

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

BRUNA PETRUCELLI ARRUDA

**Efeito da melatonina no desenvolvimento e hipocampo de ratos Wistar
submetidos à anóxia neonatal**

São Paulo
2019

BRUNA PETRUCELLI ARRUDA

**Efeito da melatonina no desenvolvimento e hipocampo de ratos Wistar
submetidos à anóxia neonatal**

Versão Original

Dissertação apresentada ao programa de
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia
Morfofuncional

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

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)

Petrucelli Arruda, Bruna

Efeito da melatonina no desenvolvimento e hipocampo de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal / Bruna Petrucelli Arruda; orientadora Maria Inês Nogueira. -- São Paulo, 2019.

59 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Déficit de oxigênio. 2. Neuroproteção da melatonina. 3. Ontogenia de reflexos. 4. Maturação de características físicas. 5. Diferenças de sexo. I. Nogueira, Maria Inês, 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:

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Ao programa de Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e seus funcionários, em especial, a Patrícia Rocha pela paciência e auxílio com todos os procedimentos acadêmicos.

A professora, doutora, Maria Inês Nogueira, pela orientação, paciência, apoio, confiança no meu trabalho, além do conhecimento compartilhado.

A Kelly Patrícia Nery Borges, pela parceria nas diversas etapas do projeto e aplicação das técnicas aplicadas.

Ao professor, doutor, Gilberto Fernando Xavier, pela disponibilização do espaço e aparato para a realização do teste de memória, no laboratório de Neurociências e Comportamento do IB-USP, e ao técnico Manoel Ferreira de Britto, pelo cuidado e manutenção dos animais.

Ao professor, doutor, Sérgio Gomes da Silva e seu aluno Fernando Serra, pelo acolhimento ao projeto e disponibilidade em explicar a metodologia do fracionador isotrópico.

Aos professores Luciana Pinato, Jackson Cioni Bittencourt e Sérgio Gomes da Silva que compuseram a banca de qualificação, pela contribuição na discussão deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Ammir Yacoub Helou, Amrita Jha Kumar, Luana Angélica Janota de Carvalho, Natalia Andrea Cruz Ochoa e Vitor Yonamine Lee, pela amizade e trocas de experiências e conhecimento, em especial à Natalia Andrea Cruz Ochoa que contribuiu ativamente no desenvolvimento deste projeto, desde o período de estágio até sua finalização.

Aos animais utilizados, que contribuem com o avanço da ciência.

Aos meus pais, Gilberto Batista Arruda e Waldirene Petrucelli, por todo amor dedicado, por acreditarem em mim e investirem na minha formação como pessoa e profissional.

A minha irmã de coração Isabella França Ferreira pelo ombro nos momentos difíceis, apoio e paciência com todas as minhas dúvidas em estatística.

A minha família em geral pelo apoio, e ao meu tio Wagner Batista de Arruda em especial pelo auxílio durante o período de estágio.

Ao meu namorado, Guilherme Valle Luppi, por todos os finais de semana que renunciou suas horas de sono para que eu não fosse sozinha à universidade fazer os experimentos e a sua família, pelas caronas e por sempre me incentivarem na minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; e auxílio pesquisa à Maria Inês Nogueira, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto 2015/12415-8.

Não existem palavras para expressar o quanto sou grata a todos vocês, muito obrigada.

“Quanto mais me aprofundo na ciência, mais me aproximo de Deus.” – Albert Einstein

RESUMO

ARRUDA, BP. Efeito da melatonina no desenvolvimento e hipocampo de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

O déficit de oxigênio constitui condição clínica com alto índice de mortalidade e morbidades que envolvem alterações tanto cognitivas quanto comportamentais. Dos diferentes modelos experimentais possíveis para estudar essa condição, o de anóxia neonatal, adaptado e validado pelo laboratório de Neurociências do ICB-USP, tem a vantagem de simular as condições clínicas de recém-nascidos pré-maturos e evidenciou prejuízos decorrentes deste estímulo nas populações gliais e neuronais do hipocampo, no córtex motor e sensorial primário, atraso no desenvolvimento sensoriomotor, assim como déficits na memória e aprendizagem. Esses resultados apontam para a necessidade de buscar métodos de tratamento que possam atenuar os danos consequentes à privação de oxigênio. Desse modo, esta pesquisa objetivou analisar a influência da melatonina no desenvolvimento, memória e número de células no hipocampo de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal. Assim, ratos, machos e fêmeas, com aproximadamente 30 h de vida foram expostos ao insulto anóxico e em seguida injeção intraperitoneal de veículo/melatonina que se repetiu por mais 2 dias. No período de aleitamento, foram avaliadas: maturação das características físicas e ontogenia de reflexos. Na fase juvenil foi avaliada memória e aprendizagem, bem como efetuada a contagem celular no hipocampo, pela técnica do fracionador isotrópico. O tratamento com melatonina atenuou o atraso causado pela anóxia na irrupção dos incisivos superiores e no reflexo de colocação pelas vibrissas, nas fêmeas, e de preensão palmar, em machos e fêmeas. Aumentou a velocidade do nado no labirinto aquático de Morris e o número de células no hipocampo dos animais expostos à anóxia neonatal, em comparação aos seus controles.

Palavras-chave: Déficit de oxigênio. Ontogenia de reflexos. Maturação de características físicas. Diferenças de sexo. Neuroproteção da melatonina. Fracionador isotrópico

ABSTRACT

ARRUDA, BP. Effect of melatonin on development and hippocampus of Wistar rats subjected to neonatal anoxia. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2019.

Oxygen deficit is a clinical condition with a high mortality rate and morbidities that involve both cognitive and behavioral changes. Of the different possible experimental models to study this condition, the neonatal anoxia, adapted and validated by the ICB-USP Neuroscience Laboratory, has the advantage of simulating the clinical conditions of preterm newborns and evidenced damages resulting from this stimulus in the populations, such as hippocampal glial and neuronal changes in the primary motor and sensory cortex, delayed sensorimotor development, and deficits in memory and learning. These results point to the need to seek treatment methods that can attenuate the damages resulting from oxygen deprivation. Thus, this research aimed to analyze the influence of melatonin on the development, memory, and the number of cells in the hippocampus of Wistar rats submitted to neonatal anoxia. Thus, male and female rats approximately 30 hours old were exposed to anoxic insult and then intraperitoneal injection of vehicle/melatonin which was repeated for a further 2 days. During breastfeeding, we evaluated the following parameters: maturation of physical characteristics and reflex ontogeny. In the juvenile phase, memory and learning were evaluated, and the isotropic fractionator technique performed hippocampal cell counting. Melatonin treatment attenuated the delay caused by anoxia in the eruption of the upper incisors and in the vibrissae placement in females and palmar grip in males and females. Increased swimming velocity in Morris water maze and hippocampal cell number in animals exposed to neonatal anoxia compared to their controls.

Key words: Oxygen deficit. Reflexion ontogeny. Maturation of physical characteristics. Sex differences. Neuroprotection of melatonin. Isotropic Fractionator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processos do desenvolvimento neurológico	15
Figura 2 - Estimativa de proliferação celular no hipocampo	17
Figura 3 - Síntese da melatonina na glândula pineal de ratos	19
Figura 4 - Sistema de Anóxia Neonatal	25
Figura 5 - Avaliação da maturação de características físicas	26
Figura 6 - Avaliação da recuperação de decúbito	27
Figura 7 - Avaliação de colocação pelas vibrissas	28
Figura 8 - Avaliação da aversão ao precipício	28
Figura 9 - Avaliação da geotaxia negativa.....	29
Figura 10 - Avaliação da resposta ao susto	29
Figura 11 - Homogeneizador de tecido	31
Figura 12 - Núcleos de células marcados com DAPI.....	32
Figura 13 - Dupla marcação DAPI-NeuN	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise da maturação de características físicas nos machos	35
Gráfico 2 - Análise da maturação de características físicas nas fêmeas	36
Gráfico 3 - Análise da ontogenia de reflexos nos machos	38
Gráfico 4 - Análise da ontogenia de reflexos nas fêmeas.....	40
Gráfico 5 - Análise dos parâmetros do Labirinto Aquático de Morris nos machos	42
Gráfico 6 - Análise dos parâmetros do Labirinto Aquático de Morris nas fêmeas	43
Gráfico 7 - Contagem de células nos machos	44
Gráfico 8 - Contagem de células nas fêmeas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre sexos na ontogenia de reflexos	45
Tabela 2 - Comparação entre sexos na contagem celular	46

LISTA DE SIGLAS

5-HT – Serotonina
AA-NAT – N-acetiltransferase de aralquilamina
AC – Adenilil ciclase
ACA – Abertura do conduto auditivo
AMF – Anóxia Melatonina Fêmea
AMM – Anóxia Melatonina Macho
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
AO – Abertura ocular
AP – Aversão ao precipício
AQL – Aceleração em queda livre
ATP – Adenosina trifosfato
AVF – Anóxia Veículo Fêmea
AVM – Anóxia Veículo Macho
CMF – Controle Melatonina Fêmea
CMM – Controle Melatonina Macho
CV – Colocação pelas vibrissas
CVF – Controle Veículo Fêmea
CVM – Controle Veículo Macho
DPA – Desdobramento do pavilhão auricular
EHI – Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica
GN – Geotaxia negativa
III – Irrupção dos incisivos inferiores
IIS – Irrupção dos incisivos superiores
NAS – N-acetilserotonina
P – Dia pós-natal
PKA – Proteína quinase dependente do AMPc
PKC – Proteína quinase C
PP – Preensão palmar
RD – Recuperação de decúbito
RS – Resposta ao susto
SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 ANÓXIA NEONATAL.....	24
4.2 ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA	25
4.3 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	26
4.4 AVALIAÇÃO DA ONTOGENIA DE REFLEXOS	27
4.5 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	30
4.6 FRACIONADOR ISOTRÓPICO.....	30
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 MATURAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	34
5.2 ONTOGENIA DE REFLEXOS	37
5.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	41
5.4 CONTAGEM CELULAR	44
5.5 COMPARAÇÃO ENTRE SEXO.....	45
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

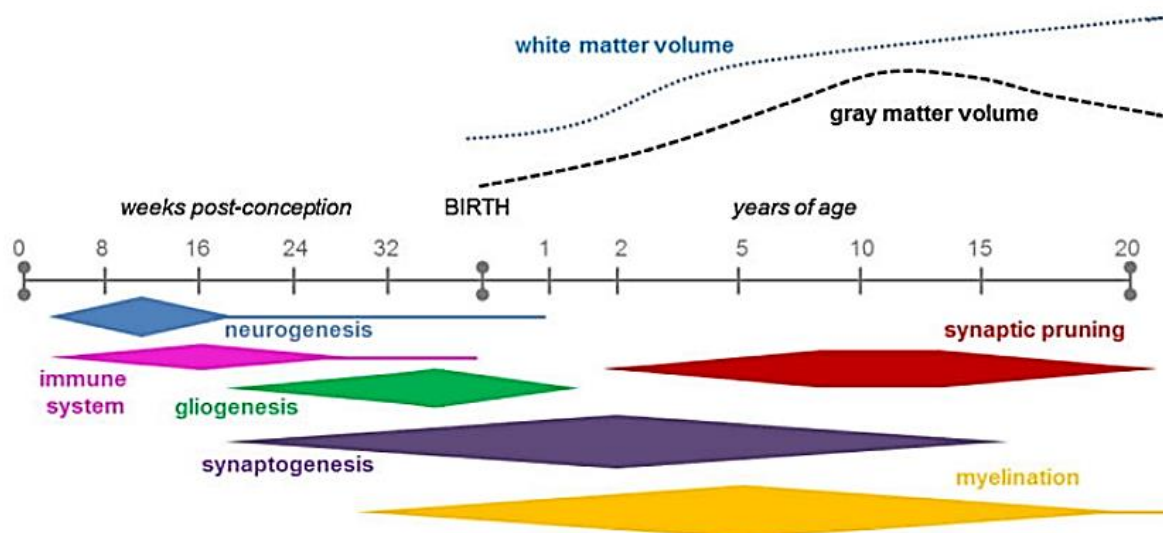
1 INTRODUÇÃO

Anóxia neonatal é definida como privação total de oxigênio no momento do nascimento. No entanto, na clínica é observada uma redução severa no suprimento de oxigênio, denominada hipóxia (FUNAYAMA, 2005), em lugar da supressão de oxigênio. Além disso, o déficit de oxigênio geralmente está associado a déficit de suprimento sanguíneo, sendo comum a utilização do termo encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), que é caracterizada por diminuição do nível de consciência e dos movimentos reflexos, anormalidade do tônus muscular e insuficiência respiratória (LAPTOOK, 2016).

A incidência da EHI varia entre 0,1 e 0,8% dos nascidos vivos (KURINCZUK et al., 2010), enquanto na população prematura de baixo peso, chega ao valor percentual de 60%. Parto prematuro corresponde a todos os nascimentos anteriores à 37ª semana de gestação. Em 2010 estima-se que sua incidência foi aproximadamente 15 milhões e o Brasil ocupava o 10º lugar entre os países com maior número de nascimentos prematuros (9,2%) (BLENCOWE et al., 2012) e em 2015, prematuridade foi a principal causa de mortalidade de recém-nascidos no país (DATA SUS, 2015).

A prematuridade está relacionada à danos nos tecidos cerebrais (SHAH et al., 2006), no desenvolvimento psicomotor 24 meses após nascimento (WOYTHALER et al., 2015) e ao baixo desempenho na pré-escola, aos cinco anos de idade (QUIGLEY et al., 2012). Quando associada à EHI, os indivíduos acometidos podem apresentar alterações cognitivas e comportamentais, como déficit de atenção, hiperatividade, dificuldade de aprendizagem e paralisia cerebral (ESCOBAR; LITTENBERG; PETITTI, 1991; HILL, 1991; GAFFNEY et al., 1994; COOPER et al., 2015). De fato, neste período, o sistema nervoso está em processo de amadurecimento, que corresponde ao estágio de maturação dos oligodendrócitos, desenvolvimento do sistema imunológico e estabelecimento da barreira hematoencefálica. Como consequência, apresenta uma suscetibilidade marcada a eventos desencadeados pela anóxia, como o estresse oxidativo e a apoptose neuronal (SEMPLE et al., 2013), os quais afetam o córtex, o hipocampo, o tálamo, os gânglios basais, o tronco cerebral e substância branca subcortical e periventricular (VANNUCCI, 2000; LAPTOOK, 2016; MILLAR et al., 2017).

Figura 1 - Processos do desenvolvimento neurológico



Tempo de curso dos processos de desenvolvimento neurológico em humanos, do nascimento aos 20 anos de idade, com mudanças associadas nos volumes da substância cinzenta e da substância branca. Fonte: Semple et al., 2013, adaptado de Lenroot e Giedd, 2006.

