



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS A SUPRESSÃO DE MELATONINA NA JUVENTUDE**

**Efeito da supressão de melatonina em ratos jovens na ansiedade de ratos adultos**

Ciências Biológicas  
Fisiologia Humana  
Neurociências

Relatório Final  
Período da bolsa: 01/09/2022 a 31/08/2023

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/COPEs

Orientador: Katty Anne Amador de Lucena Medeiros  
Autor: Tamiris Rodrigues Santos



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

## **SUMÁRIO**

- 1. Introdução**
- 2. Objetivos**
- 3. Metodologia**
- 4. Resultados e discussões**
- 5. Conclusões**
- 6. Perspectivas**
- 7. Referências bibliográficas**
- 8. Outras atividades**

## 1. Introdução

A melatonina é um hormônio lipofílico formado a partir do triptofano, tendo sua maior produção na glândula pineal. Sua produção ocorre em quase todos os organismos existentes, principalmente em mamíferos (VOLLRATH, L., 1981; POZA, J.J., *et al.*, 2022). A glândula pineal é uma pequena estrutura que fica localizada abaixo do corpo caloso, sendo controlada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), do hipotálamo. Esta glândula endócrina fica fixa ao teto do terceiro ventrículo do encéfalo (na linha mediana) e é considerada como principal relógio biológico humano (BURGOS, F.R.F., *et al.*, 2016).

A produção endógena da melatonina ocorre em células denominadas de pinealócitos. Primeiramente, para iniciar o processo, o triptofano que é um aminoácido é captado na circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1). O 5-HTP, descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, gera a serotonina, que é metabolizada durante a fase de escuro à N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Após essa etapa, a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxil-indolO-metiltransferase (HIOMT) dando como produto a melatonina (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003; SILVA, 2005).

A melatonina é inibida na presença de luz, dessa forma, a informação de luz que que suspende a liberação do hormônio é percebida através de fotorreceptores especializados que estão presentes na retina, que se transforma em uma informação visual que é depois transduzida para o SCN via trato retino-hipotalâmico. Assim, o SCN gera uma sinalização, que vai ser transmitida ao núcleo paraventricular (PVN) em direção às células da coluna intermediolateral da medula espinhal. Após isso, através de fibras pré-ganglionares simpáticas, é lançada ao gânglio cervical superior e por último, os axônios simpáticos pós-ganglionares dos neurônios do gânglio cervical superior enviam o sinal à glândula pineal (MARONDE & STEHLE, 2007; MOORE, 1996; RIBELAYGA, *et al.*, 2000).

Nesse momento também, a luz gera a liberação do neurotransmissor GABA por parte do SNC e da hipófise por parte dos neurônios, levando a uma adaptação da expressão genes do relógio circadiano ao meio ambiente. Assim, o SNC tem uma regulação da síntese de melatonina, através da liberação do neurotransmissor GABA e do glutamato, para então inibir a produção da melatonina na glândula pineal (MARONDE & STEHLE, 2007; FOSTER & HANKINS, 2007; BENARROCH, 2008).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Por outro lado, na ausência de luz a produção de melatonina suprimida, assim o SCN envia projeções noradrenérgicas para as terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares que inervam a glândula pineal. A noradrenalina atua despolarizando a membrana pré sináptica dos pinealócitos, introduzindo a produção de melatonina. Dessa forma, o ciclo claro-escuro gera alterações sanguíneas de melatonina que em consequência proporciona mudanças circadianas nos valores do hormônio para organizar os ritmos circadianos e sazonais, como o sono e ainda regula o núcleo supraquiasmático, através da interação com os receptores MT1 e MT2 (MARONDE & STEHLE, 2007; FOSTER & HANKINS, 2007; BENARROCH, 2008).

Pesquisas estão sendo realizadas para investigar a desregulação do ritmo circadiano do ponto de vista da saúde mental e como têm aumentado gradualmente nos últimos anos, especialmente investigações envolvendo transtornos de humor, cognição e ansiedade. Além disso, um déficit de produção de melatonina tem sido relacionado com distúrbios do ritmo circadiano do sono, doenças neurodegenerativas, depressão, glaucoma, distúrbios dermatológicos, psiquiátricos, cardiovasculares, vários tipos de câncer e alguns transtornos mentais, como o transtorno de ansiedade (PANDI-PERUMAL, *et al.*, 2008).

A ansiedade está presente durante toda a vida da pessoa e pode ser entendida como um sentimento normal e natural do organismo do indivíduo para ele se preparar para uma situação nova e desconhecida. O comportamento está presente na resposta adaptativa sendo importante para alertar o organismo para eventos de risco, ou seja, de luta ou fuga no ambiente. Todavia, a ansiedade passa a ser patológica quando ela atinge elevados níveis contínuos, fazendo com que se torne prejudicial para o ser humano, causando desconforto e constante estado de alerta. Assim, quando ela alcança altos graus de intensidade em momentos inapropriados e quando prolongada, é possível considerar um transtorno. Ficando entre os transtornos psíquicos mais frequentes na população mundial (SILVA, A.L.P., 2010; CASTILLO, 2000; ETKIN, 2010).

Estudos já demonstram que a supressão de melatonina pode interferir no processo de memória e ansiedade (TCHEKALAROVA, *et al.*, 2022; HUANG, *et al.*, 2014). Com isso, uma alternativa para o tratamento do transtorno é garantir a produção suficiente de melatonina reduzindo a poluição luminosa à noite, preservando um regime regular de sono para representar um sistema ansiolítico endógeno. Uma vez que a melatonina pode ser considerada um tratamento adicional ou alternativo para diferentes condições associadas à ansiedade, visto que ela atua em vários potenciais mecanismos humorais e de sinalização que participam do desenvolvimento do transtorno (REPROVA, K, *et al.*, 2021).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Segundo REPROVA, K., *et al.*, (2022), a melatonina também é liberada diretamente no líquido cefalorraquidiano (LCR), onde a concentração desta indolamina é muito maior no LCR do que no sangue, fazendo com que funcione como um potente agente antioxidante e antiinflamatório após se difundir no tecido neural, participando potencialmente da normalização da reação ao estresse e da ansiólise. Contudo, ainda não está bem esclarecido como essa diminuição de melatonina na juventude poderia influenciar esses comportamentos na vida adulta. Sendo assim, a hipótese do trabalho é que a supressão de melatonina na juventude pode ocasionar prejuízos estruturais e funcionais do cérebro, surgindo doenças mentais como a ansiedade na fase adulta.

