiores do que dos indivíduos controle, tendo um decréscimo em paralelo à queda da produção de insulina (LIU et al., 2016). Quando observamos a média da expressão gênica hipocampal durante o período escuro (fase onde a melatonina está sendo secretada), notamos diferença entre os grupos Controle e ambos grupos GK, lembrando que estes animais possuem uma menor síntese de melatonina, fato que nos faz acreditar que a maior presença de Bdnf estaria atrelada a redução da indolamina em questão, atuando, portanto, como um mecanismo de proteção ao insulto provocado pela hiperglicemia nesta estrutura e que a reposição via oral da melatonina não seria capaz de reverter tal situação. Nota-se que a média nas 24h da expressão gênica de Bdnf hipocampal também se mostra elevada em ambos grupos GK, fato que reforça nossa hipótese.

No hipotálamo, observamos diferença estatística no ZT 24 (transição do período claro para o escuro), entre os grupos GK e GK + Mel, onde os animais suplementados apresentam menor expressão gênica do Bdnf, provavelmente em decorrência da presença de melatonina circulante. Importante ressaltar que dados da literatura correlacionam a maior ou menor quantidade de Bdnf circulante com tolerância à glicose e ingestão alimentar (CORDEIRA e RIOS, 2011; SHU et al., 2013) e sabemos que núcleos hipotalâmicos específicos (como o

núcleo arqueado) coordenam fome e saciedade, diante disso, esperávamos encontrar diferenças mais acentuadas na expressão do mRNA desta proteína entre os grupos. Ainda, na esperança de observar tais diferenças, tentamos a realização do blot para Bdnf, contudo, o mesmo se mostra de complexa efetuação, em decorrência do baixo peso molecular da proteína (16 kDa) e da ligação inespecífica dos anticorpos disponíveis. A utilização de kits para dosagem pode ser uma alternativa, além do mais, ressaltamos a circunstância de trabalharmos com o hipotálamo total, não tendo o mesmo dividido em seus diversos núcleos, situação que pode mascarar alguma alteração que esteja ocorrendo num grupamento específico da estrutura citada, como o núcleo arqueado.

Ki67 – Alterações relacionadas ao mRNA de Ki67, proteína nuclear associada a proliferação celular, utilizada da mesma forma que o BrdU como marcador proliferativo da neurogênese adulta (KEE et al., 2002) foram observadas somente no ZT 4, tendo sua expressão gênica mais acentuada no grupo Controle quando comparado ao grupo GK no complexo hipocampal. Não observamos diferença nas médias nas fases de claro e de escuro, bem como da média nas 24 horas. No hipotálamo, não observamos qualquer variação entre os grupos experimentais. Vale ressaltar que esta proteína é expressa em determinadas fases do ciclo celular, tendo portanto, grande flutuabilidade ao longo das 24 horas, contudo, dados na literatura apontam uma maior quantidade de células Ki67 positivas no procedimento de imuno-histoquímica nos animais GK do que nos normoglicêmicos, mesmo assim, essa diferença não é de grande magnitude, detectada perante contagem estereológica e a mesma não se reflete em uma neurogênese acentuada (BEAUQUIS et al., 2010). Realizamos o blot para Ki67, contudo, o mesmo mostra-se extremamente complexo em decorrência do altíssimo peso molecular da proteína (cerca de 345 kDa) e ligações inespecíficas do anticorpo.

Dcx – A expressão gênica da Doublecortina, proteína expressa nos microtúbulos de neurônios imaturos, e portanto usada largamente como marcador de neurogênese, encontra-se reduzida no grupo Controle quando comparado ao grupo GK nos ZTs 0, 12, 16, 20 e 24 no hipocampo. Esse dado corrobora os dados da literatura no que diz respeito a uma possível maior expressão de Dcx no hipocampo dos animais GK quando comparados ao modelo normoglicêmico (LANG et al., 2009; BEAUQUIS et al., 2010). No grupo GK + Mel, não observamos diferença estatística com relação ao Controle. Aqui aplicamos a mesma teoria relacionada ao Bdnf, ou seja, essa maior expressão gênica de Dcx seria uma espécie de mecanismo compensatório para uma ruptura na homeostase desta estrutura em decorrência da hiperglicemia e redução de melatonina, o que poderia comprometer a neurogênese e

neuroproteção. Faz-se importante salientar a questão de que essa maior quantidade de neurônios imaturos nos animais GK não necessariamente refletiria uma maior quantidade de neurônios maduros e integrados a circuitaria, uma vez que estas células acabariam morrendo precocemente (LANG et al., 2009; XIANG et al., 2015). Na média das fases de claro e de escuro observamos novamente a menor expressão gênica de Dcx no grupo Controle quando comparado aos grupos GK e GK + Mel, o que se repete na média nas 24 horas, dando ainda mais robustez ao dado.

No hipotálamo total não observamos diferenças relacionadas à expressão gênica de Dcx entre os grupos experimentais em nenhuma das análises, fato esperado tendo em vista que o hipotálamo não é um nicho de alta neurogênese e mesmo existindo trabalhos que demonstram marcação de novas células neuronais nesta região (e que lá estariam após migrarem de outras estruturas), estas se apresentam em baixo número (NASCIMENTO et al., 2016). Talvez mediante contagem estereológica notássemos alguma discrepância entre os grupos em núcleos hipotalâmicos específicos.

Na quantificação proteica, nos ZTs 4 e 16 (meio das fases de claro e de escuro, respectivamente) não foram observadas diferenças estatísticas em ambos tecidos, entretanto, é nítida a tendência dos animais da linhagem GK expressarem mais doublecortina do que os animais Controle na estrutura hipocampal. Essa tendência, está de acordo com a literatura no que tange a maior quantidade desta proteína no hipocampo desta linhagem (LANG et al., 2009; BEAUQUIS et al., 2010). Como dito anteriormente, sabidamente o hipotálamo apresenta marcações extremamente esparsas para Dcx (NASCIMENTO et al., 2016), por não se tratar de um nicho neurogênico.

Caspase 3 - Com relação a expressão gênica hipocampal de Caspase 3, uma protease que possui papel fundamental no processo de apoptose celular, observamos diferença estatística na análise diária de seis pontos, somente no ZT 4 entre os grupos Controle e GK + Mel e no ZT 20 entre os grupos Controle e GK. Não existem relatos na literatura de que a suplementação de melatonina poderia acarretar maior morte celular no SNC, o que encontramos em diversos trabalhos é justamente o oposto (LEZOUALC'H et al., 1996; RAMÍREZ-RODRIGUEZ, et al., 2012; KIREEV; VARA; TRESGUERRES, 2013). Quanto as médias nas fases de claro, escuro e média nas 24 horas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os três grupos.