Dos possíveis modelos para estudar essa condição, o de anóxia neonatal, global e não invasivo, adaptado e validado no laboratório de Neurociências, ICB-USP (TAKADA et al., 2011) tem a vantagem de simular condições clínicas de recém-nascidos prematuros. Para isso, utiliza ratos com aproximadamente 30 h de vida, cujo desenvolvimento do SNC corresponde ao de um feto humano aproximadamente na 28ª semana de gestação (RICE & BARONE, 2000; SEMPLE et al., 2013). Neste modelo, foi observada morte por necrose e apoptose nas populações gliais e neuronais do hipocampo diminuição da neurogênese e do volume dessa região (TAKADA et al., 2011, 2015), redução da densidade celular nas regiões correspondentes aos membros inferiores e superiores do córtex somatossensorial primário (KUMAR et al., 2017) e deficiências no desenvolvimento sensoriomotor (LEE, 2015; KUMAR et al., 2017) e na memória e aprendizagem de animais expostos ao insulto (LEE, 2015; TAKADA et al., 2015, 2016).

O déficit de oxigênio e do suprimento de glicose ao cérebro impede a fosforilação oxidativa que gera falha de energia e consequente morte celular (PEARCE, 1995). A primeira falha de energia induz despolarização neuronal e liberação de aminoácidos excitatórios, especialmente glutamato, na fenda sináptica. Como a recaptação do neurotransmissor dependente de glicose está prejudicada, ocorre acúmulo de

glutamato extracelular em níveis tóxicos. A alta ativação de outros receptores excitatórios de glutamato e canais de cálcio aumentam o influxo de cálcio e promovem níveis elevados de óxido nítrico, o que danifica as mitocôndrias (HILL, 1991; NYAKAS et al, 1991; NYAKAS; BUWALDA; LUITEN, 1996; BERGER et al, 2016). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio na fase de reperfusão gera estresse oxidativo adicional às mitocôndrias que, após lesadas, produzem mais radicais livres que alteram as funções da membrana, e acentuam a morte celular (PEARCE, 1995; NYAKAS; BUWALDA; LUITEN, 1996; BERGER et al., 2016).

Pesquisadores observaram infiltração microglial considerável no giro denteado de recém-nascidos que não sobreviveram à EHI (DEL BIGIO & BECKER, 1994) e menor volume no hipocampo de prematuros que passaram por episódios de hipóxia (COOPER et al., 2013). De fato, a alta densidade de receptores para citocinas inflamatórias no hipocampo é um dos fatores que aumentam sua vulnerabilidade ao déficit de oxigênio. Em ratos, a neurogênese do giro denteado ocorre majoritariamente no período pós-natal (RICE & BARONE, 2000; BACHEVALIER & VARGHA-KHADEM, 2005), o que pode contribuir para diminuição da neurogênese em animais expostos ao déficit de oxigênio neste período. Em humanos, a neurogênese ocorre predominantemente durante a gestação e o estágio de proliferação celular no giro denteado corresponde ao período de nascimentos prematuros (Figura 2) (BAYER et al., 1993). Além disso, o desenvolvimento dendrítico, a formação de sinapses, a mielinização e o volume do hipocampo são processos contínuos durante o período pós-natal (BACHEVALIER & VARGHA-KHADEM, 2005). Esse fato evidencia que as habilidades de memória mediadas pelo hipocampo apresentam desenvolvimento prolongado e continuam em maturação durante a infância, e podem ser alteradas em casos de injúrias nesse período. Tanto pesquisas clínicas quanto pesquisas experimentais evidenciaram que o déficit de oxigênio afeta o desempenho em tarefas de aprendizagem de discriminação (HERSHKOWITZ; GRIMM; SPEISER, 1983) e induz deficiências no aprendizado espacial (DELL'ANNA et al., 1991; BUWALDA et al., 1995; COOPER et al., 2013; TAKADA et al., 2015).

Figura 2 - Estimativa de proliferação celular no hipocampo

Desenvolvimento do hipocampo														
Humanos (semanas)	5,3 - 5,7	5,8 - 6,6	6,7 - 7,0	7,1 - 7,4	7,5 - 7,9	8,0 - 9,9	10,0 - 11,9	12,0 - 14,9	15,0 - 18,9	19,0 - 23,9	24,0 - 27,9	28,0 - 31,9	32,0 - 35,9	36,0 - 40,0
Ratos (dias)	DG 13	DG 14	DG 15	DG 16	DG 17	DG 18	DG 19	DG 20	DG 21 - 22	P 0 - 3	P 4 - 7	P 8 - 11	P 12 - 15	P 16 - 19
CA1 - CA3														
Giro denteado														

Tempo estimado de proliferação celular no hipocampo de humanos e ratos. DG = dia gestacional; P = dia pós-natal. Fonte: adaptado de Bayer et al, (1993).

Além do hipocampo, o córtex somatossensorial primário, diretamente associado ao desenvolvimento sensoriomotor também é acometido pelo déficit de oxigênio (LUBICS et al., 2005; MARCUZZO et al., 2010; KUMAR et al., 2017). Testes específicos foram desenvolvidos para avaliar a ontogenia de reflexos em animais, de forma a identificar características que correspondam à neonatos humanos. (RICE & BARONE, 2000). No laboratório de Neurociências do ICB-USP foi demonstrado que a anóxia neonatal é capaz de interferir no desenvolvimento neurológico de roedores, pela observação do comprometimento na ontogenia destes reflexos, com efeito diferenciado entre machos e fêmeas (VASCONCELOS, 2013; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017).

A diferença de sexo constitui fator importante a ser considerado nos estudos experimentais que envolvam o funcionamento típico e patológico do cérebro, assim como o desenvolvimento neurológico e comportamental. O desempenho diferencial em atividades específicas evidencia que o desenvolvimento de diferentes áreas do cérebro varia conforme sexo: machos ou fêmeas (RICE; BARONE, 2000).

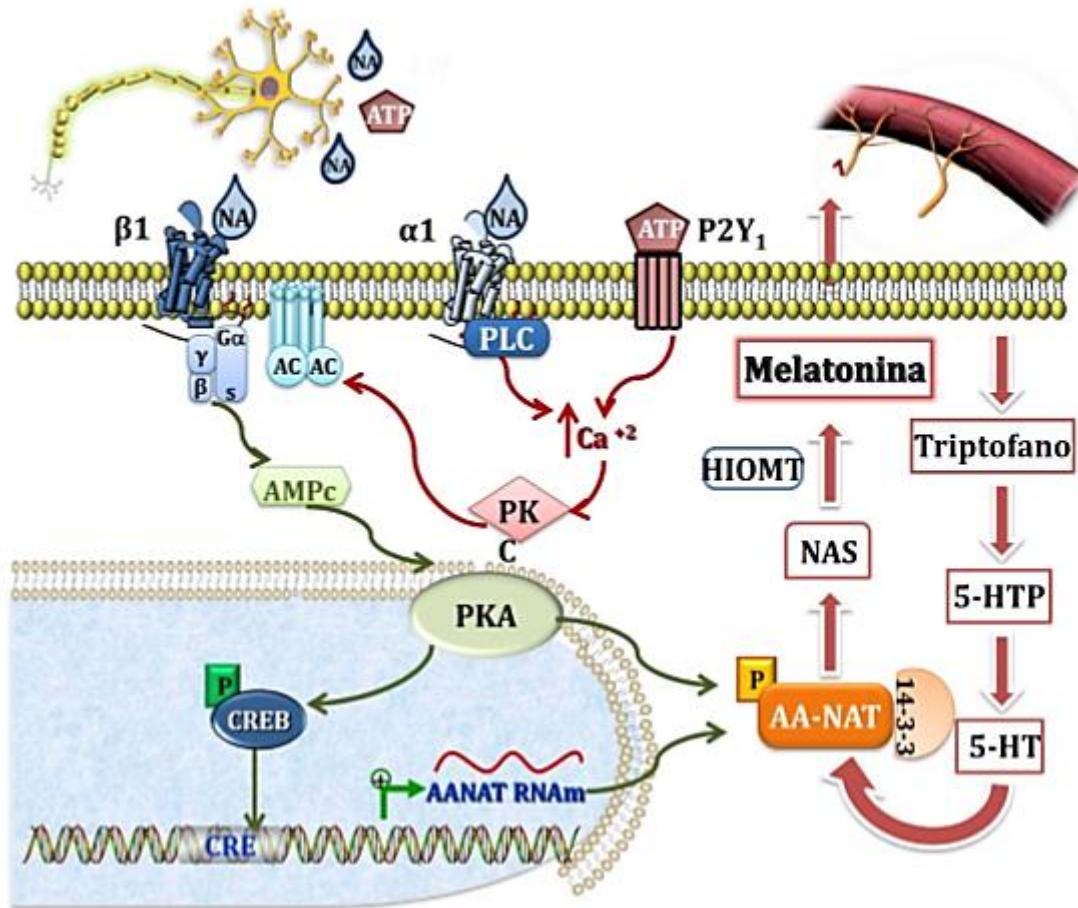
Em humanos, a prematuridade é mais comum em meninos (55%) e há maior taxa de mortalidade nestes quando comparados às meninas (STEVENSON et al., 2000; CHAWPANPAIBOON, 2019), entretanto, meninos e meninas prematuros podem ser acometidos de formas diferentes. Estudo realizado na Austrália mostrou que meninos nascidos prematuros parecem mais propensos à incapacidade funcional aos entre 2 e 3 anos de idade, enquanto meninas apresentam perímetro cefálico, peso e tamanho menor do que meninos. Quando avaliada a taxa de paralisia cerebral não houve diferença entre sexo (KENT et al., 2015). Estudo mostra que meninos

prematturos são mais suscetíveis à lesão da substância branca, enquanto meninas são mais suscetíveis à lesão da substância cinzenta (THOMPSON ET AL., 2007). Quanto às pesquisas experimentais com modelos de déficit de oxigênio, alguns estudos evidenciaram maior prejuízo na redução do volume e neurogênese hipocampal, assim como na memória de curto prazo de machos quando comparados às fêmeas (LOIDL et al., 2000; MAYORAL et al., 2009), contudo, há estudos que não encontraram diferença entre sexos quando avaliada a extensão da lesão cerebral em camundongos expostos à hipóxia-isquemia (ZHU et al., 2006).

Apesar de todas as desordens desencadeadas pelo déficit de oxigênio no período neonatal, até o momento a hipotermia é único método licenciado de tratamento disponível para atenuar esses distúrbios (MILLAR et al., 2017), mas embora ela tenha reduzido a taxa de mortalidade e deficiências neurológicas, não é suficiente para prevenir/reduzir todos os danos causados pelo déficit de oxigênio (REES et al., 2011). Portanto, é necessário buscar alternativas que possam contribuir com a diminuição das alterações decorrentes desta injúria. Nesse sentido, a melatonina tem apresentado resultados promissores em pesquisas descritas na literatura, inclusive em modelos de injúria cerebral (REVUELTA et al., 2017; ROSALES-CORRAL et al., 2003).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula hormonal não esteroide, produzida principalmente pela glândula pineal e responsável pelo controle do ciclo circadiano. Sua síntese se inicia no período escuro, quando a noradrenalina interage com os receptores β 1-adrenérgicos e α 1-adrenérgicos presentes nos pinealócitos, e ativa cascata de eventos intracelulares, que começa com o metabolismo do aminoácido triptofano para formar a serotonina (5-HT), seguida por N-acetilserotonina (NAS) e finalmente melatonina, que é liberada rapidamente na circulação e posteriormente metabolizada pelo fígado (HALBERG et al., 1994; MARKUS et al., 2017).

Figura 3 - Síntese da melatonina na glândula pineal de ratos



No período escuro, as fibras pós-ganglionares liberam noradrenalina (NA) que ativa os receptores do tipo β 1-adrenérgicos. Esses receptores, por sua vez ativam a adenilil ciclase (AC) promovendo um aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a proteína quinase dependente do AMPc (PKA) e a fosforilação do fator de transcrição CREB, permitindo a transcrição da enzima N-acetiltransferase de araquilamina (AA-NAT). A atuação de NA nos receptores α 1-adrenérgicos, ou a atuação da adenosina trifosfato (ATP) nos receptores purinérgicos P2Y1 potencializam a transcrição da AA-NAT via proteína quinase C (PKC) ativada pelo aumento intracelular de cálcio. A cascata da síntese de melatonina tem início com o metabolismo de triptofano para formas serotonina (5-HT) que é substrato para a ação direta da AA-NAT para formar N-acetilserotonina (NAS), que então é metilada em melatonina pela enzima HIOMT. Fonte: Sousa (2011).

Além de sua síntese pela glândula pineal, a melatonina também é produzida por outras estruturas periféricas, como no trato gastrointestinal, retina, pele e células imunocompetentes em altas concentrações e é capaz de exercer seus efeitos regulatórios sobre o sistema de defesa (REITER et al., 1973; REITER et al., 2000). Sua atuação direta inclui a neutralização das espécies reativas de oxigênio, enquanto

indiretamente, age na estimulação da atividade de enzimas antioxidantes (RODRIGUEZ et al., 2004), redução da produção de citocinas inflamatórias (MOHAN et al., 1995) e recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios, na fase de recuperação de uma resposta inflamatória (MAYO et al., 2005). Suas vantagens, também se concentram na baixa toxicidade e capacidade de atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica (PAPROKA et al., 2019).

Dessa forma, a administração de melatonina subsequente ao déficit de oxigênio neonatal, demonstrou reduzir das lesões e distúrbios comportamentais (BERGER et al., 2017; BLANCO et al., 2017; HU et al., 2017). Estudos com modelo de hipóxia-isquemia evidenciaram redução do dano ipsilateral, do estresse do retículo endoplasmático e dos déficits comportamentais e de aprendizagem dos animais tratados com melatonina (CARLONI et al., 2008a, 2014; OLIVIER et al., 2009). Experimentos com roedores expostos ao déficit de oxigênio evidenciaram que os animais tratados com melatonina apresentaram melhora significativa nos testes de memória e aprendizagem, redução no atraso do reflexos sensoriomotores, assim como menor índice de morte celular no hipocampo duas semanas após insulto (WANG et al., 2013), o que demonstrou eficácia no tratamento de danos que envolvem alterações no suprimento de oxigênio.