## 2. Objetivos

### Geral

- Avaliar o efeito da supressão da melatonina no comportamento tipo-ansioso de ratos.

### Específicos

- Identificar o efeito da supressão da melatonina no comportamento exploratório de ratos adultos;
- Avaliar o comportamento tipo-ansioso em ratos adultos submetidos a supressão de melatonina na juventude.

## 3. Metodologia

### Aspectos Éticos

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciências e Animais de Laboratório (SBCAL), pela lei brasileira para o uso de animais em pesquisas (Lei Arouca, nº 11.794/2008) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS (CEUA/UFS) sob protocolo de número N° 3490280722. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

### Animais para Experimentação

Foram utilizados 23 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* com 2 meses, pesando entre 250 a 300 gramas, e 4 meses com peso de 400 a 450 gramas, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h, temperatura (22



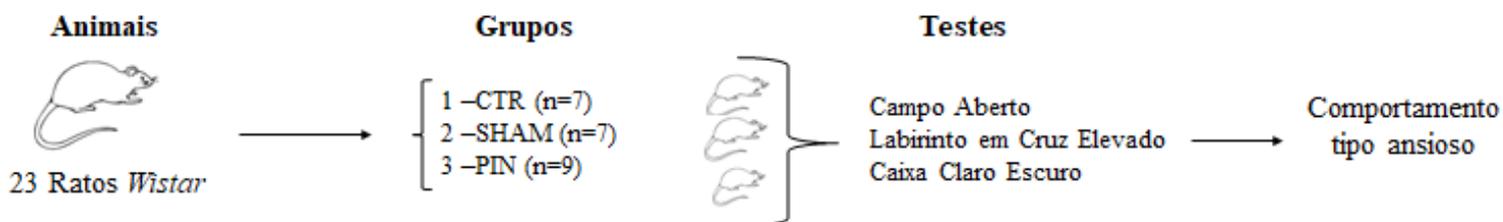
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

$\pm 2^\circ \text{C}$ ) e livre acesso ao alimento e água. Foram alojados em número de 4 a 5 em gaiolas de tamanho 33 x 40 x 17 cm, com grade aramada em aço inoxidável, comedouro e encaixe para o bebedouro. Todos os experimentos foram gravados e a apuração dos parâmetros avaliados será feita por meio do software *Any-Maze*.

### Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

- A. Grupo CTR: Os animais que não foram submetidos à cirurgia estereotáxica;
- B. Grupo SHAM: Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, mas não ocorreu a retirada da glândula pineal;
- C. Grupo PIN: Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para retirada da glândula pineal.



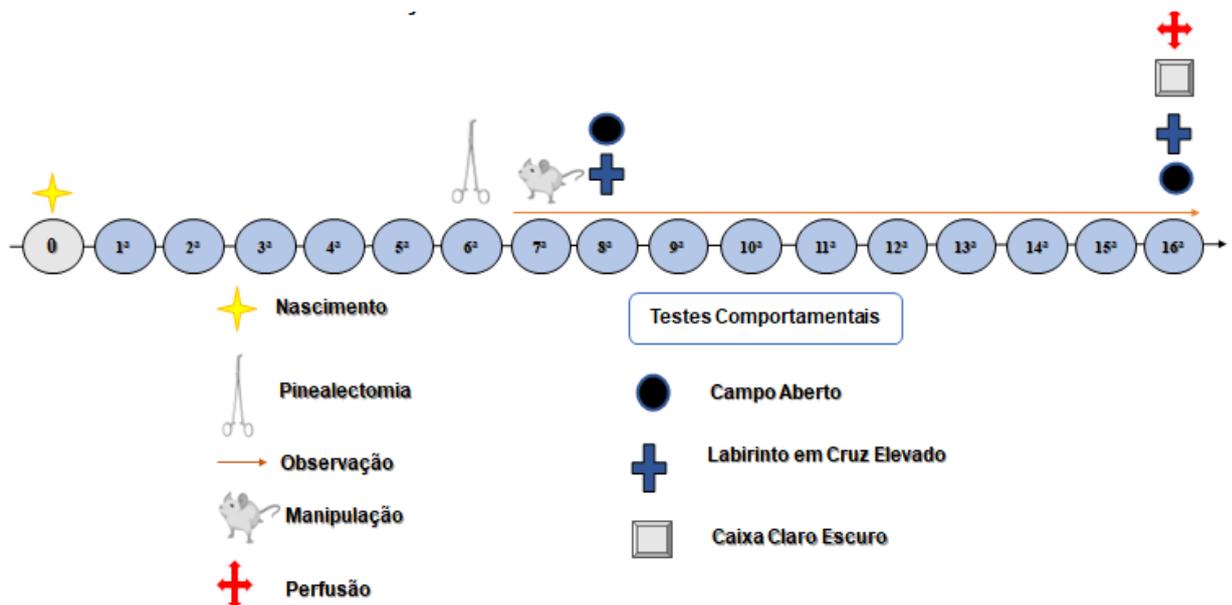
**Figura 1.** Esquema gráfico dos grupos comportamentais do experimento. Os animais foram divididos em 3 grupos: 1 -CTR; 2 SHAM; 3 PIN.