De forma extremamente interessante, no hipotálamo a expressão gênica de caspase 3 tem uma preponderante redução no ZT 16 em todos os grupos experimentais, isso ocorre próximo ao pico secretório de melatonina pineal (CIPOLLA-NETO e AFECHÉ, 2008), fato

que nos faz pensar que a estrutura hipotalâmica, quando banhada com a indolamina em questão, possui uma redução nos processos apoptóticos, fato que não é observado no hipocampo, provavelmente em decorrência de questão anatômica. A melatonina secretada pela pineal profunda é diretamente lançada no terceiro ventrículo, via recesso pineal, conseqüentemente atingindo o hipotálamo em altas concentrações, diferentemente do hipocampo (3 a 60 vezes maior, dependendo da espécie, que a concentração plasmática; no ventrículo lateral é de 3 a 7 vezes menor que no terceiro ventrículo (CIPOLLA e AMARAL, 2018).

Na quantificação proteica de Caspase3 mediante blot, temos duas frações da proteína em questão (17 kDa e 19 kDa), ambas clivadas. No hipocampo, na fração de 17 kDa, observamos uma forte tendência a menor expressão desta no ZT 16, próximo ao pico secretório de melatonina. Dado extremamente interessante e que necessita ser melhor elucidado, aqui levantamos a hipótese da melatonina estar atuando diretamente sobre os processos de morte celular nesta estrutura, portanto, possivelmente, animais pinealectomizados, ganglionectomizados ou submetidos a administração de Luzindol (inibidor dos receptores de melatonina) apresentariam elevados níveis de caspase 3 durante a noite, em decorrência da não secreção ou da não atuação da melatonina. Ainda no hipocampo, na fração de 19 kDa, permanece a tendência à menor quantidade de caspase 3 clivada no período escuro, contudo, não observamos diferença estatística entre os grupos e entre os períodos.

Quando olhamos para o hipotálamo, não observamos diferenças na fração de 17 kDa, entretanto, apesar de não ser estatístico, na fração de 19 kDa existe a tendência da menor expressão no período escuro, sem a mesma robustez observada no hipocampo, onde os processos plásticos neurais e, conseqüentemente, a renovação celular parece ser muito mais acentuada. Vale ressaltar que os dados obtidos no blot de caspase 3 corroboram os dados obtidos na expressão gênica, tendo em vista, principalmente, o decréscimo do mRNA desta no hipotálamo, próximo ao pico de melatonina. Na literatura temos somente dois trabalhos que correlacionam ritmos biológicos com apoptose celular nestas estruturas em camundongos com deleção dos receptores de melatonina (FREDRICH et al., 2015, 2017), portanto, faz-se necessário um trabalho mais amplo para investigar de que forma esta indolamina poderia, do ponto de vista molecular, atuar sobre as vias apoptóticas nestas estruturas.

Vegf – O fator de crescimento derivado do endotélio mostrou ser significativamente diferente no hipocampo (mRNA) entre os grupos Controle e GK, no ZT 20, próximo ao pico

secretório de melatonina, aqui a suplementação conseguiu reverter o quadro da superexpressão observada no GK. Observa-se também diferença no grupo GK entre fases de claro e de escuro; já na média nas 24 horas, os grupos não são diferentes. No hipotálamo, observamos diferença estatística somente na média das fases de claro e de escuro entre o grupo GK, da mesma forma que o dado referente ao hipocampo. É relatado que o diabetes promove nos animais Goto-Kakizaki, neovascularizaçãocerebral defeituosa via Vegf curiosamente essa angiogênese é observada somente no sistema nervoso central e não na periferia (PRAKASH et al., 2012). Ainda existem dados na literatura que mostram que a melatonina pode atuar como fator de supressão de Vegf em alguns tipos celulares (ÁLVAREZ-GARCIA., 2012; KANDEMIR et al., 2018) e estimulanteem outros (TANG et al., 2014; BORGES et al., 2015), exercendo uma ação de dupla via, de acordo com a necessidade do tecido em questão. O que o dado obtido nos mostra, é que a suplementação de melatonina é capaz de reduzir a expressão gênica de Vegf nos animais GK, assinalando que o efeito observado no animal diabético provavelmente não é uma consequência da hiperglicemia mas, sim, da redução secundária da produção de melatonina. Por outro lado, essa redução provocada pela suplementação terapêutica de melatonina pode contribuir, possivelmente, para que se amenize a já citada formação anômala de novos vasos. Importante salientar que o Vegf é uma proteína envolvida também no processo de neurogênese em situações fisiológicas e patológicas (LOUISSAINT et al., 2002; HAN et al., 2017), e que a maior expressão gênica de Vegf nos animais GK, podem contribuir para a já discutida maior expressão gênica de Dcx nestes grupos.

Gfap—A proteína ácida fibrilar glial é expressa no sistema nervoso central não somente em astrócitos, mas também em células tronco neurais (KEMPERMANN, 2011), isso nos fez pensar, a princípio, que a maior expressão gênica de Gfaphipocampal no grupo Controle (ZT 12, 16 e média das 24 horas) pudesse significar um maior “pool” de células tronco neurais, entretanto, isso se dá de forma ainda mais preponderante no hipotálamo, onde o grupo Controle apresenta maior expressão gênica em 5 pontos ao longo do dia, bem como diferença na média dia, noite e média diária. Não sendo o hipotálamo um nicho neurogênico (portanto, obviamente, não sendo dotado de grupos de células tronco neurais) nossa hipótese citada a respeito do hipocampo fica passível de ser questionada. Beauquis et al. (2010) não observou diferença significativa quando realizou contagem estereológica no hipocampo de células positivas para Gfap em animais normoglicêmicos e animais Goto-Kakizaki, todavia, dados na literatura mostram que os animais GK possuem uma astrogliose (PRAKASH et al., 2013), a qual cursa com alteração no metabolismo energético cerebral decorrente do quadro hiperglicêmico crônico (GIRAULT et al., 2017) o que os deixa mais suscetíveis a doenças

neurodegenerativas. Vale ressaltar que em alguns pontos ao longo do dia a suplementação de melatonina foi capaz de reverter tal fenômeno, principalmente no hipotálamo.