Enquanto a mãe é o principal fornecedor de melatonina para o cérebro fetal no decorrer da gravidez, a secreção endógena, pela glândula pineal, começa apenas entre a sexta e oitava semana pós-natal em humanos e no final na 1ª semana pós-natal em ratos (WEINBERG, 1981). De fato, a concentração de melatonina no plasma de recém-nascidos prematuros é baixa, e ainda menor na ocorrência de insultos neurológicos. E embora a melatonina no leite materno seja disseminada ao neonato, não é suficiente para corrigir essa deficiência e as morbidades decorrentes à prematuridade e ao déficit de oxigênio (GITTO et al., 2010). Sendo assim, o período de deficiência transitória de melatonina corresponde ao período em que o cérebro imaturo está mais suscetível ao déficit de oxigênio (HASSELL; REITER; ROBERTSON, 2013). Além disso, pesquisadores observaram que a meia vida da melatonina administrada é muito maior em recém-nascidos, incluindo prematuros, do que em adultos (entre 8 h e 15 h, para \pm 45 min, respectivamente) (MERCHANT et al., 2013; HARPSOE et al., 2015; CARLONI et al., 2017), resultado que fortalece a importância de estudar a ação da melatonina administrada após anóxia neonatal.

Apesar dos estudos citados a respeito dos efeitos da administração de melatonina em modelos de déficit de oxigênio, é importante esclarecer que eles utilizam animais que simulam condições clínicas dos nascidos a termo, ou seja, não mimetizam a população mais acometida pela EHI, que corresponde aos prematuros. Além disso, não há conhecimento de estudos que avaliem os efeitos da melatonina em ambos os sexos, machos e fêmeas.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito neuroprotetor da melatonina, administrada em ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal, pela avaliação do desenvolvimento, memória e aprendizagem e número de células no hipocampo.

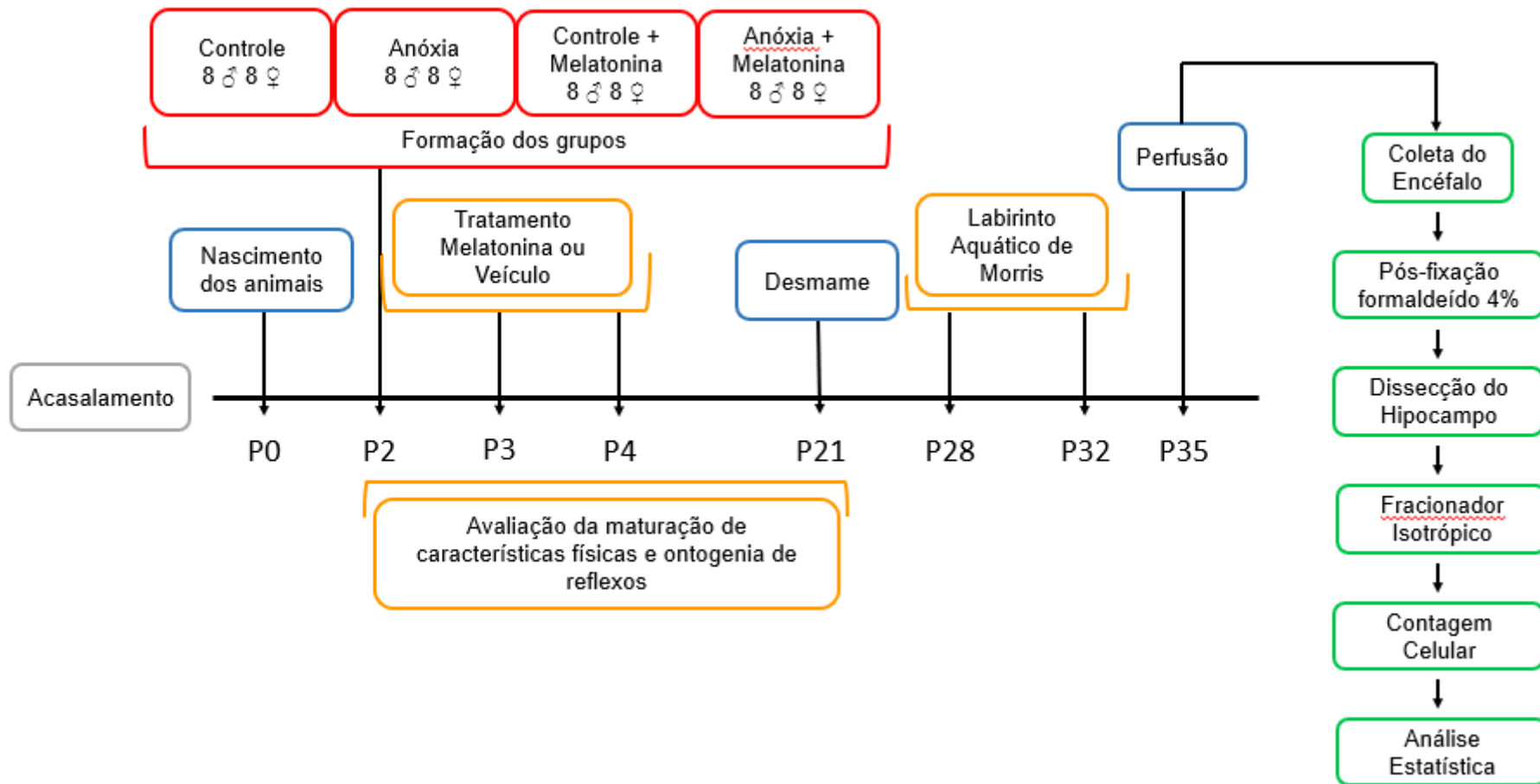
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I Avaliar e comparar entre os grupos a maturação de características físicas e ontogenia de reflexos, de P2 a P21;

II Avaliar e comparar entre os grupos o desempenho de aprendizagem e memória de referência espacial, pelo teste Labirinto Aquático de Morris, de P28 a P35;

III Quantificar e comparar entre os grupos o número de células neuronais e não neuronais no hipocampo, em P35.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4 MATERIAL E MÉTODOS

Rattus norvegicus, linhagem Wistar, provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios) foram mantidos no Biotério de Experimentação do ICB (Departamento de Anatomia) e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB, número 19/2017, e normas estabelecidas pelo CONCEA.

Foram utilizados 73 animais, machos (n=34) e fêmeas (n=39), divididos em oito grupos de acordo com estímulo, tratamento e sexo:

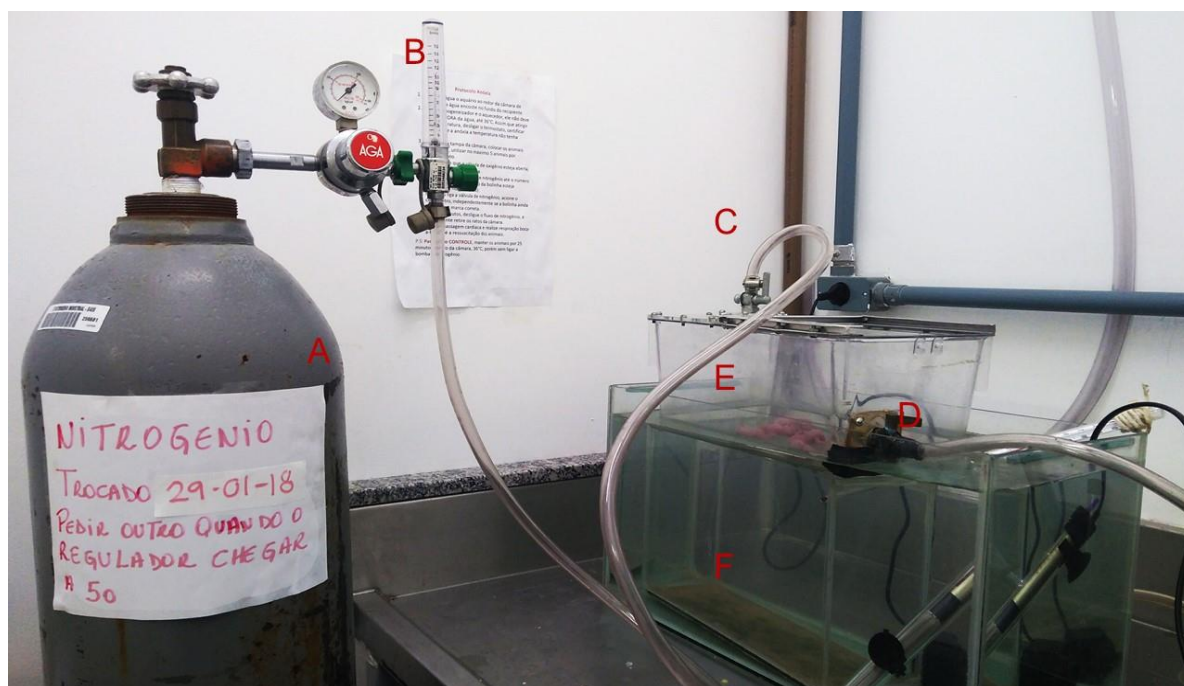
Machos	Fêmeas
CVM Controle veículo; n = 10	CVF Controle veículo; n = 11
CMM Controle melatonina; n = 8	CMF Controle melatonina; n = 8
AVM Anóxia veículo; n = 8	AVF Anóxia veículo; n = 8
AMM Anóxia melatonina; n = 8	AMF Anóxia melatonina; n = 12

4.1 ANÓXIA NEONATAL

Os animais com aproximadamente 30 h de vida e peso corporal entre 6 e 8 g foram submetidos ao modelo de anóxia neonatal, adaptado e validado pelo laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (TAKADA et al., 2011).

O sistema consiste em uma câmara semi-hermética de policarbonato (31,0 x 14,0 x 19,5 cm), com entrada e saída de gás, acoplada a um manômetro, um fluxômetro e um cilindro de nitrogênio gasoso. Para evitar hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura foi mantida entre 36 e 37°C, pela imersão parcial da câmara em água aquecida por resistência elétrica. A câmara foi preenchida com gás nitrogênio a 100% e fluxo de 3 L/min e pressão atmosférica ($\pm 101,7$ kPA).

Figura 4 - Sistema de Anóxia Neonatal



Sistema de anóxia: **A.** Cilindro de nitrogênio; **B.** Fluxômetro; **C.** Entrada de nitrogênio; **D.** Saída de nitrogênio; **E.** Câmara semi-hermética; **F.** Aquário com água aquecida entre 36° e 37°C. Fonte: Arruda (2018).

Os animais foram colocados rapidamente dentro da câmara (no máximo, quatro animais por vez), onde permaneceram por 25 min. Em seguida, foram reanimados (recuperação de respiração, coloração e movimentos) e devolvidos à mãe até o desmame (P21). Os grupos controle passaram pelas mesmas condições experimentais, com exceção à privação de oxigênio.

4.2 ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA

Foram dissolvidas 4 mg/ml de melatonina em pó (M5250; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em etanol e depois acrescida salina 0,9%, de forma que a concentração final de etanol foi de 2%,

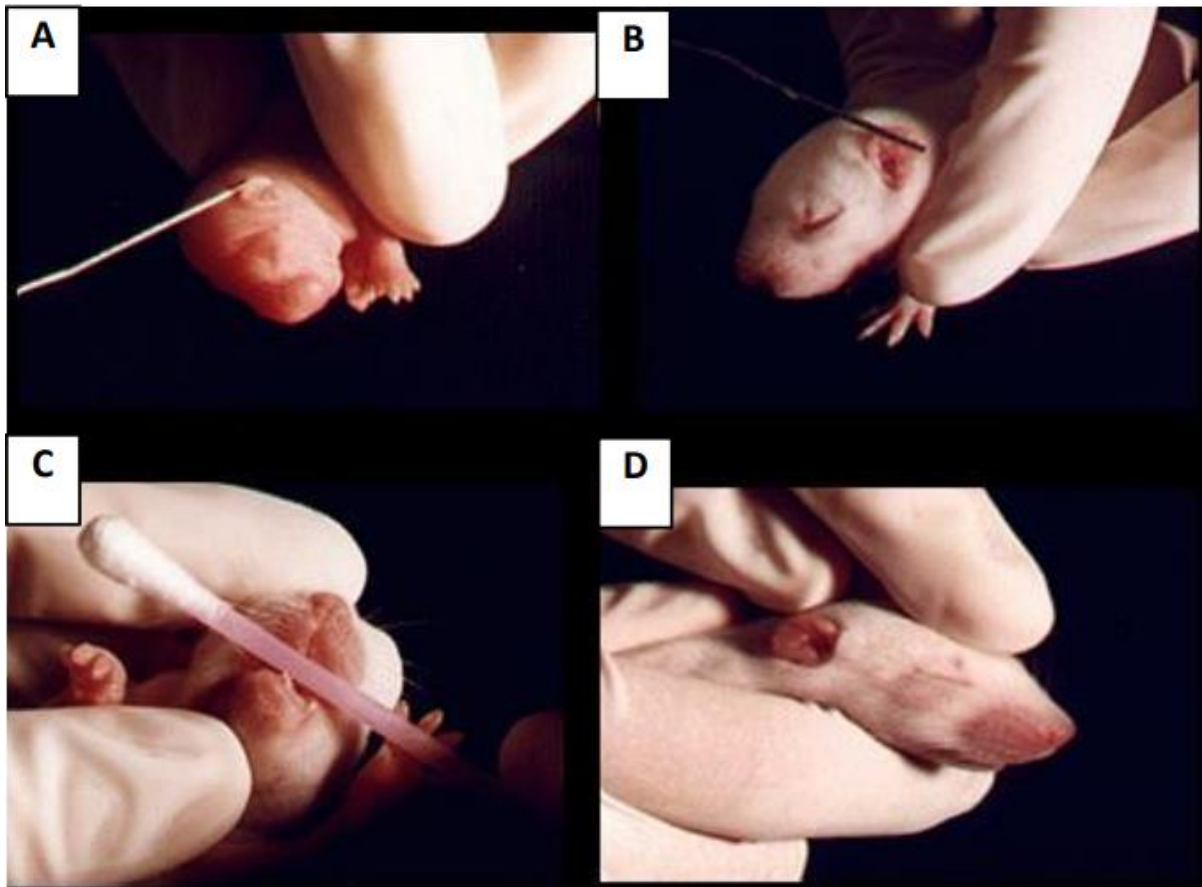
Os animais receberam a solução via intraperitoneal em três doses de 15 mg/kg, 5 min, 24 h e 48 h após anóxia, conforme protocolo para ratos estabelecido na literatura (CARLONI et al., 2008b, 2014; WANG et al., 2013). Os animais controle receberam doses de solução veículo (etanol 2% + salina).

4.3 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Os animais foram avaliados de P2 à maturação das características físicas, e anotado o dia da maturação. As avaliações ocorreram entre 7 h e 10 h da manhã, conforme segue:

- a) Desdobramento do pavilhão auricular (DPA);
- b) Abertura do conduto auditivo (ACA);
- c) Irrupção dos incisivos inferiores (III);
- d) Irrupção dos incisivos superiores (IIS);
- e) Abertura ocular (AO).