### Procedimentos Gerais

É importante ressaltar que antes de qualquer experimento comportamental ou injeção, os animais foram submetidos à primeira etapa que foi a manipulação que consiste em sessões diárias de 5 min de manipulação dos ratos pelos pesquisadores envolvidos, em um período de 5 dias antes do início dos experimentos. Essa etapa tem finalidade de habituar os animais aos experimentadores e reduzir possíveis alterações comportamentais decorrentes do estresse e da ansiedade causados pelo contato e presença de pessoas durante o experimento (SANTOS, *et al.*, 2013). Após o período de manipulação, todos os experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo horário de 8:00 a 12:00 pela manhã e os animais foram observados alternadamente entre os grupos. Entre as sessões comportamentais para diminuir as pistas e rastros de cheiro deixadas pelos animais, os aparatos foram limpos com uma solução de etanol a 10% ao término de cada sessão. Os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto foram quantificados com o auxílio do software de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA).

### **Delineamento Experimental**

Os animais foram inicialmente divididos em três grupos: grupo PIN, grupo SHAM e grupo CTR. Sendo o grupo PIN com n= 9 animais, o grupo SHAM com n= 7 animais e o grupo CTR com n= 7 animais. Na 6ª semana de vida dos animais, foi realizada a cirurgia de pinealectomia, em que os animais do grupo PIN foram submetidos à cirurgia estereotáxica para retirada da glândula pineal. Os animais do grupo Sham passaram pela cirurgia estereotáxica, porém não ocorreu a retirada da glândula pineal. Os animais do grupo controle não passaram por nenhum procedimento cirúrgico. Após a cirurgia, os animais foram devolvidos ao biotério e ficaram em observação até completarem 2 e 4 meses de vida. Na 7ª semana, quando completaram 2 meses, os animais foram manipulados por 5 dias e na 8ª semana eles passaram pelos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Na 16ª e última semana, os animais com 4 meses passaram pelos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro escuro. Entre 60 e 90 minutos após cada teste comportamental, os animais foram perfundidos (Figura 2).



**Figura 2. Ilustração esquemática do Delineamento Experimental.** O experimento teve duração de 16 semanas, ou seja, 4 meses. A seta preta indica que os animais ficaram em observação durante todo o experimento. No dia 0 teve o nascimento dos animais. Na 6ª semana ocorreu a cirurgia de pinealectomia para a retirada da glândula. Na 7ª semana, quando os animais estavam com 2 meses, ocorreu a primeira



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

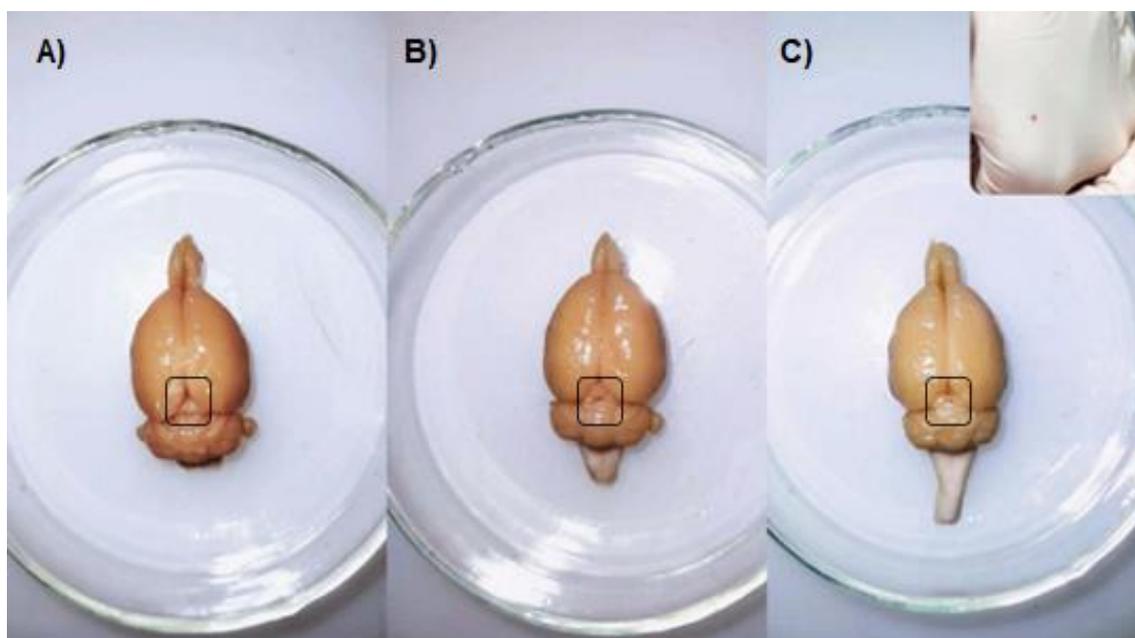
### PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

manipulação que durou 5 dias. Na 8ª semana foram feitos os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Na 16ª semana, período em que os animais já estavam com 4 meses, foram feitos os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, caixa claro escuro e a perfusão dos animais.

#### **Cirurgia Estereotáxica – Pinealectomia**

Os animais foram anestesiados com xilazina 10% (10 mg/kg) e ketamina 10% (100 mg/kg) intraperitonealmente (I.P). Os animais só foram submetidos ao procedimento cirúrgico quando não estava mais respondendo a estímulos, ou seja, apresentando reflexos como: tensão na cauda, movimentação de vibrissas e movimentação de patas.