NeuN-Proteína expressa em neurônios maduros, portanto, muito utilizada na literatura como marcador neuronal. Não observamos diferenças significativas na expressão gênica de NeuN no hipocampo e hipotálamo dos grupos estudados. Este fato revela que a maior expressão gênica de Dcx nos animais GK não cursa com uma maior quantidade de neurônios maduros nas estruturas aqui citadas, dados que corroboram os poucos trabalhos presentes na literatura acerca deste tema (LANG et al., 2009; BEAUQUIS et al., 2010). No procedimento de Western blot para NeuN, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, tampouco entre a fase de claro (ZT 4) e escuro (ZT 16) em ambos tecidos analisados. Este dado corrobora a literatura no que diz respeito ao fato de que a maior expressão proteica de Dcx não se reflete num maior número de neurônios nestas estruturas (LANG et al., 2009; BEAUQUIS et al., 2010), e que os níveis análogos de NeuN entre os grupos se dá, provavelmente, à custa, justamente, de uma maior ativação das células tronco neurais e ao surgimento de uma maior quantidade de neurônios imaturos. Talvez, se a expressão de Dcx, bem como da neurotrofina Bdnf não fosse diferente entre os grupos, iríamos observar uma redução de NeuN na linhagem GK. Obviamente, o procedimento de quantificação por blot perde a capacidade de aferir sutis disparidades entre os grupos, para tanto, seria necessário a realização de uma imuno-histoquímica com contagem estereológica.

IBA1 – A microglia é a célula do sistema imune residente no SNC, possui papel fundamental na proteção e consequente homeostase do encéfalo, fazendo um monitoramento do microambiente em questão, representando cerca de 10% do total das suas células (LENZ e McCARTHY, 2015). Podem assumir duas diferentes formas: a forma quiescente (M1), com corpo celular pequeno e ramificações amplas ou na forma ativa (M2), mediante injúrias virais, bacterianas e traumáticas, assumindo um formato ameboide. Em um quadro neuroinflamatório, esperamos a predominância do formato M2, fato que não ocorreu quando realizamos um estudo de imuno-histoquímica para IBA1, olhando para diversas estruturas cerebrais. Com relação a sua expressão gênica, não observamos diferenças ao longo dos seis pontos no hipocampo, contudo, a média do grupo GK (claro) é diferente da média do grupo GK (escuro), não existindo discrepância entre os grupos na média nas 24 horas, apesar da tendência do grupo Controle apresentar uma maior expressão gênica da proteína em questão.

Já no hipotálamo, notamos diferença em um ponto (ZT 8), grupo GK vs GK + Mel. Na média das fases de claro e de escuro, não observamos diferença entre os grupos, contudo, na

média das 24 horas animais do grupo Controle apresentam maior expressão gênica de IBA1. Diante de tais fatos, acreditamos ser possível a melatonina (sabidamente dotada de capacidade neuroprotetora) promover elevações pontuais da expressão gênica de IBA1 dentro das 24 horas, contribuindo na imunidade inata do SNC (KAUR e LING, 1999). Contudo, considerando um ponto no meio do claro e outro no meio do escuro não observamos diferenças significativas entre os grupos nos blots para a proteína IBA1. Dada a diferença de expressão gênica no ZT 8 é possível que uma análise da expressão protéica, realizada em mais pontos ao longo das 24 horas mostrasse eventuais diferenças entre os grupos.

IL1 β – A interleucina 1 β , um dos mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória, não se mostra diferente entre os grupos com relação a sua expressão gênica no hipocampo dos animais em nenhuma análise. Já no hipotálamo, observamos diferença significativa entre os grupos Controle e GK + Mel, o qual parece expressar uma maior quantidade de IL1 β na transição do período escuro para o claro. Esse é um fato a esclarecer uma vez que se demonstra atividade anti-inflamatória da melatonina (MAURIZ et al., 2013) e a ausência de relatos na literatura de que a mesma seria capaz de promover o oposto. Nas demais análises hipotalâmicas, não houve diferença estatística entre os grupos.

No blot para interleucina 1 β , não foi detectada nenhuma diferença entre os grupos, tampouco entre os ZTs, com uma tendência, não significante, em menor expressão (hipotalâmica) no período escuro, ou seja, na presença de melatonina.

Tnf α - Acitocina denominada fator de necrose tumoral α , da mesma forma que a IL1 β , está presente no quadro de neuroinflamação nas mais diversas situações, inclusive no diabetes do tipo 2 (ARRUDA et al., 2011; MILANSKI et al., 2012). No nosso modelo experimental não se demonstrou alteração no hipocampo entre os grupos experimentais ao longo dos seis pontos diários, tampouco nas médias realizadas. No hipotálamo, da mesma forma, não observamos diferença estatística entre os grupos ao longo dos seis pontos, assim como na média das 24 horas. Por outro lado, na média das fases de claro e de escuro, temos significativa diferença entre os grupos GK (claro) VS GK (escuro) e GK + Mel (claro) VS GK + Mel (escuro). Tendo em vista a ação anti-inflamatória da melatonina citada acima, bem como o fato dos animais da linhagem GK apresentarem uma significativa redução na síntese e secreção deste neuro-hormônio (FRESE et al., 2009), supomos que essa elevação na expressão gênica da proteína em questão no período escuro, esteja diretamente relacionada a diminuta quantidade de melatonina circulante nos animais GK quando comparados ao grupo Controle e que a suplementação via oral não reverte o quadro. Vale ressaltar que a

hiperglicemia não exacerbada desta linhagem, pode não acarretar processos neuroinflamatórios em curto/médio prazo como modelos hiperglicêmicos mais acentuados (estreptozotocina) (KUMAR et al., 2013; RANA et al., 2014) e que o sistema nervoso central é sempre preservado ao máximo mediante injúria com relação a outros sistemas do organismo, talvez a inflamação acentuada observada perifericamente nestes animais (XUE et al., 2011) atinja nossas estruturas de interesse com maior impacto de formatardia.

Ainda a cerca do hipotálamo, é válido ressaltar que trabalhamos com a estrutura total e não com núcleos específicos, os quais, podem apresentar processos inflamatórios particulares, para sanar tal dúvida seria necessário um trabalho com a dissecação dos mais diversos núcleos hipotalâmicos seguido destas diversas análises.

Por motivos técnicos, não foi possível ter, ainda, os resultados para o Westernblot para Tnf α .