Figura 5 - Avaliação da maturação de características físicas



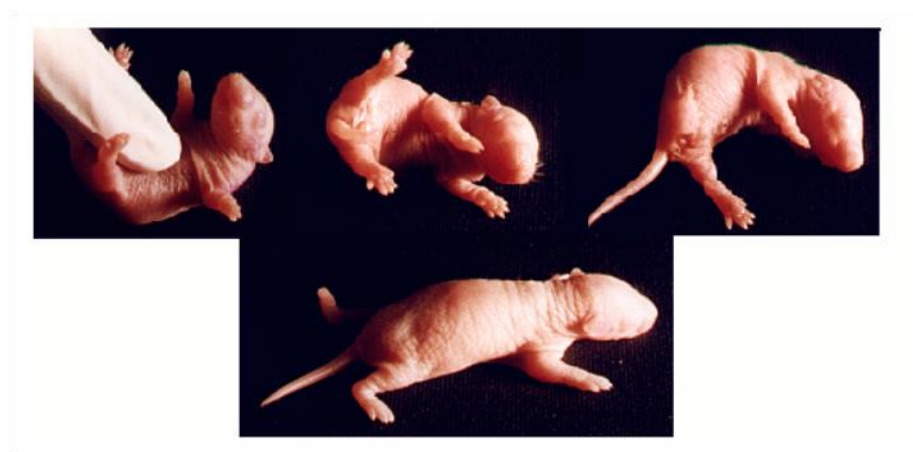
Formas de avaliação da maturação das características físicas. **A.** Desdobramento do pavilhão auricular; **B.** Abertura do conduto auditivo; **C.** Irrupção dos incisivos; **D.** Abertura ocular. Fonte: Vasconcelos (2013).

4.4 AVALIAÇÃO DA ONTOGENIA DE REFLEXOS

Os animais foram avaliados de P2 até a maturação dos reflexos. Essa condição é confirmada quando o reflexo ocorre em 3 dias consecutivos, e o primeiro dia anotado. As avaliações ocorreram entre 7 h e 10 h da manhã, segundo parâmetros descritos na literatura (FOX, 1965; VASCONCELOS, 2013):

- a) Recuperação de decúbito (RD): o animal foi colocado sob uma superfície plana, em decúbito dorsal, considerando resposta positiva quando o animal girou o corpo para decúbito ventral, em até 10 segundos.

Figura 6 - Avaliação da recuperação de decúbito



Forma de avaliação do reflexo de recuperação de decúbito. Fonte: Vasconcelos (2013).

- b) Colocação pelas vibrissas (CV): o animal foi suspenso pela cauda, de forma que suas vibrissas tocassem a borda de uma superfície, considerando resposta positiva quando o animal colocou as patas anteriores na superfície, tentando caminhar, em até 10 segundos;

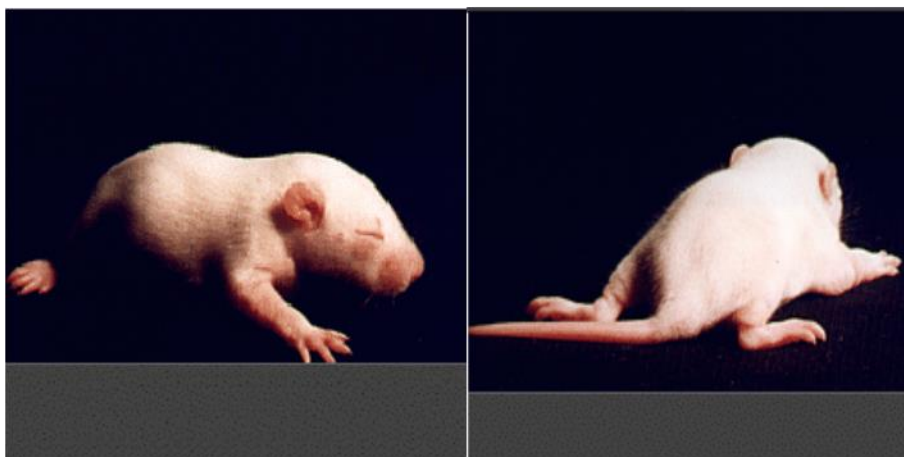
Figura 7 - Avaliação de colocação pelas vibrissas



Forma de avaliação do reflexo de colocação pelas vibrissas. Fonte: Vasconcelos (2013).

- c) Aversão ao precipício (AP): o animal foi colocado com as patas anteriores sobre a borda de uma superfície plana e alta, afim de que detectasse o precipício. A resposta positiva foi considerada quando o animal virou em, pelo menos, 45° para a direita ou esquerda, em até 10 segundos;

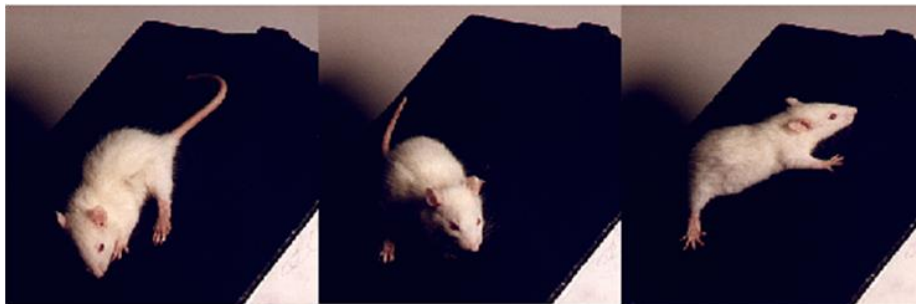
Figura 8 - Avaliação da aversão ao precipício



Forma de avaliação do reflexo de aversão ao precipício. Fonte: Vasconcelos (2013).

- d) Geotaxia negativa (GN): o animal foi colocado no centro de uma rampa inclinada em 45° , com a cabeça no sentido descendente. A resposta positiva foi considerada quando o animal conseguiu virar em sentido ascendente, em até 10 segundos;

Figura 9 - Avaliação da geotaxia negativa



Forma de avaliação do reflexo de geotaxia negativa. Fonte: Vasconcelos (2013).

- e) Resposta ao susto (RS): o animal foi exposto a um estampido agudo, produzido a uma distância aproximada de 10 cm, e a resposta positiva foi considerada quando ocorreu retração simultânea com rápida e involuntária imobilização do corpo;

Figura 10 - Avaliação da resposta ao susto



Forma de avaliação o reflexo de resposta ao susto. Fonte: Vasconcelos (2013).

- f) Aceleração em queda livre (AQL): o animal foi segurado pelas quatro patas, com o dorso voltado para baixo, a uma distância de 30 cm de um leito de espuma sintética (30 x 12 cm). Então o animal foi solto e observada sua queda. A resposta positiva foi considerada quando o animal, durante a queda, girou completamente o corpo, chegando com as quatro palmas na espuma;
- g) Preensão palmar (PP): uma haste fina foi colocada em contato com a palma

da pata anterior do animal, e a resposta positiva foi considerada quando ele realizou movimento de preensão à haste.

4.5 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

O teste utilizado é constituído por uma piscina circular, com fundo na cor preta (200 cm de diâmetro e 50 cm de altura), preenchida com aproximadamente 25 cm de água à temperatura de 26°C, localizada dentro de uma sala (3,13 x 3,5 m). A cada 90° da piscina, foram inseridas pista geométricas para facilitar a orientação espacial do animal.

Uma plataforma circular de plástico, com 9 cm de diâmetro, montada em uma coluna de plástico, foi colocada 2 cm abaixo do nível da água, no centro de um dos quadrantes da piscina (dividida em quatro quadrantes, a partir de uma linha imaginária), servindo como ponto de escape para os animais.

Uma câmara de vídeo acima do centro da piscina, conectada a um computador, foi utilizada para registrar, no programa Ethovision (Noldus, versão 2.2.5), os seguintes dados: tempo entre a imersão do animal na piscina e seu posicionamento em cima da plataforma, trajeto traçado e velocidade do nado.

O teste foi realizado para avaliação da memória de referência, conforme descrito por Takada e colaboradores (2015), no período matutino. Os animais foram treinados por cinco dias consecutivos, com quatro tentativas por dia e 10 min de intervalo entre as tentativas, com objetivo de localizar a plataforma submersa. A plataforma permaneceu no mesmo lugar durante os treinos. Os animais, entretanto, foram colocados em diferentes pontos de partida, com o focinho virado para a borda. Depois de imersos na água, os animais puderam nadar livremente por 120 s ou até encontrarem a plataforma. Os animais que não a encontraram em 120 s foram guiados até ela, onde permaneceram por 10 s.

No sexto dia, a plataforma foi removida e os animais puderam nadar livremente, durante 3 min. O número de entradas no quadrante da plataforma e a distância percorrida foram registrados para avaliação.

4.6 FRACIONADOR ISOTRÓPICO

Para coleta do encéfalo, os animais, com 35 dias, foram anestesiados com

ketamina (60 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e em seguida, realizada perfusão transcardíaca com solução salina 9% para limpeza do leito vascular, e formaldeído 4%, pH 7,4. Em seguida, os encéfalos foram removidos e pós-fixados na mesma solução.

Os encéfalos foram dissecados para isolamento do hipocampo e contagem celular realizada pelo método fracionador isotrópico, desenvolvido por Herculano-Houzel e Lent (HERCULANO-HOUZEL, 2005), o qual consiste na dissociação químico-mecânica do tecido, capaz de romper com a membrana plasmática das células, de modo a obter uma suspensão de núcleos dispersos homoganeamente, utilizada para estimar a quantidade de células neuronais e não neuronais.

O tecido foi colocado em homogeneizador do tipo Tenbroeck (7 ml), junto a solução detergente, composta por citrato de sódio 40 mM e 1% de Triton X-100, e dissociado pela rotação e translação do cilindro interno contra o cilindro externo.

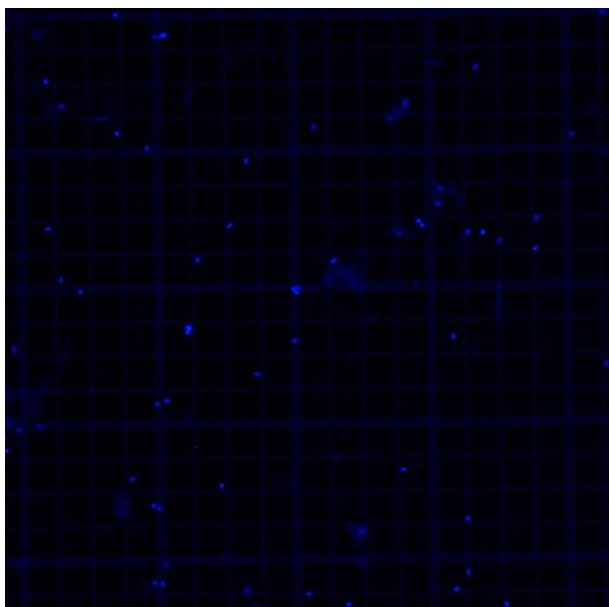
Figura 11 - Homogeneizador de tecido



Fonte: Fisher Scientific (2019).

Após dissociação, a suspensão nuclear foi coletada e transferida a um tubo Eppendorf de 1 ml, onde foi acrescentado 1 μ l (1:1000) de di-hidroclorato de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; S7113, Milipore, Ternecula, USA), corante específico de DNA, que torna o núcleo fluorescente sob luz ultravioleta. Desta amostra, 40 μ l foram coletados e depositados em câmara de Neubauer, para a contagem dos núcleos intactos ou com mais da metade de sua circunferência preservada.

Figura 12 - Núcleos de células marcados com DAPI

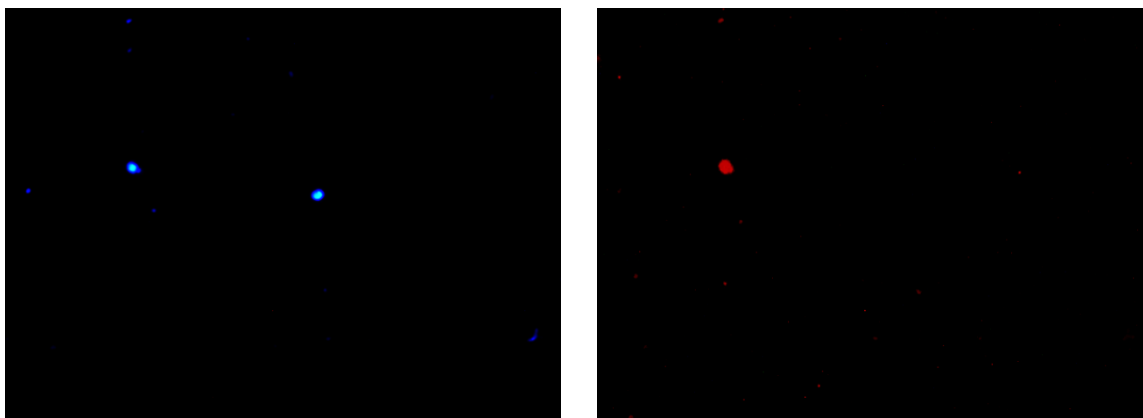


Exemplo da marcação de núcleos de células coradas com DAPI. Fonte: Arruda (2018).

Após a determinação do número total de células, a suspensão foi lavada com PBS e centrifugada em 4 mil rotações/minuto, durante cinco minutos, 4 vezes (EPPENDORF MiniSpin). Em seguida, foi acrescentado à solução, 1µl (1:200) de Anti-NeuN, clone A60, Alexa Fluor 555, conjugado (MAB377A5, Milipore, Ternecula, USA), incubado por 2 horas, e novamente lavada e centrifugada, para quantificação de células neuronais, em microscópio de fluorescência.

A cada 500 células marcadas com DAPI, foram verificadas quais possuem dupla marcação DAPI-NeuN, sendo registrado o valor percentual. A estimativa total do número total de células neuronais foi obtida multiplicando essa porcentagem pelo número total de células obtidas anteriormente.

Figura 13 - Dupla marcação DAPI-NeuN



Exemplo de dupla marcação DAPI-NeuN. Fonte: Arruda (2018).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados com *Kolmogorov-Smirnov*, para análise de normalidade. Os resultados dos parâmetros maturação de características físicas e ontogenia de reflexos são não-paramétricos e, portanto, foram analisados com Kruskal-Wallis, seguido de comparações parwise. Os dados obtidos no labirinto aquático de Morris, são paramétricos foram avaliados com Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas seguida de pós-teste *Tukey-Kramer*. Os resultados obtidos na contagem celular são paramétricos e foram analisados com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste *Tukey-Kramer*. Para comparação entre sexo foi utilizado teste *Mann-Whitney* nos parâmetros de maturação de características físicas e ontogenia de reflexos, e *test t student* nos parâmetros de memória e contagem celular. Foi adotado $p \leq 0,05$ como valor de significância.