Após constatação do estado anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e seus membros em extensão. Antes da cirurgia, foi realizada a tricotomia da área dorsal da cabeça e assepsia com água, sabão e soro fisiológico. Após a higienização, foi usado clorexidina na região. Para o campo cirúrgico, o animal foi posicionado em uma estrutura estereotáxica e uma incisão longitudinal na linha média foi feita e estendida até a crista occipital com o bisturi. As suturas sagitais e lambdóide foram feitas por raspagem do perióstio. Uma peça retangular da calota craniana foi retirada e a veia sagital superior, seios transversos e confluens sinuum foram expostos. A dura-máter foi cortada e a glândula pineal foi exposta abaixo do confluens sinuum e removida com fórceps fino. O procedimento foi concluído reaplicando a calota craniana no local, unindo a pele e fechando a incisão. Todo o procedimento foi concluído em 15 minutos (BURGOS, F.R.N.F., *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Encéfalos de ratos adultos que passaram por cirurgia de pinealectomia e cada um dos encéfalos



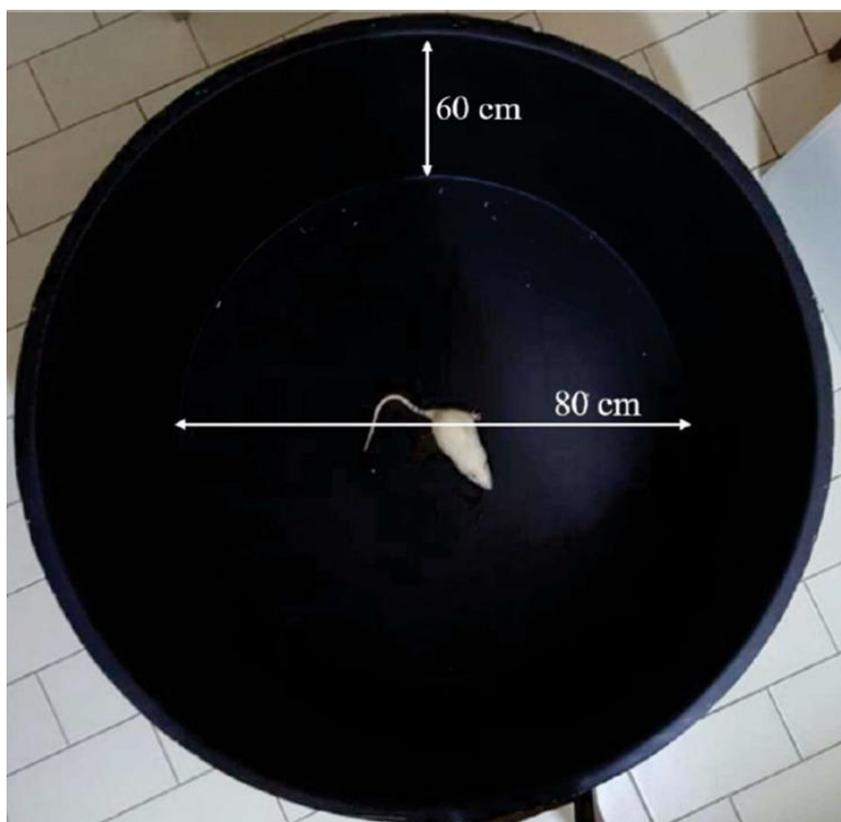
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

representa um tratamento, sendo o encéfalo (A) o grupo CTR; o encéfalo (B) o grupo SHAM e o (C), o grupo PIN. Fonte: SANTOS, Tamiris Rodrigues, 2023.

## Testes comportamentais

### Teste de campo aberto

O teste é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais, atividade locomotora e estado de ansiedade em animais experimentais. O campo aberto é um aparato circular que possui dimensões de 80 cm de diâmetro e 60 cm de altura, não possui teto e a parte interna é pintada de preto, para aumentar o contraste e favorecer o reconhecimento do animal nas gravações. Os animais foram posicionados no centro do aparato e os parâmetros observados foram: distância total percorrida e tempo no centro do aparato com exploração livre por 5 minutos. O aparato foi limpo com solução de álcool 10% após cada sessão de comportamento. Uma câmera digital ficava alojada em cima do aparato para gravar as sessões que foram registradas usando um software de rastreamento de animais (ANY-maze®, Stoelting Co, Wood Dale, IL, EUA) (SOUZA, *et al.*, 2022; SANTOS, *et al.*, 2013).