Cx3cl1 - A quimiocina denominada Cx3cl1, também conhecida como fractalquina, está envolvida nas etapas iniciais de ativação da inflamação em estruturas encefálicas, mais especificamente, no hipotálamo, como após administração de dieta hiperlipídica (MORARI et al., 2013). A mesma é produzida por neurônios e atua mediando a comunicação destes com a microglia, iniciando a ativação da mesma mediante insulto de qualquer origem (CARDONA et al., 2006, 2008). Em nenhuma das nossas análises encontramos diferença entre os grupos no que diz respeito a expressão gênica dessa quimiocina.

7 Conclusão

Este estudo concluiu que o quadro de diabetes tipo 2 característico da linhagem de animais Goto-Kakizaki promove alterações na expressão gênica e proteica de fatores envolvidos na neurogênese e que isso se dá provavelmente como mecanismo compensatório ao insulto hiperglicêmico com suas comorbidades características e que a melatonina é capaz, em determinados momentos, de amenizar tais alterações. Conclui-se também que o diabetes observado nos animais GK não é decorrente de processos inflamatórios no hipotálamo, ainda, a doença em questão não parece promover quaisquer indícios de inflamação hipocampal.

Referências

- ABBAS, A.K. ; JANEWAY, C.A. Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**. v. 100 (1), p. 129-138. 2000. Review.
- ABDELSAID, M.; COUCHA, M.; HAFEZ, S.; YASIR, A.; JOHNSON, M.H.; ERGUL, A. Enhanced VEGF signalling mediates cerebral neovascularisation via downregulation of guidance protein ROBO4 in a rat model of diabetes. **Diabetologia**. v. 60, p. 740-750. 2017.
- AKASH, M.S.; REHMAN, K.; CHEN, S. Goto-Kakizaki rats: as non- obese diabetic animal model for spontaneous type 2diabetes mellitus. **Curr Diabetes Rev**. v.9 (5), p.387-396. 2013. Review.
- ALBERG, M.A.; ABERG, N.D.; HEDBACKER, H.; OSCARSSON, J.; ERIKSSON, P.S. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. **J Neurosci**. v. 15, p.:2896-2903. 2000.
- ALTMAN, J. **Are New Neurons Formed in the brain**. January, 1962.
- ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 128, n. 4, p. 431–473, 1966.
- ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 137, n. 4, p. 433–457, 1969.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 124, n. 3, p. 319–335, 1965.
- ALVAREZ-GARCÍA, V.; GONZÁLEZ, A.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; COS, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. **J. Pineal Res**. v.54, p. 373-380. 2013.
- AMARAL, F.G.; TURATI, A. O.; BARONE, M.; SCIALFA, J.H.; CARMO-BUONFIGLIO, D.; PERES, R.; GARCIA, R.A.P.; AFECHE, S.C.; LIMA, L.; SCAVONE, C.; BORDIN, S.; REITER, R. J.; MENNA-BARRETO, L.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes derived hyperglycemia. **J. Pineal Res.**, v.57, p. 67-79, 2014.
- AMBROGINI, P.; LATTANZI, D.; CIUFFOLI, S.; AGOSTINI, D.; BERTINI, L.; STOCCHI, V.; SANTI, S.; CUPPINI, R. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. **Brain research**, v. 1017, n. 1-2, p. 21–31, 2004.

ANDERSSON, A.K.; SANDLER, S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1[β]-induced damage of rodent pancreatic [β]-cells. **J. Pineal Res.**, v. 30, p.157-165, 2001.

ARENDDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman & Hall, 1995.

ARRUDA, A.P.; MILANSKI, M.; COOPE, A.; TORSONI, A.S.; ROPOLLE, E.; CARVALHO, D.P.; CARVALHEIRA, J.B.; VELLOSO, L.A. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. **Endocrinology**. v. 152 (4), p.1314-1326. 2011.

BARTELS, A.L.; LEENDERS, K.L. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. **Curr Neuropharmacol**. v. 8(1), p.62-68. 2010.

BEAUQUIS, J.; HOMO-DELARCHE, F.; GIROIX, M.H.; EHSES, J.; COULAUD, J.; ROIG, P.; PORTHA, B.; DE NICOLA, A.F.; SARAVIA, F. Hippocampal neurovascular and hypothalamic–pituitary–adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats. **Experimental Neurology**. v. 222, p. 125-134. 2010.

BERNIER, P. J.; BEDARD, A.; VINET, J.; LEVESQUE, M.; PARENT, A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11464-9, 2002.

BISBIS, S.; BAILBE, D.; TORMO, M.A.; PICAREL - BLANCHOT, F.; DEROUET, M.; SIMON, J.; PORTHA, B. Insulin resistance in the GK rat : decreased receptor number but normal kinase activity in liver. **Am J Physiol.**, 1993.

BORGES, L.S.; DERMARGOS, A.; SILVA JÚNIOR, E.P.; WEIMANN, E.; LAMBERTUCCI, R.H.; HATANAKA, E. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. **J. Pineal Res.**v. 58, p. 166-172. 2015.

BOYUK, B.; DEGIRMENCIOGLU, S.; ATALAY, H.; GUZEL, S.; ACAR, A.; CELEBI, A.; EKIZOGLU, I.; SIMSEK, C. Relationship between levels of brain-derived neurotrophic factor and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Res**. 2014.

BRANDT, M. D.; JESSBERGER, S.; STEINER, B.; KRONENBERG, G.; REUTER, K.; BICK-SANDER, A.; BEHRENS, W. von der; KEMPERMANN, G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 603–613, 2003.

BRANNVALL, K.; BOGDANOVIC, N.; KORHONEN, L.; LINDHOLM, D. 19-Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. **Eur J Neurosci**. v. 21(4), p. 871-878. 2005.

BUONFIGLIO, D.; PARTHIMOS, R.; DANTAS, R.; SILVA, R.C.; GOMES, G.; ANDRADE-SILVA, J.; RAMOS-LOBO, A.; AMARAL, F.G.; MATOS, R.; SINÉSIO, J.; MOTTA-TEIXEIRA, L.C.; DONATO JR., J.; REITER, R.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin absence leads to long-term leptin resistance and overweight in rats. **Frontiers in Endocrinology**. 2018.

CALEGARI, V.C.; TORSONI, A.S.; VANZELA, E.C.; ARAÚJO, E.P.; MORARI, J.; ZOPPI, C.C.; SBRAGIA, L.; BOSCHERO, A.C.; VELLOSO, L.A. Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. **J Biol Chem**. v. 286 (15), p. 12870-12880. 2011.

CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 203–209, 1994.

CAPPELLANO, G.; CARECCHIO, M.; FLEETWOOD, T.; MAGISTRELLI, L.; CANTELLO, R.; DIANZANI, U.; COMI, C. Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. **Am J Neurodegener Dis**.v. 2 (2), p.89-107. 2013.