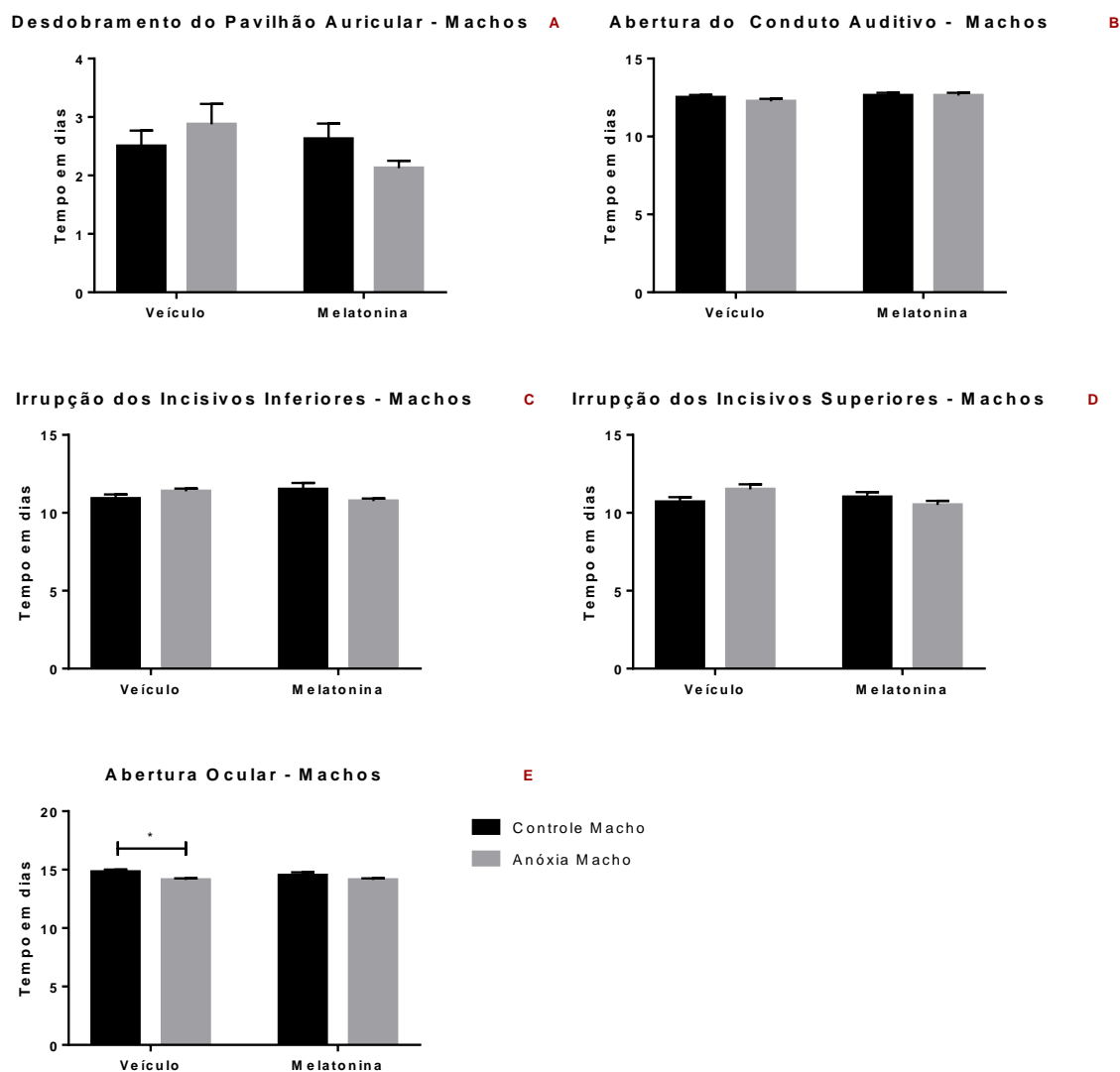
5 RESULTADOS

A fim de otimizar análise e compreensão dos resultados, machos e fêmeas foram analisados separados, e posteriormente foram comparados aos seus grupos correspondentes com objetivo de avaliar eventuais diferenças entre sexo.

5.1 MATURAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Na análise da maturação de características físicas dos machos, foi detectada diferença de um dia no tempo de abertura ocular entre os grupos CVM e AVM (Kruskal Wallis statistic 8.549, $p = 0,01$). Nos demais parâmetros, não foi detectada diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Gráfico 1 - Análise da maturação de características físicas nos machos

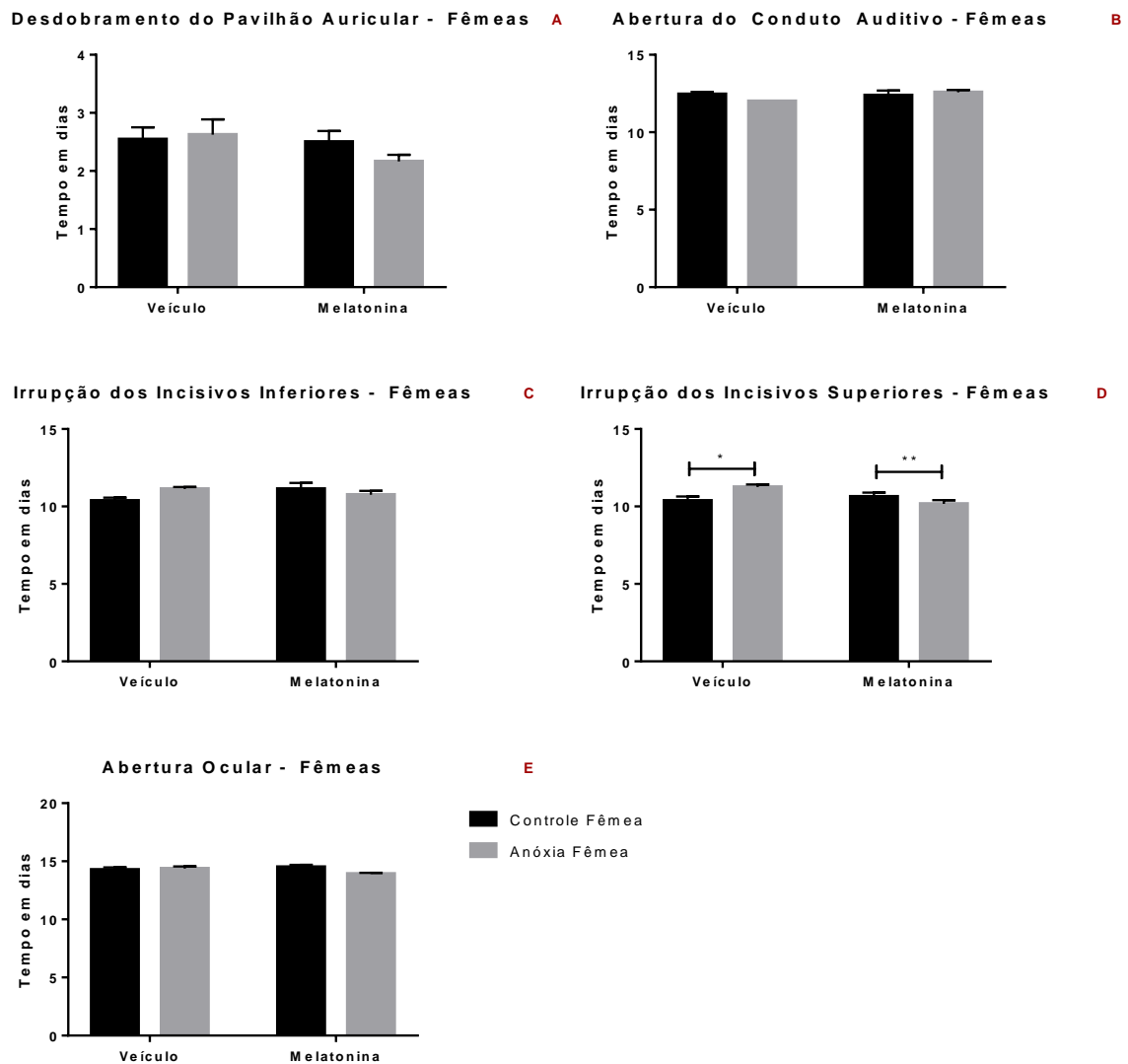


Análise da maturação de características físicas avaliada em dias, de P2 ao dia em que ocorre a maturação nos grupos CVM (n=10), CMM (n=8), AVM (n=8), AMM (n=8). **A.** Desdobramento do pavilhão auricular. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 3.607). **B.** Abertura do conduto auditivo. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 2.912). **C.** Irrupção dos incisivos inferiores. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 4.159). **D.** Irrupção dos incisivos superiores. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 4.933). **E.** Abertura ocular. Houve diferença entre os grupos CVM e AVM (Kruskal Wallis statistic 8.549; $p = 0,01$). Teste Kruskal-Wallis. Dados apresentados em média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

Nas fêmeas, foi identificada diferença de um dia na irrupção dos incisivos superiores entre os grupos CVF x AVF e AVF x AMF (Kruskal Wallis statistic 9.661, $p = 0,02$ e $p = 0,003$, respectivamente), que indica o tratamento com melatonina capaz de diminuir o tempo de irrupção dos incisivos superiores após anóxia neonatal. o que

indica tendência a maior tempo de irrupção dos incisivos superiores após anóxia. Nos demais parâmetros, não foi detectada diferença significativa ($p \geq 0,05$).

Gráfico 2 - Análise da maturação de características físicas nas fêmeas

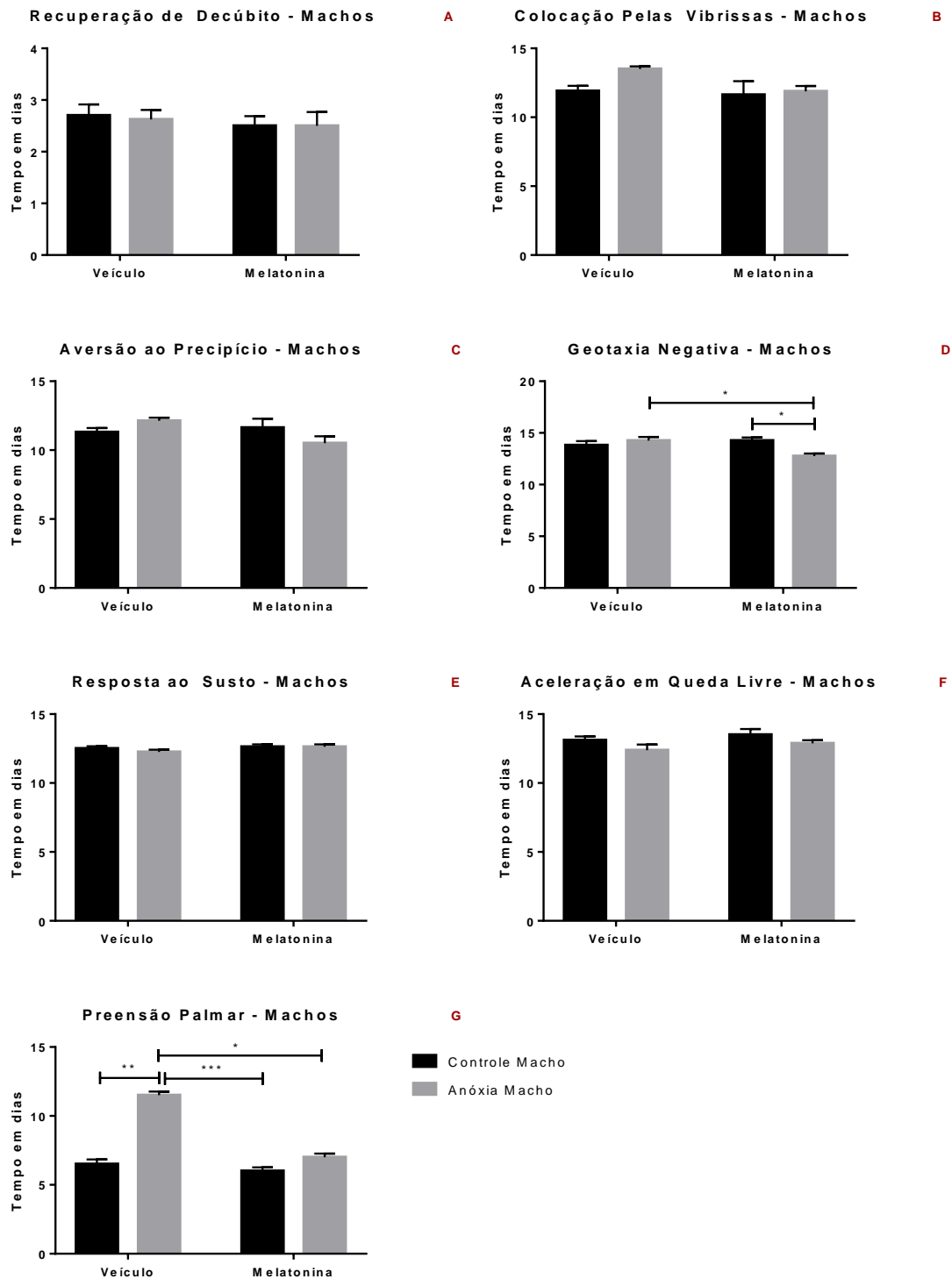


Análise da maturação de características físicas avaliada em dias, de P2 ao dia em que ocorre a maturação nos grupos CVF (n=11), CMF (n=8), AVF (n=8), AMF (n=12). **A.** Desdobramento do pavilhão auricular. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 3.626). **B.** Abertura do conduto auditivo. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 5.925). **C.** Irrupção dos incisivos inferiores. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 6,446). **D.** Irrupção dos incisivos superiores. Houve diferença entre os grupos CVF x AVF e AVF x AMF (Kruskal Wallis statistic 9.661; $p = 0,02$ e $p = 0,003$, respectivamente). **E.** Abertura ocular. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 7.036). Teste Kruskal-Wallis. Dados apresentados em média \pm EPM. * $p \leq 0,05$.