**Figura 4. Aparato de campo aberto.** Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

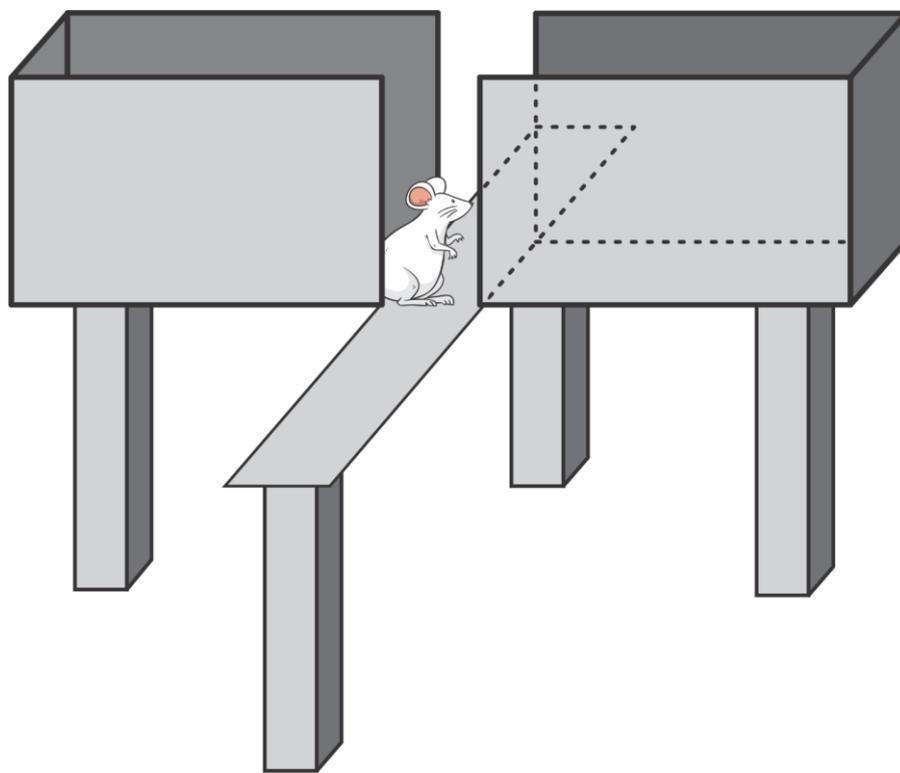


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
**Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O modelo labirinto em cruz elevado é considerado talvez o teste mais usado para avaliar o traço de ansiedade nos animais. O aparato consiste em quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados por paredes laterais, sem cobertura no teto. Os quatro braços formam uma cruz e encontram-se elevados 50 cm do solo. Os animais são colocados em um dos braços fechados e observa-se o comportamento por 5- 10 minutos. O teste baseia-se na tendência do animal em explorar o ambiente e evitar ir para o braço menos desprotegido para eles, que são braços claros e elevados, isto é, os braços abertos e ir para o lugar mais protegido, os braços escuros e fechados. O confinamento nos braços abertos induz no animal sinais fisiológicos de estresse, medo e ansiedade, uma vez que há o aumento de defecação e aumento da frequência respiratória. No teste, foram contabilizados os seguintes parâmetros: tempo nos braços fechados e tempo nos braços abertos. Com esse teste será possível avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais (CAMPOS, M.C., *et al.*, 2013; MORATO, S., 2006).

O labirinto em cruz elevado foi usado pela primeira vez por Handley e Mithani (1984) e usado para avaliação comportamental, fisiológica e farmacológica para ratos por Pellow, Chopin, File e Briley (1985). Neste teste comportamental o número de entrada do animal nos braços abertos e o tempo gasto são utilizados como parâmetros para avaliar o traço de ansiedade. Assim, quanto maior o traço de ansiedade do rato, menor o tempo gasto e o número de entrada nos braços abertos (HANDLEY, MITHANI, 1984;

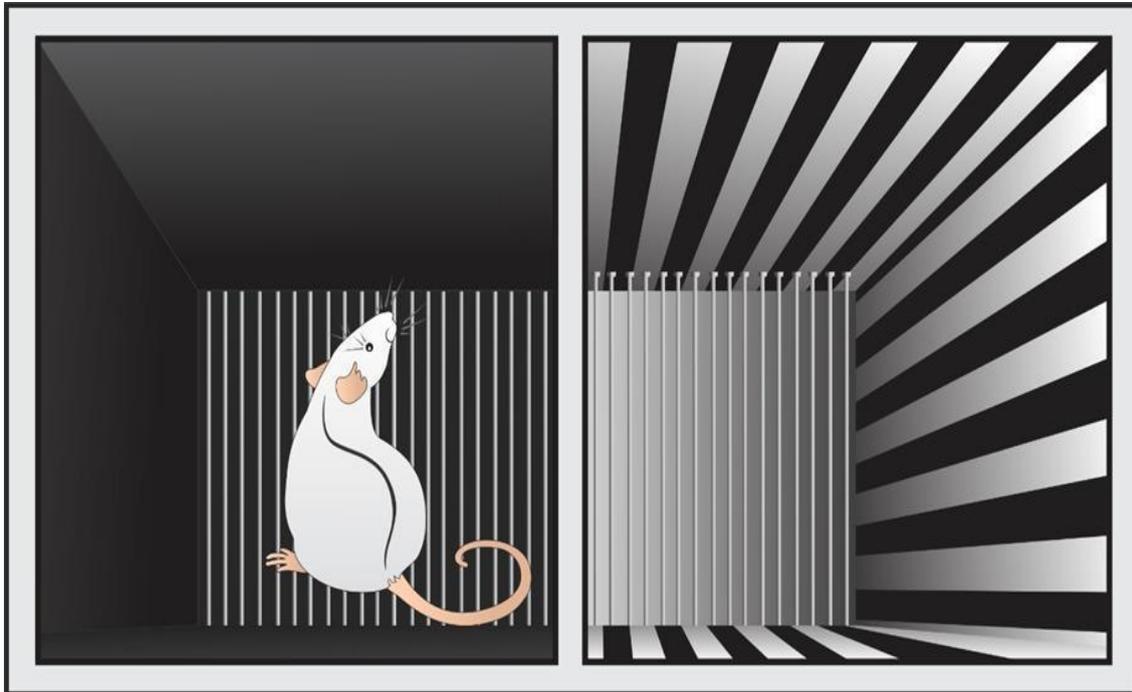
FILE, PELLOW; 1986).



**Figura 5. Aparato do labirinto em Cruz elevado.** Fonte: Acervo do Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

### **Caixa Claro Escuro**

O modelo animal de teste caixa claro escuro é baseado na aversão de inata dos animais a locais com luz forte, o teste é utilizado para avaliação do comportamento tipo ansioso dos animais. O aparato é formado por uma caixa de acrílico 40 x 20 cm. O aparato é constituído por um lado claro e outro escuro, apresentando uma abertura entre os dois compartimentos, no qual permite a passagem do animal de um lado para o outro. Para realização do teste, utiliza-se uma luz branca que incide sobre a parte clara da caixa. A luminosidade é controlada pelo luxímetro, com o valor em torno de 500-600 luxs. Os animais tendem a explorar e se esquivar de ambientes que não são familiares. O ambiente novo e a iluminação constituem o estímulo aversivo para o comportamento do animal. Ambientes altamente iluminados representam uma ameaça natural aos roedores, pois estes apresentam hábitos noturno, possuindo a tendência de explorar mais o lado escuro do aparato. Em ratos, esse modelo gera um conflito inerente entre o impulso exploratório e a evitação para permanecer no compartimento luminoso. Animais tratados com ansiolíticos tendem a passar mais tempo no compartimento claro, quando comparado a animais controles que não foram tratados. O animal é então posicionado no lado claro de frente para o lado escuro e é avaliado a latência para ele ir para o outro lado. É avaliado também o tempo que o animal fica no lado claro e a frequência de cruzamento entre os dois lados. O teste tem duração de 5 minutos, para avaliação dos parâmetros utiliza-se uma câmera acoplada ao aparato e o rastreo do animal é feito através do ANYMAZE. Ao término dos 5 minutos o aparato é limpo com álcool 10% para que não fique pistas de cheiro para o próximo animal (BOURIN, HASCOËT, 2003; CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S., 2013).