CARDINALI, D. P.; GOLOMBEK, D.A.; ROSENSTEIN, R. E.; CUTRERA, R.A.; ESQUIFIN, A.I. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? **J Pineal Res.**, v. 263,p. 32-39, 1997.

CARPENTIERI, A.; DÍAZ DE BARBOSA, G.; ARECOA, V.; LÓPEZA, M.P.; TALAMONI, N.T. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, p.437–444, 2012.

CARLBERG, C.; WIESENBERG, I. The orphan receptor family RZR / ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: expected relationship. **J. Pineal Res.**,v.4,p.171-178, Review, 1995.

CHENG, M.-F. Hypothalamic neurogenesis in the adult brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 34, n. 3, p. 167–178, 2013.

CHU, J.; TU, Y.; CHEN, J.; TAN, D.; LIU, X.; PI, R. Effects of melatonin and its analogues on neural stem cells. **Molecular and cellular endocrinology**. v. 420, p. 169–179, 2016.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. Melatonin as a hormone: New physiological and clinical insights. **Endocr Rev**. v. 39. p. 990-1028. 2018.

CIPOLLA-NETO, J.; SKORUPA, A.L.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BARTOL, I.; MOTA, S. R.; AFECHE, S. C.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; CANTERAS, N.S. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. **Neuroendocrinology**, v. 69,p. 97-104, 1999.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 981-990.

CIVELEK, S.; KONUKOGLU, D.; ERDENEN, F.; UZUN, H. Serum neurotrophic factor levels in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to metabolic syndrome components. **Clin Lab.** v. 59 (3-4), p. 369-374. 2013.

CORDEIRA, J.; RIOS, M. Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior. **Mol Neurobiol.** v. 44(3), p.441-448. 2011. Review.

DAS, S.; BASU, A. Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. **J Neurosci Res.** v. 86, p.1199-1208. 2008. Review.

DUAN, X.; KANG, E.; LIU, C. Y.; MING, G.-L.; SONG, H. Development of neural stem cell in the adult brain. **Current opinion in neurobiology**, v. 18, n. 1, p. 108 – 15, 2008.

EKSTROM, P.; MEISSL, H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. **Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.**,v.358, p.1679-1700, 2003.

ENCINAS, J. M.; ENIKOLOPOV, G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. **Methods in cell biology**, v. 85, p. 243–72, 2008.

ENCINAS, J. M.; SIERRA, A. Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. **Behaviour Brain Research**, v. 227, n. 2, p. 433–9, 2012.

ERIKSSON, P. S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; ALBORN, a M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. **Curr Neuropharmacol.** v. 8 (3), p. 228-242. 2010.

FISCHER, C.; MUELLER, T.; PFEFFER, M.; WICHT, H.; VON GALL, C.; KORF, H.W. Melatonin Receptor 1-Deficiency Affects Feeding Dynamics and Pro-Opiomelanocortin Expression in the Arcuate Nucleus and Pituitary of Mice. **Neuroendocrinology.** 2016.

FOWLER, C. D.; LIU, Y.; OUIMET, C.; WANG, Z. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. **Journal of Neurobiology**, v. 51, n. 2, p. 115–128, 2002.

FREDRICH, M.; CHRIST, E.; DEROUICHE, A.; KORF, H.W. Impact of melatonin on zeitgeber time-dependent changes in cell proliferation and apoptosis in the adult murine hypothalamic-hypophyseal system. **Neuroendocrinology.** v. 102, p. 311-326. 2015.

FREDRICH, M.; HAMPEL, M.; SEIDEL, K.; CHRIST, E.; KORF, H.W. Impact of Melatonin Receptor-Signaling on Zeitgeber Time-Dependent Changes in Cell Proliferation and Apoptosis in the Adult Murine Hippocampus. **Hippocampus.** v. 27, p. 495-506. 2017.

FRESE, T.; BACH, A.G.; MUHLBAUER, E.; PONICKE, K.; BROMME, H.J.; WELP, A.; PESCHKE, E. Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats.

Life Sci. v. 85, p. 526-533.2009.

FRUHBEIS, C.; FROHLICH, D.; KUO, W. P.; KRAMER-ALBERS, E. M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. **Front. Cell. Neurosci.** v. 7, p. 182. 2013.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433–1438, 2000.

GARCIA, R.A.P.; AFECHE, S.C.; SCIALFA, J.H.; AMARAL, F.G.; SANTOS, S.H.J.; LIMA, F.B.; YOUNG, M.E.; CIPOLLA-NETO, J. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in culture rat pineal gland. **Life Sciences**. v.82, p.108–114, 2008.

GARCIA, R.A.P.; MARÇAL, A.C.; SILVA, J.A.; CARMO-BUONFIGLIO, D.; AMARAL, F.G.; AFECHE, S.C.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C.R.O. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. **Life Sciences**. v.87, p.169–174, 2010.

GIRAULT, F.M.; SONNAY, S.; GRUETTER, R.; DUARTE, J.M.N. Alterations of brain energy metabolism in type 2 diabetic goto-kakizaki rats measured in vivo by ¹³C magnetic resonance spectroscopy. **Neurotox Res**. 2017.

GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. **Tohoku J Exp Med**. v. 119(1), p.85-90. 1976.

GOULD, E.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; GALEA, L.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 2492–2498, 1997.

GOULD, E.; REEVES, A.J.; FALLAH, M.; TANAPAT, P.; GROSS, C.G.; FUCHS, E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. **Proc.Natl.Acad.Sci**. v. 96, p. 5263–5267, 1999.

GOULD, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. June, p. 481–488, 2007.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a edição. Editora: Elsevier, São Paulo. 2011.

HAKIM, Z.S.; PATEL, B.K.; GOYAL, R.K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian J Pharmacol**. v.41, p.353-360, 1997.

HAN, C.; RICE, M.W.; CAI, D. Neuroinflammatory and autonomic mechanisms in diabetes and hypertension. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 311(1), p. 32-41. 2016. Review.

HAN, W.; SONG, X.; HE, R.; LI, T.; CHENG, L.; XIE, L.; CHEN, H.; JIANG, L. VEGF regulates hippocampal neurogenesis and reverses cognitive deficits in immature rats after status epilepticus through the VEGF R2 signaling pathway. **Epilepsy & Behavior**. v. 68, p. 159-167. 2017.

HO, N.; SOMMERS, M.S.; LUCKI, I. Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. **Neuro Sci Biobehav Rev**. v. 37(8), p. 1346-1362. Review. 2013.