5.2 ONTOGENIA DE REFLEXOS

Na análise da ontogenia de reflexos dos machos, foi detectada diferença de dois dias no parâmetro geotaxia negativa entre os grupos CMM x AMM e AVM x AMM (Kruskal Wallis statistic 9.731, $p = 0,04$, $p = 0,04$, respectivamente), que indica o tratamento com melatonina capaz de reduzir o tempo de aparecimento do reflexo após anóxia neonatal. No reflexo de preensão palmar foi detectada diferença de cinco dias entre CVM x AVM ($p = 0,001$) e entre AVM x CMM ($p = 0,000$) e de quatro dias entre AVM x AMM ($p = 0,04$), demonstrando que o tratamento com melatonina reduziu o dano provocado pela anóxia neonatal nesse parâmetro (Kruskal Wallis statistic 21.16).

Gráfico 3 - Análise da ontogenia de reflexos nos machos

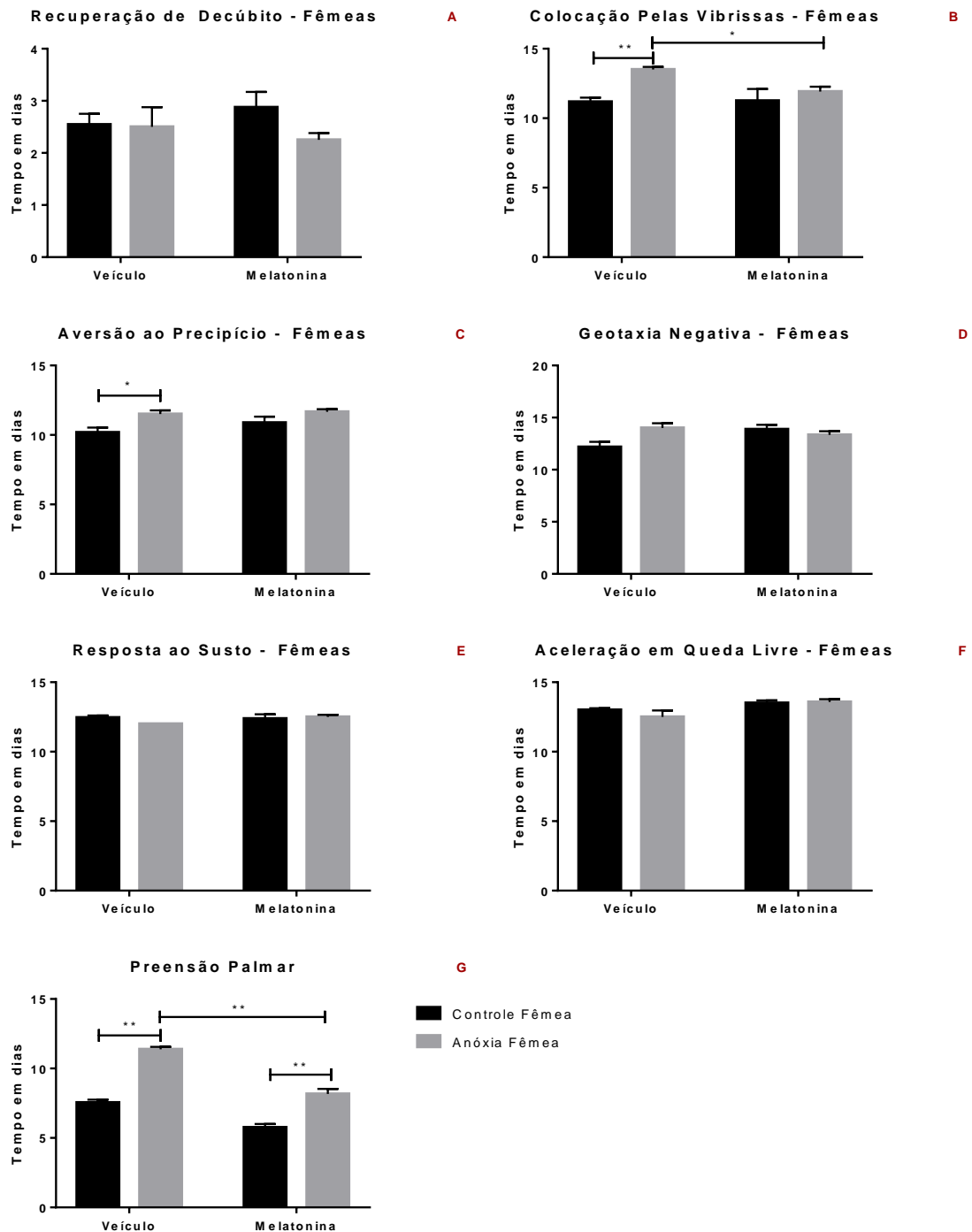


Análise da ontogenia de reflexos avaliada em dias, de P2 ao dia de maturação nos grupos CVM (n=10), CMM (n=8), AVM (n=8), AMM (n=8). **A.** Recuperação de decúbito. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 0.8482). **B.** Colocação pelas vibrissas. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 7.454). **C.** Aversão ao precipício. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 6.463). **D.** Geotaxia negativa. Houve diferença entre os grupos CMM e AMM ($p = 0,04$)

e AVM e AMM ($p = 0,03$) (Kruskal Wallis statistic 9.731). **E.** Resposta ao susto. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 2.912). **F.** Aceleração em queda livre. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 4.986). **G.** Preensão palmar. Houve diferença entre os grupos CVM x AVM ($p = 0,001$), CMM x AMM ($p = 0,0001$) e AVM x AMM ($p = 0,04$) (Kruskal Wallis statistic 21.16). Teste Kruskal-Wallis. Dados apresentados em média \pm EPM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Na análise da ontogenia de reflexos das fêmeas foi detectada diferença de dois dias no parâmetro colocação pelas vibrissas entre os grupos CVF x AVF ($p = 0,0003$) e de um dia entre os grupos AVF e AMF ($p = 0,01$), que indica o tratamento com melatonina capaz de reduzir o dano provocado pela anóxia nesse parâmetro (kruskal Wallis statistic 13.89). Em preensão palmar foi identificada diferença de três dias entre os grupos CVF e AVF ($p = 0,001$), de dois dias entre CMF e AMF ($p = 0,001$) e de três dias entre AVF e AMF ($p = 0,007$), que indica a melatonina eficaz em diminuir o dano provocado pela anóxia, também nesse parâmetro (Kruskal Wallis statistic 28.75).

Gráfico 4 - Análise da ontogenia de reflexos nas fêmeas



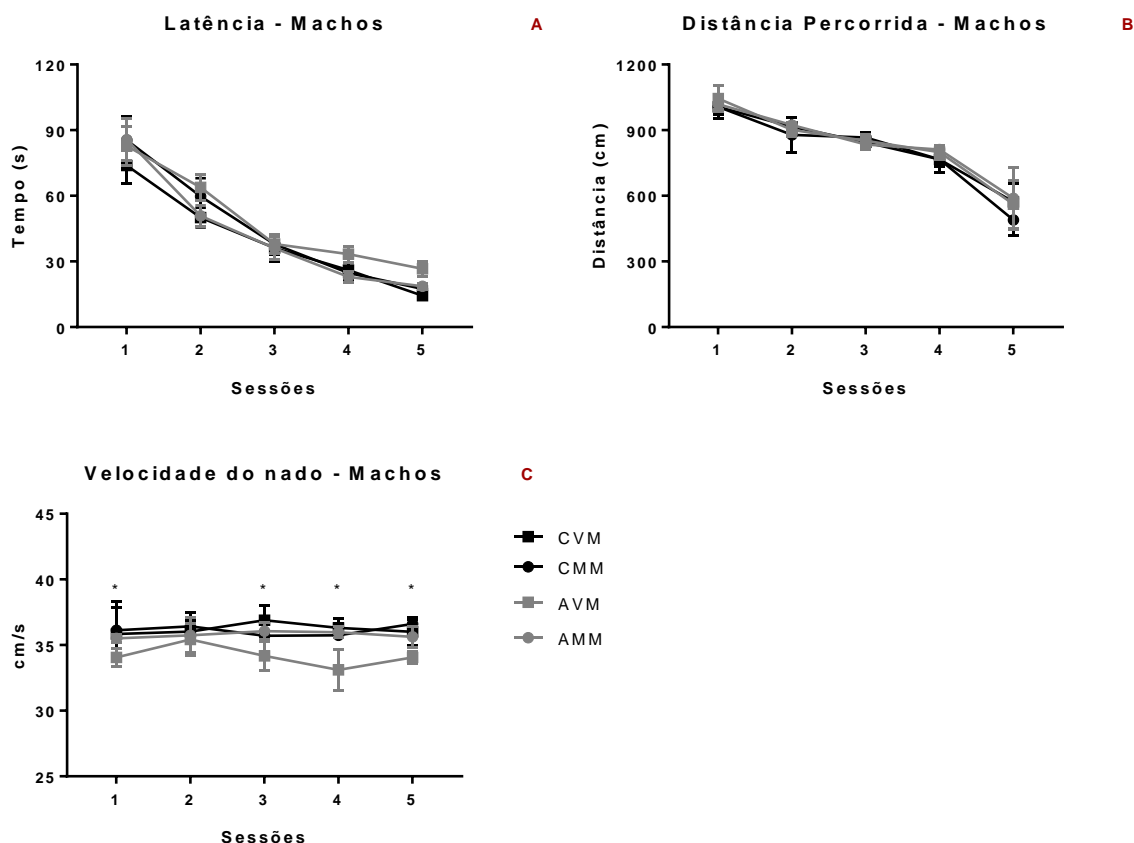
Análise da ontogenia de reflexos avaliada de P2 à maturação nos grupos CVF (n=11), CMF (n=8), AVF (n=8), AMF (n=12). **A.** Recuperação de decúbito. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 3.901). **B.** Colocação pelas vibrissas. Houve diferença entre os grupos CVF x AVF ($p = 0,0003$) e AVF x AMF ($p = 0,01$) (Kruskal Wallis statistic 13.89). **C.** Aversão ao precipício. Houve diferença entre os grupos CVF e AVF (Kruskal Wallis statistic 11.58; $p = 0,02$). **D.** Geotaxia negativa. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 7.012). **E.** Resposta ao susto. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 4.935). **F.** Aceleração em queda livre. Não houve diferença

entre os grupos (Kruskal Wallis statistic 8.475). **G.** Preensão palmar. Houve diferença entre os grupos CVF x AVF ($p = 0,001$), CMF x AMF ($p = 0,0006$) e AVF x AMF ($p = 0,001$) (Kruskal Wallis statistic 28.75). Teste Kruskal-Wallis. Dados apresentados em média \pm EPM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

5.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Na memória de referência espacial dos machos, foi observada diferença estatística entre sessões e tentativas ($F_{(4,150)} = 77,23$; $p \leq 0,0001$) do parâmetro latência, indicando que todos os animais aprenderam a localizar a plataforma oculta, independente de estímulo ou tratamento, entretanto não houve diferença entre grupos ($F_{(3,150)} = 2,104$; $p = 0,10$). No parâmetro distância percorrida, houve diferença entre sessões e tentativas ($F_{(19,600)} = 19,58$; $p = 0,0001$), indicando que ao longo das sessões, os animais diminuíram o trajeto até a plataforma, independente de estímulo ou tratamento, entretanto não houve diferença entre os grupos ($F_{(3,600)} = 0,834$; $p = 0,47$). No parâmetro velocidade do nado, o grupo anóxia veículo apresentou velocidade do nado menor do que os demais grupos, nos dias 1, 3, 4 e 5 ($F_{(3,150)} = 31,83$; $p = 0,0001$).

Gráfico 5 - Análise dos parâmetros do teste Labirinto Aquático de Morris nos machos

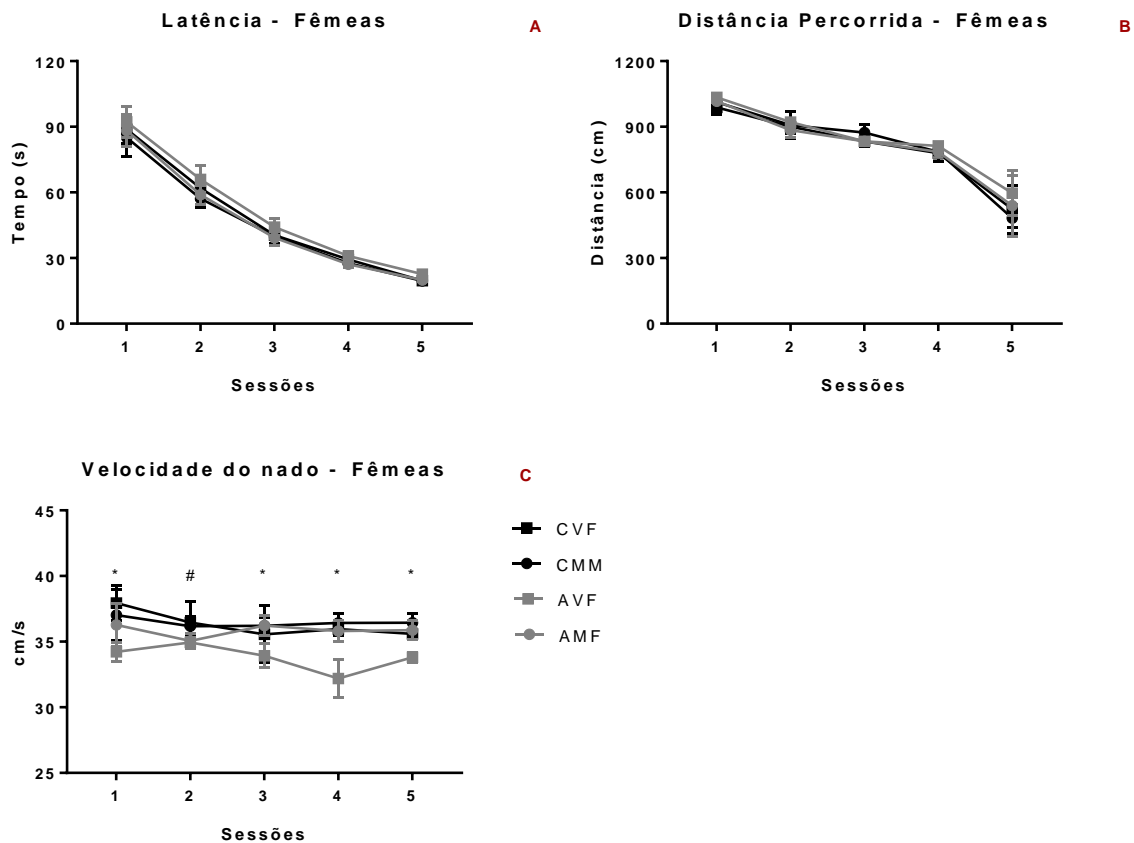


Análise dos parâmetros do labirinto aquático de Morris, avaliados entre P28 e P32, entre os grupos CVM (n=10), CMM (n=8), AVM (n=8), AMM (n=8). **A.** Latência. Houve diferença entre tentativas e sessões ($F_{(4,150)} = 77,23$; $p = 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos ($F_{(3,150)} = 2,104$; $p = 0,10$). **B.** Distância percorrida. Houve diferença entre tentativas e sessões ($F_{(19,600)} = 19,58$; $p = 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos ($F_{(3,600)} = 0,834$; $p = 0,47$). **C.** Velocidade do nado. Houve diferença entre o grupo AVM em relação aos demais grupos, nos dias 1, 3, 4 e 5 ($F_{(3,150)} = 31,83$; $p = 0,0001$). Teste ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste em Tukey-Kramer. Dados apresentados em média \pm EPM. * diferença do grupo AVM em relação aos grupos CVM, CMM e AMM; $p \leq 0,05$.