**Figura 6. Aparato da caixa claro escuro.** Fonte: Acervo do Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

### **Perfusão dos animais e Descarte do material biológico**

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina via intramuscular (I.M.) nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Com o animal completamente anestesiado com sobredose de anestésico e imobilizado, foi realizado um acesso à cavidade torácica, intracardialmente, seccionando a pele e partes moles, expondo a cavidade abdominal e fazendo-se a incisão do músculo diafragma para que o coração fique exposto. Posteriormente, foi inserida uma agulha no ápice do ventrículo esquerdo, posicionando a agulha na direção da aorta. Depois foi realizada uma pequena incisão no átrio direito. Um volume de 350 ml de solução salina 0,9% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 heparinizado 0,2% foi injetado com auxílio de uma bomba peristáltica para lavagem dos vasos por 5 minutos.

Após esta etapa, foram injetados 350 ml de uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por 10 minutos. Após a perfusão, os cérebros foram removidos através de craniotomia e mergulhados em uma solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 4°C por 24 horas. Depois deste período, os cérebros foram crioprotetidos por 48 horas em sacarose 30%, também a 4°C. Após a perfusão dos animais, as carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Departamento de Fisiologia da UFS, para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada. Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital.

### **Análises Estatísticas**

Os testes estatísticos utilizados foram bastante variados, pois o presente estudo buscou a obtenção de diferentes parâmetros a serem analisados. Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) de uma ou mais vias. Para os testes de campo aberto e caixa claro escuro foram utilizados ANOVA de uma via e para o teste de labirinto em cruz elevado, foi usado ANOVA de duas vias. As análises foram seguidas pelo pós-teste de Fisher (LSD). Foram consideradas estatisticamente significativas, diferenças quando  $P < 0,05$  e os dados são expressos em Média  $\pm$  Erro padrão da média ( $\pm$  E. P. M.). O programa usado para a realização dos testes estatísticos foi o GraphPad Prism versão 9.0 (*Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA*).

## **4. Resultados e discussões**

### **Campo Aberto**

Observou-se por meio da ANOVA de uma via para os animais com dois meses, diferença dos grupos [ $F(2,32) = 7$ ;  $P=0.0024$ ] seguido do pós-teste de Fisher (LSD). No tempo no centro, observa-se diferença significativa entre os grupos CTR e PIN ( $P=0.0007$ ); SHAM e PIN ( $P=0.0149$ ). O grupo pin passou mais tempo no centro em relação aos seus controles e o grupo pin passou menos tempo no centro quando comparados com os seus controles. Na distância total percorrida, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7).

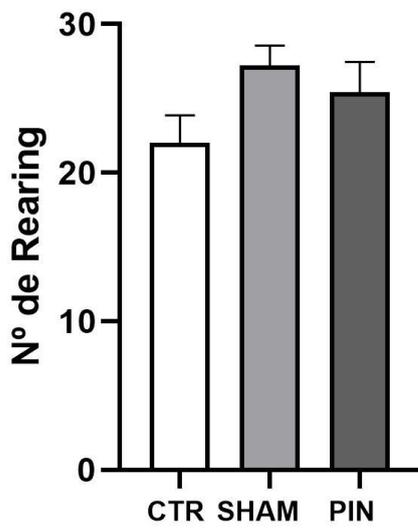
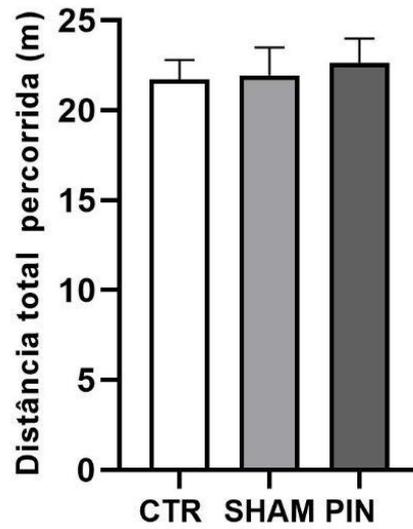
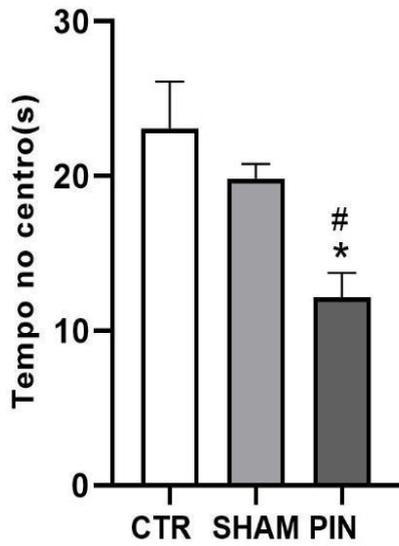
Por meio de ANOVA de uma via para os animais com quatro meses, diferença dos grupos [ $F(2,32) = 5$ ;  $P=0.012$ ] seguido do pós-teste de Fisher (LSD). No tempo no centro, observa-se diferença significativa entre os grupos CTR e PIN ( $P=0.0039$ ); SHAM e PIN ( $P=0.0491$ ). O grupo pin passou mais tempo no centro em relação aos seus controles e o grupo pin passou menos tempo no centro quando comparados com os seus controles. Na distância total percorrida, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7).

Analisando através da ANOVA de uma via para os animais com dois meses, com tratamento [ $F(2,20) = 5$ ;  $P=1.899$ ] seguido do pós-teste de Fisher (LSD). No número de rearing, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7).