HUSSAIN, S.; MANSOURI, S.; SJOHOLM, A.; PATRONE, C.; DARSALIA, V. Evidence for Cortical Neuronal Loss in Male Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 41, p. 551-560. 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **The Diabetes Atlas**. Third Edition. Brussels : International Diabetes Federation. 2015.

JACKSON-GUILFORD, J.; LEANDER, J.D.; NISENBAUM, L.K. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. **Neurosci Lett**. v. 293, p.91-94, 2000.

JIN, K.; ZHU, Y.; SUN, Y.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 11946-11950. 2002.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A.E.; RENOLD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc Soc Exp Biol Med**.v.126 (1), p. 201-205. 1967.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest**.v. 48(11), p. 2129-2139. 1969.

KANDEMIR, Y.B.; KONUK, E.; BEHRAM, M.; SINDEL, M. Effect of melatonin on the expression of VEGF-A and on the degeneration of follicle reserve in rat ovary. **Eurasian J Med**. v. 50, p. 160-163. 2018.

KAPLAN, M. S.; HINDS, J.W. Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**, v. 197, n. 4308, p. 1092–1094, 1977.

KAPLAN, M. S.; BELL, D. H. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodentradioautographic study of granule cells in the hippocampus. **Experimental brain research**, v. 52, n. 1, p. 1–5, 1983.

KARAASLAN, C.; SUZEN, S. Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. **Curr Top Med Chem**.v. 15(9), p.894-903. 2015. Review.

KAUR, C.; LING, E.A. Effects of melatonin on macrophages/microglia in postnatal rat brain. **J Pineal Res**. v. 26, p. 158-168. 1999.

KEE, N.; SIVALINGAM, S.; BOONSTRA, R.; WOJTOWICZ, J.M. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 115, p. 97-105. 2002.

KEMPERMANN, G.; JESSBERGER, S.; STEINER, B.; KRONENBERG, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 447–452, 2004.

KEMPERMANN, G. Adult neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain. 1. ed. [s.l.] **Oxford University Press**, 2005.

KEMPERMANN, G. **Adult Neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain**. 2nd ed. USA: Oxford University Press, 2010.

KEMPERMANN, G. **Adult neurogenesis**. 2. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2011.

KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; NATTERU, P.A. SELVAKUMAR, G.P.; SAEED, D.; ZAHOOOR, H.; ZAHEER, S.; IYER, S.S.; ZAHEER, A. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **J Neurol Neurosurg Spine**. v. 1(1). 2016.

KIREEV, R.A.; VARA, E.; TRESGUERRES, J.A.F. Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats. **Biogerontology**. v.14, p-431-442. 2013.

KLEIN, D.C.; COON, S.L.; ROSEBOOM, P.H.; WELLER, J.L.; BERNARD, M.; GASTEL, J.A.; ZATZ, M.; IUVONE, P.M.; RODRIGUEZ, I.R.; BÉGAY, V.; FALCÓN, J.; CAHILL, G.M.; CASSONE, V.M.; BALER, R. The melatonin rhythm-generation enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. **Rec. Prog. inHorm.Res.**, v. 52, p. 307-358, 1997.

KONG, X.; LI, X.; CAI, Z.; YANG, N.; LIU, Y.; SHU, J.; PAN, L.; ZUO, P. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 28, p. 569-579, 2008.

KORNACK, D. R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5768–5773, 1999.

KRONENBERG, G.; REUTER, K.; STEINER, B.; BRANDT, M. D.; JESSBERGER, S.; YAMAGUCHI, M.; KEMPERMANN, G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 4, p. 455–463, 2003.

KUHN, H. G.; WINKLER, J.; KEMPERMANN, G.; THAL, L. J.; GAGE, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 15, p. 5820–5829, 1997.

KUMAR, B.; GUPTA, S.K.; SRINIVASAN, B.P.; NAG, T.C.; SRIVASTAVA, S.; SAXENA, R.; JHA, K.A. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. **Microvasc Res.** p. 65-74. 2013.

KUWABARA, W.M.T.; PANVELOSKI-COSTA, A.C.; NAOMI, C.; YOKOTA, F.; PEREIRA, J.N.B.; FILHO, J.M.; TORRES, R.P.; HIRABARA, S.M.; CURI, R.; ALBALOUREIRO, T.C. Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? **PLoS One.** v.12. 2017.

LANG, B.T.; YAN, Y.; DEMPSEY, R.J.; VEMUGANTI, R. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. **Brain Res.** v. 33, p. 25-33. 2009.

LEAL-GALICIA, P.; SALDÍVAR-GONZÁLEZ, A.; MORIMOTO, S.; ARIAS, C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: Role of individual responsiveness to anxiety. **Developmental Neurobiology,** v. 67, n. 4, p. 395–405, 2007.

LEE, D.; BLACKSHAW, S. Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. **International Journal of Developmental.** v. 30, n. 8, p. 615–621, 2012.

LENZ, K.M.; MCCARTHY, M.M. A starring role for microglia in brain sex differences. **Neuroscientist.** v. 21, p. 306-321. 2015.

LEZOUALC'H, F.; SKUTELLA, T.; WIDMANN, M.; BEHL, C. Melatonin prevents oxidative stress-induced cell death in hippocampal cells. **Neuro Report.** v. 7, p. 2071-2077. 1996.

LIEBERWIRTH, C.; LIU, Y.; JIA, X.; WANG, Z. Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. **Hormones and behavior,** v. 62, n. 4, p. 357–66, 2012.

LINDQVIST, A.; MOHAPEL, P.; BOUTER, B.; FRIELINGS DORF, H.; PIZZO, D.; BRUNDIN, P.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **Eur J Neurol.** v. 13(12), p. 1385-1388. 2006.

LIU, W.; HAN, X.; ZHOU, X.; ZHANG, S.; CAI, X.; ZHANG, L.; LI, Y.; LI, M.; GONG, S.; JI, L. Brain derived neurotrophic factor in newly diagnosed diabetes and prediabetes. **Mol Cell Endocrinol.** v. 429, p.106-113. 2016.

LOUISSAINT, A.; RAO, S.; LEVENTHAL, C.; GOLDMAN, S. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. **Neuron.** v. 34, p. 945-960. 2002.

MANDA, K.; UENO, M.; ANZAI, K. Cranial irradiation-induced inhibition of neurogenesis in hippocampal dentate gyrus of adult mice: attenuation by melatonin pre treatment. **J Pineal Res.,** v. 46, p. 71–78, 2008.