A análise da memória de referência espacial nas fêmeas, foi observada diferença estatística entre sessões e tentativas no parâmetro latência ($F_{(19,700)} = 55,11$); $p = 0,0001$), indicando que todos os animais aprenderam a localizar a plataforma oculta, independente de estímulo ou tratamento, entretanto, não houve diferença entre os grupos ($F_{(3,700)} = 1,965$); $p = 0,11$). De forma similar, no parâmetro distância percorrida, houve diferença entre sessões e tentativas ($F_{(19,700)} = 33,02$; $p = 0,0001$), indicando que ao longo das sessões, os animais diminuíram o trajeto até a plataforma, independente de estímulo ou tratamento, entretanto, não houve diferença

entre os grupos ($F_{(3,700)} = 1,425$; $p = 0,23$). Contudo, no parâmetro velocidade do nado, o grupo anóxia apresentou velocidade do nado menor quando comparado aos demais grupos, nos dias 1, 3, 4 e 5 ($F_{(3,175)} = 57,74$; $p \leq 0,0001$) e do que o grupo controle, também, na sessão 2.

Gráfico 6 - Análise dos parâmetros do teste Labirinto Aquático de Morris nas fêmeas

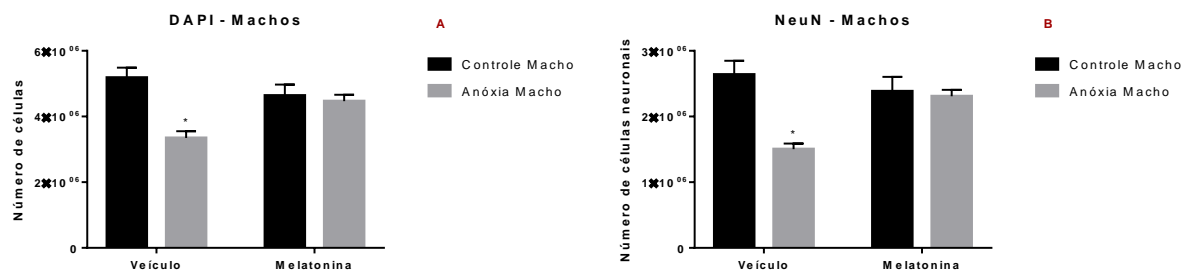


Análise dos parâmetros do labirinto aquático de Morris, avaliados entre P28 e P32, entre os grupos CVF (n=11), CMF (n=8), AVF (n=8), AMF (n=12). **A.** Latência. Houve diferença entre tentativas e sessões ($F_{(19,700)} = 55,11$; $p = 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos ($F_{(3,700)} = 1,965$; $p = 0,11$). **B.** Distância percorrida. Houve diferença entre tentativas e sessões ($F_{(19,700)} = 33,02$; $p = 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos ($F_{(3,700)} = 1,425$; $p = 0,23$). **C.** Velocidade do nado. Houve diferença entre o grupo AVF em relação aos demais grupos, nos dias 1, 3, 4 e 5 ($F_{(3,175)} = 57,74$; $p = 0,0001$) e entre o grupo AVF e o grupo CVF no dia 2. Teste ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste em Tukey-Kramer. Dados apresentados em média \pm EPM. * diferença do grupo AVF em relação aos grupos CVF, CMF e AMF; # diferença do grupo AVF em relação ao grupo CVF $p \leq 0,05$.

5.4 CONTAGEM CELULAR

Na contagem de núcleos celulares corados com DAPI dos animais machos, o grupo anóxia veículo apresentou menor número de células em comparação aos demais grupos ($F_{(1,20)} = 9,668$), indicando que o estímulo anóxico foi prejudicial em comparação ao controle ($p \leq 0,0005$) e que o tratamento com melatonina atenuou o dano ($p \leq 0,03$). Na contagem de núcleos neuronais, o grupo anóxia veículo também apresentou menor quantidade de neurônios comparados aos demais grupos ($F_{(1,20)} = 10,35$), indicando que a anóxia diminuiu a quantidade de neurônios ($p \leq 0,0005$) e a melatonina atenuou a perda neuronal após anóxia ($p \leq 0,01$).

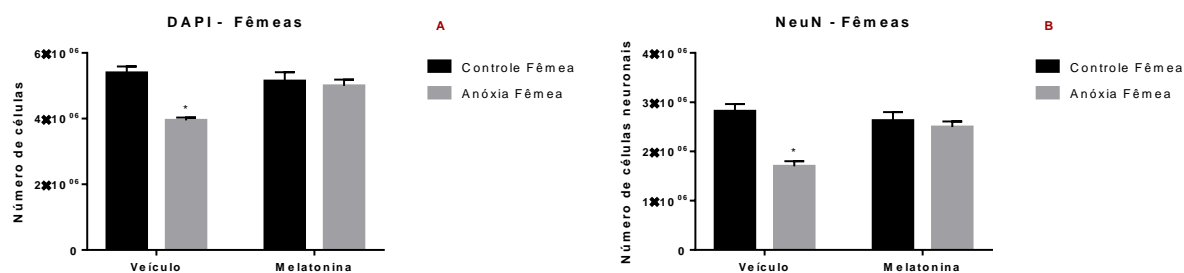
Gráfico 7 - Contagem de células nos machos



Contagem celular dos grupos CVM, CMM, AVM, AMM, em P35. **A.** Número de núcleos de células coradas com DAPI. Foi identificada diferença entre o grupo AVM e os demais grupos ($F_{(1,20)} = 9,668$). **B.** Núcleos de células neuronais. Foi identificada diferença entre o grupo AVM e os demais grupos ($F_{(1,20)} = 10,35$). Teste ANOVA de duas vias com pós-teste em Tukey-Kramer. Dados apresentados em média \pm EP. $n = 6$ para todos os grupos.

Na análise de células das fêmeas, o grupo anóxia apresentou menor número de células em comparação aos demais grupos ($F_{(1,20)} = 10,9$), indicando que o estímulo anóxico foi prejudicial em comparação ao controle ($p \leq 0,0002$) e que o tratamento com melatonina atenuou o dano ($p \leq 0,005$). Na contagem de núcleos neuronais, o grupo anóxia apresentou menor quantidade de neurônios comparados aos demais grupos ($F_{(1,20)} = 13,2$), indicando que a anóxia diminuiu a quantidade de neurônios ($p \leq 0,0001$) e a melatonina atenuou a perda neuronal após anóxia ($p \leq 0,002$).

Gráfico 8 - Contagem de células nas fêmeas



Contagem celular dos grupos CVF, CMF, AVF, AMF, em P35. **A.** Número de núcleos de células coradas com DAPI. Foi identificada diferença entre o grupo AVF e os demais grupos ($F_{(1,20)} = 10,9$). **B.** Núcleos de células neuronais. Foi identificada diferença entre o grupo AVF e os demais grupos ($F_{(1,20)} = 13,2$). Teste ANOVA de duas vias com pós-teste em Tukey-Kramer. Dados apresentados em média \pm EP. n = 6 para todos os grupos.

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE SEXO

Para comparação entre sexo, os grupos foram analisados com seus correspondentes (CVM x CVF, CMM x CMF, AVM x AVF e AMM x AMF). Portanto, estes dados serão apresentados em forma de tabela, considerando apenas os que resultaram em diferenças significativas. Na avaliação da ontogenia de reflexos, foi identificada diferença significativa entre os grupos CVM e CVF, nos parâmetros: aversão ao precipício ($p = 0,04$) e geotaxia negativa (0,01), quando o aparecimento foi mais rápido nas fêmeas quando comparadas aos machos, e em preensão palmar ($p = 0,02$), quando o aparecimento foi mais rápido nos machos, em comparação às fêmeas. Não houve diferença nos demais parâmetros ($p \geq 0,05$).

Tabela 1 – Comparação entre sexos na ontogenia de reflexos

Parâmetro	Grupos	Média	DP	n	p-valor
Aversão ao Precipício	CVM	11,3	0,94	10	0,04
	CVF	10,18	0,16	11	
Geotaxia Negativa	CVM	13,8	1,31	10	0,01
	CVF	12,18	1,66	11	
Preensão Palmar	CVM	6,5	1,08	10	0,02
	CVF	7,54	0,68	11	

Comparação entre sexos na análise da ontogenia de reflexos. CVM (n = 10) e CVF (n=11). Teste Mann-Whitney.

Na contagem celular, foi detectada diferença entre os grupos AVM e AMF ($p = 0,02$), que indica menor número de células coradas com DAPI nos machos quando comparados às fêmeas, após anóxia neonatal. Não foi detectada diferença no número de neurônios entre machos e fêmeas.

Tabela 2 - Comparação entre sexos na contagem celular

Parâmetro	Grupos	Média	DP	n	p-valor
DAPI	CVM	5182292	306363	6	0,57
	CVF	5390625	196610	6	
	AVM	3346354	207109	6	0,02*
	AVF	3945313	87346	6	
	CMM	4635417	337338	6	0,26
	CMF	5143229	270946	6	
	AMM	4467813	193256	6	0,07
	AMF	4999958	189232	6	
NeuN	CVM	2639427	208628	6	0,5
	CVF	2816667	144714	6	
	AVM	1504714	83524	6	0,41
	AVF	1698438	103321	6	
	CMM	2382630	220256	6	0,17
	CMF	2623542	174904	6	
	AMM	2308598	98232	6	0,23
	AMF	2496544	110582	6	

Comparação entre sexos na análise da ontogenia de reflexos. Test-T Student. * $p \leq 0,05$.

Nos demais parâmetros, não houve diferença significativa entre sexo.

6 DISCUSSÃO

O tempo de maturação das características físicas e ontogenia de reflexos dos animais controle apresentado neste estudo está de acordo com a literatura e resultados anteriores obtidos por pesquisadores do laboratório (ALLAM & ABO-ELENEEN, 2012; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017), o que indica padrão bem estabelecido no desenvolvimento neurológico.

Na maturação de características físicas, este estudo indicou que a anóxia adiantou a abertura ocular nos machos, quando comparados aos controles, Nas fêmeas atrasou a irrupção dos incisivos superiores, prejuízo que foi atenuado pelo tratamento com melatonina. Na literatura, poucos estudos se dedicaram em estudar os efeitos do déficit de oxigênio no desenvolvimento. Dos encontrados, estão pesquisadores que utilizaram o mesmo modelo de anóxia neonatal ou semelhante (DELL'ANNA et al., 1991; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017), modelo de anóxia neonatal induzida em 2 episódios de 12 min cada, em dois dias consecutivos (P0 e P1) (MARCUIZZO et al., 2010) e modelo de hipóxia-isquemia (LUBICS et al., 2005). A maioria desses estudos não identificou diferença nos parâmetros de desenvolvimento físico. De fato, o desenvolvimento físico não está entre as diferentes alterações encontradas em humanos identificados com EHI no período neonatal, entretanto, as alterações encontradas pelo mesmo grupo de pesquisa sugerem que a anóxia neonatal pode afetar a maturação de características físicas de ratos de forma diferenciada em cada parâmetro (LEE, 2015; KUMAR et al., 2017), o que revela a necessidade de avaliar como a anóxia afeta as regiões específicas relacionadas a cada um deles.

Na literatura, há grande variabilidade nos achados de diferentes pesquisadores nos reflexos de recuperação de decúbito, aversão ao precipício e geotaxia negativa, tanto em ratos, quanto em camundongos (DELL'ANNA et al., 1991; TEN et al., 2003; LUBICS et al., 2005; MARCUZZO et al., 2010; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017). Neste estudo, não foi encontrada diferença em nenhum destes parâmetros. A falta de consistência entre os resultados pode ser decorrente da metodologia aplicada no processo de avaliação; neste estudo, o tempo aguardado para observar o aparecimento do reflexo foi de até 10 segundos, entretanto, outros pesquisadores aguardam 30 ou até 60 segundos. Em relação a metodologia, há ainda estudos

avaliaram três vezes consecutivas, todos os dias até a maturação do reflexo, o que pode favorecer o aparecimento do reflexo, e aumentar o estresse decorrente do afastamento materno. Além disso, a velocidade de desenvolvimento do sistema nervoso do rato inviabiliza que a avaliação desses parâmetros seja baseada em dias pós-natal. Uma possível alternativa de mensuração é avaliar o tempo (em segundos) que os animais demoram para apresentar o reflexo, uma vez que nesse tipo de avaliação foi encontrada diferença entre animais controles e anoxiados em diferentes estudos, que sugere maior possibilidade de replicação (WANG et al., 2013; SAMAIYA & KRISHNAMURTHY, 2015).

O reflexo de preensão palmar, parece um parâmetro confiável para avaliação do desenvolvimento, pois os resultados são replicados em todos os estudos encontrados. O atraso que os animais expostos ao déficit de oxigênio apresentaram certifica a hipótese de distúrbio neurológico causado pelo insulto. A expressão de cada reflexo, está relacionada ao estágio de desenvolvimento de determinada área do sistema nervoso central (ALLAN & ABO-ELENEEN, 2012), sendo que a alteração na preensão palmar provavelmente ocorre em decorrência de lesões nas regiões envolvidas com o desenvolvimento motor, como o córtex somatossensorial primário que envolve áreas específicas relacionadas aos membros anteriores, e apresentou menor densidade celular, disfunção mitocondrial e apoptose após anóxia neonatal (SAMAIYA & KRISHNAMURTHY, 2015; KUMAR et al., 2017). Outro reflexo associado ao córtex somatossensorial é o de colocação pelas vibrissas que, neste estudo, foi prejudicado pela anóxia neonatal nas fêmeas, o que reitera que as alterações no córtex observadas em estudos anteriores refletem as alterações na ontogenia de reflexos.