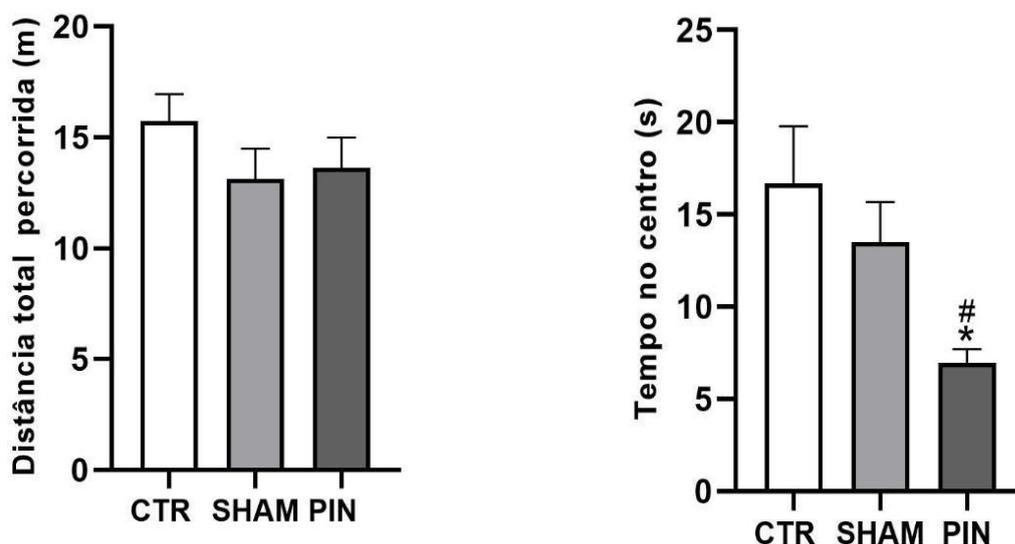


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

A)



B)



**Figura 7. Teste Campo Aberto.** A) Com dois meses foi observado uma diferença significativa do grupo PIN em relação ao grupo SHAM e o CTR em relação ao tempo no centro. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. \* $p < 0,05$  quando comparado PIN x SHAM; # $p < 0,05$  quando comparado PIN x CTL. Não teve diferença significativa no parâmetro de distância percorrida. Observa-se que não houve diferença significativa em relação ao número de rearing. B) Com quatro meses, foi observado uma diferença significativa do grupo PIN em relação ao grupo SHAM e o CTR. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. \* $p < 0,05$  quando comparado PIN x SHAM; # $p < 0,05$  quando comparado PIN x CTL. Não teve diferença significativa no parâmetro de distância percorrida. A ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher (LSD). CTR = controle; SHAM = sham; PIN = pineal.

### Labirinto em Cruz Elevado

Observou-se através da ANOVA de duas vias para os animais com dois meses o efeito de interação entre os grupos experimentais [ $F(2,40) = 10.74$ ;  $P = 0.0002$ ] e diferença dos grupos [ $F(1,40) = 101.5$ ;  $P < 0.0001$ ] seguido do pós-teste de Fisher (LSD), observa-se diferença significativa entre o CTR braço aberto e PIN braço aberto ( $P = 0.0276$ ); SHAM braço aberto e PIN braço aberto ( $P = 0.0009$ ); CTR braço fechado e PIN braço fechado ( $P = 0.0127$ ); SHAM braço fechado e PIN braço fechado ( $P = 0.0170$ ). O grupo pin passou mais tempo nos braços fechados em relação aos seus controles e o grupo pin passou menos tempo nos braços abertos quando comparados com os seus controles.

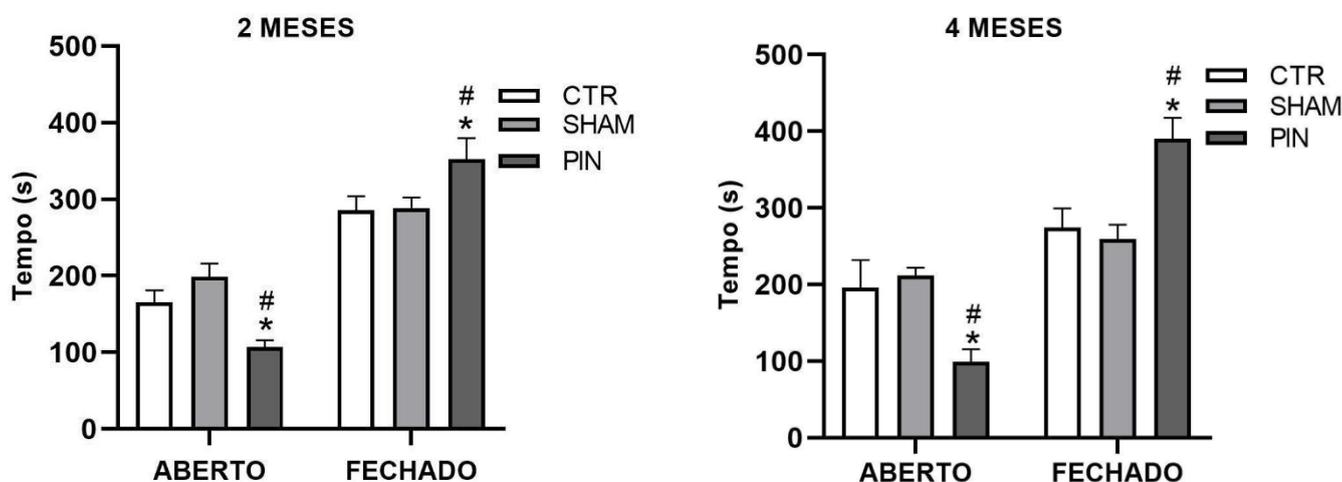
Por meio da ANOVA de duas vias para os animais com quatro meses o efeito de interação entre os grupos experimentais [ $F(2,40) = 16.61$ ;  $P < 0.0001$ ] e diferença dos



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

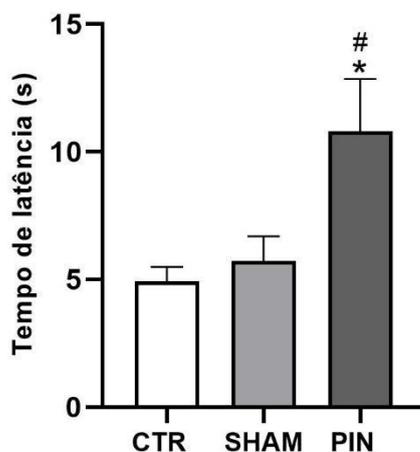
grupos [F (1,40)=50.80; P<0.0001] no pós-teste de Fisher (LSD), revelou diferença entre o CTR braço aberto e PIN braço aberto (P 0.0057); SHAM braço aberto e PIN braço aberto (P= 0.0016); CTR braço fechado e PIN braço fechado (P= 0.0012); SHAM braço fechado e PIN braço fechado (P= 0.0003). O grupo pin passou mais tempo nos braços fechados em relação aos seus controles e o grupo pin passou menos tempo nos braços abertos quando comparados com os seus controles (Figura 8).