MANDA, K.; REITER, R.J. Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and

cognitive functions after irradiation. **Progressin Neurobiology**, v. 90, p. 60-68, 2010.

MAURIZ, J.L.; COLLADO, P.S.; VENEROSO, C.; REITER, R.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Are view of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **J Pineal Res.**v. 54(1), p.1-14. 2013. Review.

MILANSKI, M.; ARRUDA, A.P.; COOPE, A.; IGNACIO-SOUZA, L.M.; NUNEZ, C.E.; ROMAN, E.A.; ROMANATTO, T.; PASCOAL, L.B.; CARICILLI, A.M.; TORSONI, M.A.; PRADA, P.O.; SAAD, M.J.;VELLOSO,L.A. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. **Diabetes.**v. 61, p.1455-1462. 2012.

MOLLER,M. Fine structure of the pineal innervation of the mammalian pineal gland. **Microsc. Res. Tech.**, v. 3, p. 188-204, Review, 1992.

MONTALBANO, G.; MANIA, M.; ABBATE, F.; NAVARRA, M.; GUERRERA, M.C.; LAURA, R.; VEGA, J.A.; LEVANTI, M.; GERMANÀ, A. Melatonin treatment suppresses appetite genes and improves adipose tissue plasticity in diet-induced obese zebrafish. **Endocrine.** v. 62, p. 381-393. 2018.

MORARI, J.; ANHÊ, G.;NASCIMENTO, L.; MOURA, R.F.; RAZOLLI, D.; SOLON, C.; GUADAGNINI, D.; SOUZA, G.; MATTOS, A.H.; TOBAR, N.; RAMOS, C.D.; PASCOAL, V.D.; SAAD, M.J.; LOPES-CENDES, I.; MORAES, J.C.; VELLOSO, L.A. Fractalkine (CX3CL1) is involved in the early activation of hypothalamic inflammation in experimental obesity. **Diabetes.** v. 63, p. 3770-3784. 2014.

MORIYA, T.; HORIE, N.; MITOME, M.; SHINOHARA ,K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. **J Pineal Res.** v.42, p.411–418,2007.

MUELLER, A. D.; MEAR, R. J.; MISTLBERGER, R. E. Inhibition of hippocampal neurogenesis by sleep deprivation is independent of circadian disruption and melatonin suppression. **Neuroscience**, v. 193, p. 170-181, 2011.

NASCIMENTO, L.F.; SOUZA, G.F.; MORARI, J.; BARBOSA, G.O.; SOLON, C.; MOURA, R.F.; VOCTÓRIO, S.C.; IGNÁCIO-SOUZA, L.M.; RAZOLLI, D.S.; CARVALHO, H.F.; VELLOSO, L.A. n-3 Fatty Acids Induce Neurogenesis of Predominantly POMC-Expressing Cells in the Hypothalamus. **Diabetes.** v. 65(3), p. 673-686. 2016.

NATHAN, D.M. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA.** v.10, p.1052-1062. 2015. Review.

NIWA, A.; NISHIBORI, M.; HAMASAKI, S.; KOBORI, T.; LIU, K.; WAKE, H.; MORI, S.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, H. Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and pendymallining of the third ventricle. **Brain Struct Funct.** p. 1-14. 2015.

OKUDA, H.; TATSUMI, K.; MAKINODAN, M.; YAMAUCHI, T.; KISHIMOTO, T.; WANAKA, A. Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 16, p. 3546 – 3553, 2009.

PÉREZ-MARTÍN, M.; CIFUENTES, M.; GRONDONA, J.M.; LÓPEZ-AVALOS, M.D.; GÓMEZ-PINEDO, U.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; FERNÁNDEZ-LLEBREZ, P. IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. **Eur J Neurosci**.v. 31(9), p.1533-1548. 2010.

PENCEA, V.; BINGAMAN, K.D.; WIEGAND, S.J.; LUSKIN, M.B. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. **J Neurosci**. v. 21, p. 6706-6717. 2001.

PIERCE, A.A.; XU, A.W. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. **J Neurosci**.v.30(2), p.723-730. 2010.

PRAKASH, R.; SOMANATH, P.R.; EL-REMESSY, A.B.; KELLY-COBBS, A.; STERN, J.E.; DORE-DUFFY, P.; JOHNSON, M.; FAGAN, S.C.; ERGUL, A. Enhanced cerebral but not peripheral angiogenesis in the Goto-Kakizaki model of type 2 diabetes involves VEGF and peroxynitrite signaling. **Diabetes**. v. 61(6), p. 1533-1542. 2012.

PRAKASH, R.; JOHNSON, M.; FAGAN, S.C.; ERGUL, A. Cerebral neovascularization and remodeling patterns in two different models of type 2 diabetes. **PLoS One**. 2013.

RAJKOVSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J. Gliogenesis and glial pathology in depression. **CNS Neurol. Disord**.v. 6, p.219–233. 2007.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; NADKARNI, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Cancer Chemother Rep**. v.29, p.91-108, 1963.

RANA, I.; BADOER, E.; ALAHMADI, E.; LEO, C.H.; WOODMAN, O.L.; STEBBING, M.J. Microglia are selectively activated in endocrine and cardiovascular control centres in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Neuroendocrinol**. v. 26(7), p. 413-425. 2014.

RAMIREZ-RODRÍGUEZ, G.; KLEMPIN, F.; BABU, H.; KING, G.B.; KEMPERMANN, G. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. **Neuropsychopharmacology**.v. 34, p. 2180–2191, 2009.

RAMIREZ-RODRÍGUEZ, G.; LOPEZ, O.; ALONSO, A.D.; KING, G.A.B.; KEMPERMANN, G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. **J Pineal Res.**v.37,p.50-29, 2011.

RAMIREZ-RODRÍGUEZ, G.; VEGA-RIVERA, N.M.; BENÍTEZ-KING, G.; CASTRO-GARCÍA, M.; ORTÍZ-LOPEZ, L. Melatonin supplementation delays the decline of adult hippocampal neurogenesis during normal aging of mice. **Neuroscience Letters.** v. 530, p. 53-58, 2012.

RAMOS-LOBO, A.M.; BUONFIGLIO,D.C.; CIPOLLA-NETO, J. Streptozotocin-induced diabetes disrupts the body temperature daily rhythm in rats. **Diabetol Metab Syndr.**v. 29, p.7:39, 2015.