Quanto ao tratamento, a melatonina foi capaz de diminuir o tempo de instalação da geotaxia negativa nos machos, reduzir o atraso provocado pela anóxia no reflexo de colocação pelas vibrissas, nas fêmeas, e de preensão palmar em machos e fêmeas. Estudo realizado com camundongos machos expostos à hipóxia também encontrou resultados semelhantes. (WANG et al., 2013). Uma possível explicação para o melhor desempenho dos animais anoxiados é a atuação da melatonina no bloqueio da atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), na diminuição da ativação microglial e dos níveis de óxido nítrico, atenuando o processo inflamatório e como consequência a expressão do fator de necrose tumoral (TNF) e morte celular, processos que são induzidos pelo déficit de oxigênio.

Nas análises relativas ao labirinto aquático de Morris, a acentuada diminuição observada tanto no tempo que os animais levaram para encontrar a plataforma quanto na distância percorrida ao longo das sessões, indica que todos os animais memorizaram sua localização, independente do estímulo, tratamento ou sexo. De forma similar a outros pesquisadores, não foi observada diferença entre os grupos nesses parâmetros (LEE, 2015; MATSUDA 2017). Dentre as possíveis explicações para os resultados deste estudo está a idade em que os animais foram submetidos ao teste. Por considerar fêmeas e com objetivo de obter maior confiabilidade dos resultados e evitar influências hormonais, a avaliação foi realizada previamente à menarca. Entretanto, os estudos com o labirinto aquático de Morris geralmente são realizados após P60 quando os animais são considerados adultos e com o SNC efetivamente desenvolvido (RICE & BARONE, 2000; SEMPLE et al., 2013). Nesse período, foi observada diferença entre grupos controle e anóxia (DELL'ANNA, et al., 1991; TAKADA et al., 2015), mas apenas incluíram machos. Outra possível explicação está no elevado número de tentativas/sessões utilizadas para avaliação. Estudos apontam que mesmo animais com lesões cerebrais são capazes de aprender a localizar a plataforma quando submetidos à muitos testes, inclusive pesquisas com modelos animais de deficiências cognitivas têm utilizado o teste do labirinto aquático de Morris como recurso para promover a aprendizagem desses animais (LAUTERBORN et al., 2019).

Quando avaliada a velocidade do nado, foi detectado que os animais do grupo anóxia foram mais lentos em comparação aos seus controles. Esse resultado está de acordo com achados anteriores que reportam diminuição da atividade motora dos animais anoxiados duas semanas após anóxia neonatal (NYAKAS et al., 1991), o que pode justificar menor velocidade desses animais durante o teste. A melatonina demonstrou atenuar o déficit, pois sua aplicação manteve a velocidade do nado próxima à dos animais controle.

Na comparação entre sexo, foi observada diferença entre os grupos controle veículo macho e controle veículo fêmea, nos parâmetros de geotaxia negativa e aversão ao precipício, quando as fêmeas tiveram a instalação dos reflexos mais cedo em comparação aos machos, e no parâmetro preensão palmar, quando a instalação foi anterior no machos quando comparados às fêmeas. Esses dados já foram encontrados em estudo anterior no laboratório (KUMAR et al., 2017) e, portanto,

sugerem o desenvolvimento neurológico ocorre de forma diferenciada entre machos e fêmeas, como evidenciado por Rice & Barone (2000). Contudo, essas diferenças não foram observadas tanto nos grupos controle tratados com melatonina, quanto nos grupos anóxia tratados com veículo ou melatonina, o que também foi observado por outros pesquisadores em estudo realizado com ratos submetidos à hipóxia-isquemia (HUANG, WEN, LIU, 2015). Esses resultados apontam para a importância de estudar os mecanismos envolvidos na instalação desses reflexos em machos e fêmeas controle.

Quanto à quantidade de células no hipocampo, os machos anoxiados apresentaram menos número de núcleos celulares contados com DAPI, quando comparados às fêmeas anoxiadas, resultado que concorda com achados na literatura que afirmam que os machos são mais vulneráveis ao déficit de oxigênio (LOIDL et al., 2000; HUANG, WEN, LIU, 2015). Entretanto, quando realizada a comparação entre os grupos tratados com melatonina, não foi identificada diferença, o que sugere a eficácia da melatonina em diminuir a lesão e como consequência, a diferença entre machos e fêmeas, nesse parâmetro.

A contagem celular realizada a partir da técnica do fracionador isotrópico, permitiu observar que a anóxia neonatal, como esperado, diminuiu a quantidade de células neuronais e não neuronais no hipocampo. Até o momento, essa técnica não havia sido utilizada como meio de processamento de tecido para contagem do número de células no encéfalo de animais submetidos ao déficit de oxigênio. Seus resultados mostram que é um método conveniente quando o objetivo é analisar estruturas de modo geral, uma vez que todo o procedimento (processamento, reação e contagem) pode ser realizado em um dia, sendo muito mais rápido em comparação à protocolos de imuno-histoquímica, por exemplo. Esses achados comprovam que o processo de inflamação e consequente morte celular após insulto provocam alterações que se mantêm ao longo da vida do animal.

A melatonina atenuou o dano no hipocampo provocado pela anóxia, provavelmente por sua atuação na cascata de eventos que acontecem após anóxia neonatal, diminuindo os níveis de óxido nítrico, as respostas microgliais, a superprodução de mediadores pró-inflamatórios e consequente morte celular no hipocampo (CARLONI et al., 2008a, 2014; OLIVIER et al., 2009).

Em resumo, a melatonina foi capaz de atenuar os prejuízos causados pela

anóxia neonatal, na irrupção dos incisivos inferiores e na colocação pelas vibrissas nas fêmeas, de preensão palmar, na velocidade do nado no labirinto aquático de Morris, e na quantidade de células no hipocampo, tanto nos machos, quanto nas fêmeas, o que confirmou seu efeito neuroprotetor após anóxia neonatal.

7 CONCLUSÃO

I O tratamento com melatonina evidenciou seu potencial como agente neuroprotetor em alguns parâmetros do desenvolvimento, de forma diferenciada quanto ao sexo e tipo de parâmetro analisado; irrupção dos incisivos inferiores e colocação pelas vibrissas, nas fêmeas; preensão palmar nos machos e nas fêmeas.

II O tratamento com melatonina foi eficiente em atenuar o atraso dos animais anoxiados, tanto machos quanto fêmeas, no parâmetro velocidade no teste de memória;

III A melatonina reduziu o dano no hipocampo causado pela morte celular, observado pelo número de células neuronais e não-neuronais.

III A melatonina reduziu a diferença entre machos e fêmeas anoxiados, observado pelo número de células neuronais e não-neuronais do hipocampo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAM, A. A.; ABO-ELENEEN, R. E. The development of sensorimotor reflexes in albino mice; albino rats and black-hooded rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 545–553, 2012.
- BACHEVALIER, J.; VARGHA-KHADEM, F. The primate hippocampus: ontogeny, early insult and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, n. 2, p. 168-174, 2005.
- BAYER, S. A. et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 1, p. 83-144, 1993.
- BERGER, H. R. et al. No improvement of neuronal metabolism in the reperfusion phase with melatonin treatment after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, n. 2, p. 339–350, 2016.
- BERGER, H. R. et al. Early metabolite changes after melatonin treatment in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury studied by in-vivo ¹H MR spectroscopy. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–15, 2017.
- BLANCO, S. et al. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 62, p. 32–43, 2017.
- BLENCOWE, H et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analyzes and implications. **The Lancet**, v. 379, p. 2162-2172, 2012.
- CARLONI, S. et al. **Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats** **Journal of Pineal Research**, 2008a.
- CARLONI, S. et al. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 2, p. 157–164, 2008b.
- CARLONI, S. et al. Melatonin reduces endoplasmic reticulum stress and preserves sirtuin 1 expression in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 192–199, 2014.
- CAROLINI, S. et al. Melatonin pharmacokinetics following oral administration in preterm neonates. **Molecules**, v. 22, p. 1-12, 2017.

CHAWANPAIBOON, S. et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 1, p. 37-46, 2019.

COOPER, J. M. et al. Neonatal hypoxia, hippocampal atrophy, and memory impairment: Evidence of a causal sequence. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 6, p. 1469–1476, 2015.

DELL'ANNA, M. E. et al. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behavioural Brain Research**, v. 45, n. 2, p. 125–134, 1991.

DELL BIGIO, M. R.; BECKER, L. E. Microglial aggregation in the dentate gyrus: a marker of mild hypoxic-ischaemic brain insult in humans infants. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 144-151, 1994.

ESCOBAR, G. J.; LITTENBERG, B.; PETITTI, D. B. Outcome among surviving very low birthweight infants: A meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 66, n. 2, p. 204–211, 1991.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, p. 234-241, 1965.

FUNAYAMA, C. A. R. **Anóxia neonatal e sequelas neurológicas**. São Paulo: Átomo, 2005. 102 p.

GAFFNEY, G. et al. Cerebral palsy and neonatal encephalopathy. **Archives of disease in childhood**, v. 70, n. 5, p. 195-200, 1994.

GITTO, E. et al. Update on the use of melatonin in pediatrics. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 1, p.21-28, 2010.

HALBERG, F. et al. From circadians of the fifties to chronomes in vitro as in vivo. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 3, p. 287-296, 1994.

HARPSOE, N. G. et al. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 901-909, 2015.

HASSELL, K. J.; REITER, R. J.; ROBERTSON, N. J. Melatonin and its role in neurodevelopment during the perinatal period: A review. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 24, n. 2, p. 76–107, 2013.

HERCULANO-HOUZEL, S. Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2518–2521, 2005.

HERSHKOWITZ, M.; GRIMM, V. E.; SPEISER, Z. The effects of postnatal anoxia on behaviour and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat. **Developmental Brain Research**, v. 7, n. 2–3, p. 147–155, 1983.

HILL, A. Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. **Pediatric Neurology**, v. 7, n. 5, p. 317–325, 1991.

HU, Y. et al. Melatonin reduces hypoxic-ischaemic (HI) induced autophagy and apoptosis: An in vivo and in vitro investigation in experimental models of neonatal HI brain injury. **Neuroscience Letters**, v. 653, p. 105–112, 2017.

HUANG, H. Z.; WHEN, X. H.; LIU, H. Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. **The International Journal of Neuroscience**, v. 126, n. 7, p. 647-657, 2016.

KUMAR, A. J. et al. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p. 242–250, 2017.

KURINCZUK, J. J. et al. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Early Human Development**, v. 86, p. 329-338, 2010.

LAPTOOK, A. R. Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 3, p. 529–545, 2016.

LAUTERBORN, J. C. et al. Spaced training improves learning in Ts65Dn and Ube3a mouse models of intellectual disabilities. **Translational psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.

LEE, V. Y. Influência do exercício materno espontâneo e da anóxia neonatal no desenvolvimento, na memória espacial e no hipocampo de ratos. 2015. 73 f.

LENROOT, R. K.; GIEDD, J. N. Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n.1, p. 718-729, 2006.

LOIDL, C. F. et al. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. **Physiology and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 263–269, 2000.

LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural Brain Research**, v. 157, n. 1, p. 157–165, 2005.

MARCUZZO, S. et al. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on

sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats.

Brain and Development, v. 32, n. 4, p. 323–331, 2010.

MARKUS, R. P. et al. Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. **British Journal of Pharmacology**, 2017.

MAYO, J. C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 165, n. 1–2, p. 139–149, 2005.

MAYORAL, S. R.; OMAR, G.; PENN, A. A. Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. **Pediatric Research**, v. 66, n. 3, p. 248–253, 2009.

MILLAR, L. J. et al. Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. 78, p. 1-36, 2017.

MERCHANT, N. M. et al. Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 725-733, 2013.

MOHAN, N. et al. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NK-kappa B. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 37, n. 6, p. 1063-1070, 1995.

NYAKAS, C. et al. Impaired Learning and Abnormal Open-field Behaviours of Rats After Early Postnatal Anoxia and the Beneficial Effect of the Calcium Antagonist Nimodipine. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 168–174, 1991.

NYAKAS, C.; BUWALDA, B.; LUITEN, P. G. M. Hypoxia and brain development. **Progress in Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 1–51, 1996.

OLIVIER, P. et al. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009.

PAPROCKA, J. et al. Melatonin in hypoxic-ischemic brain injury in term and preterm babies. **International Journal of Endocrinology**, v. 2019, p. 1-11, 2019.

PEARCE, W. J. Mechanisms of hypoxic cerebral vasodilatation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 65, n. 1, p. 75–91, 1995.

QUIGLEY, M. et al. Early term late preterm birth are associated with poorer school performance at age 5 years: a cohort study. **Archives of disease in childhood: fetal and neonatal edition**, v. 97, n. 3, p. 167-174, 2012.

REITER, R. J. et al. Effect of the pineal gland on alcohol consumption by congenitally blind male rats. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, v. 34, n. 3, p. 937-939, 1973.

REITER, R. J. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 376–86, 2000.

REES, S.; HARDING, R.; WALKER, D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 6, p. 551-563, 2011.

REVUELTA, M. et al. Characterization of Gene Expression in the Rat Brainstem After Neonatal Hypoxic–Ischemic Injury and Antioxidant Treatment. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 1129–1143, 2017.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2004.

ROSALES-CORRAL, S. et al. Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. **J Pineal Res**, v. 35, n. 2, p. 80–84, 2003.

SAMAIYA, P; KRISHNAMURTHY, S. Characterization of mitochondrial bioenergetics in neonatal anoxic model of rats. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 47, n. 3, p. 217-222, 2015.

SCHAH, D. K. et al. Reduction in cerebellar volumes in preterm infants: relationship to white matter injury and neurodevelopment at two years of age. **Pediatric Research**, v. 60, n. 1, p. 97-102, 2006.

SCHMIDT, J. W.; WALSH, W. F. Hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants. v. 3, p. 277–284, 2010.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, 106-107, p. 1-16.

SOUSA, C. E. C. Caracterização do eixo imune-pineal: mecanismo de ação do

controle da função pineal pela citocina pró-inflamatória TNF. 2011. 120f.

STEVENSON, D. K. et al. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 83, n. 3, 182-185, 2000.

TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 2011.

TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, p. 247–259, 2015.

TAKADA, S. H. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 331–338, 2016.

TEM, V. et al. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Behavioural Brain Research**, v. 145, p. 209-219, 2003.

VANNUCCI, R. C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. **American Journal of Perinatology**. v. 17, n. 3, p. 113-120, 2000.

VASCONCELOS, R, G. Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento materno e o desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar. 2013. 97 f.

WANG, Z. et al. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 84–97, 2013.

WOYTHALER, M. et al. Late preterm infants have worse 24-month neurodevelopmental outcomes than term infants. **Pediatrics**, v. 127, n. 3, p. 622-629, 2011.

ZHU, C. et al. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 4, p. 1016–1027, 2006.