RANA,I.;BADOER, E.; ALAHMADI, E.; LEO, C.H.; WOODMAN,O.L.; STEBBING ,M.J. Microglia are selectively activate endocrine and cardiovascular control centres in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Neuroendocrinol.**v.26(7), p.413-425.2014.

REITER, R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 79, p.153–158, 1991.

REITER, R.J. The melatonin rhythm- botha clock and calendar .**Experientia.** v.49, p. 654-664, 1993.

RENNIE, K.; BUTTE, M.; PAPAS, B.A. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. **J Pineal Res.** v. 47, p. 313–317, 2009.

REPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol Sci.** v.17, p.100-102, 1996.

RIBAK, C. E.; KORN, M. J.; SHAN, Z.; OBENAU, A. Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. **Brain research,** v. 1000, n. 1-2, p. 195–9, 2004.

SARLAK, G.; JENWITHEESUK, A.; CHETSAWANG, B.; GOVITRAPONG, P. Effects of melatonin on nervous system aging: neurogenesis and neurodegeneration. **Journal of pharmacological sciences.** v. 123, n. 1, p. 9–24, 2013.

SCACCIANOCE, S.; DEL BIANCO, P.; PAOLONE, G.; CAPRIOLI, D.; MODAFFERI, A. M. E.; NENCINI, P.; BADIANI, A. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. **Behavioural brain research,** v. 168, n. 2, p. 323–5, 2006.

SEKI, T.; ARAI, Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience,** v.13, p.2351-2358, 1993.

SERI, B.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; COLLADO-MORENTE, L.; MCEWEN, B. S.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 478, n. 4, p. 359 – 378, 2004.

SHARMA, S.; SINGH, H.; AHMAD, N.; MISHRA, P.; TIWARI, A. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. **Arch Endocrinol Metab.** v.59 (5), p.391-399. 2015.

SHIVRAJ SOHUR, U.; EMSLEY, J. G.; MITCHELL, B. D.; MACKLIS, J. D. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1477–1497, 2006.

SHU, X.; ZHANG, Y.; XU, H.; KANG, K.; CAI, D. Brain-derived neurotrophic factor inhibits glucose intolerance after cerebral ischemia. **Neural Regen Res.** v. 8 (25), p. 2370-2378. 2013.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana.** Uma Abordagem Integrada. 5ªedição, Editora Artmed, São Paulo. 2010.

SMART, I. The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 116, n. 3, p. 325–347, 1961.

SOMPOL, P.; LIU, X.; BABA, K.; PAUL, K.N.; TOSINI, G.; IUVONE, P.M.; YE, K. N-acetylserotonin promotes hippocampal neuroprogenitor cell proliferation in sleep-deprived mice. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 108, p. 8844-8849, 2011.

SOUMIER, A.; BANASR, M.; LORTET, S.; MASMEJEAN, F.; BERNARD, N.; KERKERIAN-LE-GOFF, L.; GABRIEL, C.; MILLAN, M. J.; MOCAER, E.; DASZUTA, A. Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant agomelatine in the adult rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 2390-2403, 2009.

SOTTHIBUNDHU, A.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; GOVITRAPONG, P. Melatonin increases proliferation of culture neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. **J Pineal Res.** v. 49, p. 291-300, 2010.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res.**v.50, p.537-546, 2001.

TANAPAT, P.; GOULD, E. EGF stimulates proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus. **Soc Neurosci Abstr.** v. 23, p. 317. 1997.

TANG, Y.; CAI, B.; YUAN, F.; HE, X.; LIN, X.; WANG, J.; WANG, Y.; YANG, G.Y. Melatonin pretreatment improves the survival and function of transplanted mesenchymal stem cells after focal cerebral ischemia. **Cell Transplantation.** v. 23, p. 1279-1291. 2014.

TOCHARUS, C.; PURIBORIBOON, Y.; JUNMANEE, T.; TOCHARUS, J.; EKTHUWAPRANEE, K.; GOVITRAPONG, P. Melatonin enhances adult rat hippocampal progenitor cell proliferation via ERK signaling pathway through melatonin receptor. **Neuroscience**. v.275, p. 314-321. 2014.

TOZUKA, Y.; FUKUDA, S.; NAMBA, T.; SEKI, T.; HISATSUNE, T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. **Neuron**, v. 47, n. 6, p. 803–15, 2005.

UDA, M.; ISHIDO, M.; KAMI, K.; MASUHARA, M. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. **Brain Res**. n. 1104(1) p:64-72. 2006.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol Rev**. v.3, p.687-721, Review, 1998.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**. V 3. p. 266-270.1999

WANG, B.; JIN, K. Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis. **Metab Brain Dis**.v.30(2), p.355-365. 2015.

WINNER, B.; WINKLER ,J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 7(4). 2015.Review.

WHITNEY, N.P.; EIDEM, T.M.; PENG, H.; HUANG, Y.; ZHENG, J.C. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. **J Neurochem**. v. 108(6), p.1343-1359. Review. 2009.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. **Neuron**. v.35(3), p.419-432. Review. 2002.

XIANG, Q.; ZHANG, J.; LI, C.Y.; WANG, Y.; ZENG, M.J.; CAI, Z.X.; TIAN, R.B. JIA, W.; LI, X.H. Insulin resistance-induced hyperglycemia decreased the activation of Akt/CREB in hippocampus neurons: Molecular evidence for mechanism of diabetes-induced cognitive dysfunction. **Neuropeptides**. v. 54, p. 9-15. 2015.

XUE, B.; SUKUMARAN, S.; NIE, J.; JUSKO, W.J.; DUBOIS, D.C.; ALMON, R.R. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats. **PLoS One**. v.6(2). 2011.

YUAN, H.; CHEN, R.; WU, L.; CHEN, Q.; HU, A.; ZHANG, T.; WANG, Z. The Regulatory Mechanism of Neurogenesis by IGF-1 in Adult Mice. **Mol Neurobiol**. 2014.

YUAN, T.F.; GU, S.; SHAN ,C.; MARCHADO ,S.; ARIAS-CARRIÓN, O. Oxidative Stress and Adult Neurogenesis. **Stem Cell Rev**. v. 11(5), p.706-709. 2015.

ZHANG, W.J.; TAN, Y.F.; YUE, J.T.; VRANIC, M.; WOJTOWICZ, J.M. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. **Acta Neurol Scand.** v.3, p.205-210, 2008.

ZIEGLER, A.N.; LEVISON, S.W.; WOOD, T.L. Insulin and IGF receptor signaling in neural-stem-cell homeostasis. **Nat Rev Endocrinol.** v.11, p. 161-170. 2015.