**Figura 8. No teste de labirinto em cruz elevado**, com dois meses foi observado uma diferença significativa do grupo PIN em relação ao grupo SHAM e o CTR. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. \*p < 0,05 quando comparado PIN x SHAM; #p < 0,05 quando comparado PIN x CTR. Com quatro meses, foi observado uma diferença significativa do grupo PIN em relação ao grupo SHAM e o CTR. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. \*p < 0,05 quando comparado PIN x SHAM; #p < 0,05 quando comparado PIN x CTR. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD. CTR = controle; SHAM = sham; PIN = pineal.

### 5.3 Caixa Claro Escuro

Observou-se através da ANOVA de uma via para os animais de quatro meses a diferença dos grupos [F (2,20) = 4.709; P=0.0211]. O pós-teste de Fisher (LSD), revelou diferença significativa entre o grupo CTR e PIN (P =0.0117) e PIN e SHAM (P= 0.0266) (Figura 9).



**Figura 9.** No teste caixa claro escuro, com quatro meses, foi observado uma diferença significativa do grupo PIN em relação ao grupo CTR e SHAM. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. # $p < 0,05$  quando comparado PIN x CTR e \* $p < 0,05$  quando comparado PIN x SHAM. A ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher (LSD). CTR = controle; SHAM = sham; PIN = pineal.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência no comportamento tipo-ansioso de ratos adultos induzidos pela supressão de melatonina na juventude. Desse modo, existem vários testes descritos na literatura para medir esses comportamentos em roedores de laboratório (LISTER, 1990) que foram validados com base na semelhança relativa das respostas comportamentais, fisiológicas e farmacológicas frente a situações ameaçadoras em roedores e seres humanos (PELLOW, *et al.*, 1985; LISTER, 1990). Neste trabalho, foi possível observar o comportamento tipo-ansioso nos animais quando submetidos a três testes comportamentais (Labirinto em cruz elevado; Campo aberto e Caixa claro-escuro).

O teste labirinto em cruz elevado (LCE), é um instrumento confiável e valioso utilizado primeiramente para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em roedores, a compreensão das bases biológicas relacionadas à aprendizagem e memória, dor, hormônios, a vários subtipos de transtorno de ansiedade investigando aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (HALLER & ALICKLI, 2012; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; PELLOW, *et al.*, 1986).

No teste de labirinto em cruz elevado no parâmetro de tempo de permanência nos braços, observou-se que após a cirurgia, com dois meses, os animais do grupo pineal passam menos tempo no braço aberto quando comparados com o grupo controle e sham.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Além disso, pode-se avaliar que os animais passam mais tempo no braço fechado quando comparados com o seu controle e sham.

Esses dados demonstram uma alteração no comportamento tipo-ansioso de ratos na juventude e a ansiedade continua na fase adulta quando os animais já estão com quatro meses, uma vez que os animais do grupo pineal passam menos tempo no braço aberto quando comparados com o grupo controle e sham e os animais do grupo pineal passam mais tempo no braço fechado quando comparados com o seu controle e sham.

Dessa forma, esses resultados estão de acordo com os dados vistos na literatura onde apontam que os animais com comportamento tipo-ansioso tendem a ficar mais no braço fechado que para eles é protegido, do que explorar o braço aberto que para eles é desprotegido. Esses resultados são similares aos obtidos em outros estudos (WALL & MEISSER, 2001) segundo os autores, os animais permanecem mais no braço fechado pois está relacionado a uma resposta defensiva entre o conflito de exploração em relação ao braço aberto.

No trabalho de (PELLOW, *et al.*, 1985) eles demonstraram que ao explorar espontaneamente o aparato de labirinto em cruz elevado na ausência de um reforço explícito, os ratos entravam menos e permaneciam por menos tempo nos braços abertos, quando comparado aos braços fechados, indicando o caráter aversivo dos braços abertos no aparato. O teste no LCE é considerado um modelo animal incondicionado, por envolver a exploração espontânea do ambiente e por envolver situações etologicamente aversivas ao animal. Entretanto, alguns comportamentos aprendidos ocorrem e influenciam o desempenho durante o teste, gerando um aumento gradual do comportamento de evitar o compartimento aversivo (braços abertos) e a decisão de permanecer no local mais seguro (braços fechados). Assim, é possível dizer que o LCE envolve a combinação de mecanismos aversivos condicionados, inatos, proximais e distais, de tal forma que sinais detectados à distância atuam como estímulo aversivo, mantendo o animal distante dos braços abertos (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

Em relação ao teste de campo aberto, foi utilizado pela primeira vez por Calvin Hall, quando ele criou o teste com o objetivo de avaliar o comportamento exploratório dos animais (AUGUSTSSON, *et al.*, 2004). Dessa maneira, pode-se afirmar que os resultados do teste de campo aberto nesse trabalho corroboram com os estudos realizados na literatura, uma vez que é observado o comportamento tipo-ansioso dos animais com dois meses, pois os animais do grupo pineal passam mais tempo na periferia e menos tempo no centro quando comparados com o grupo controle e sham que ficam menos tempo na



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

periferia e mais tempo no centro. Com quatro meses é reforçado novamente o comportamento tipo-ansioso, demonstrado que os animais do grupo pineal passam mais tempo na periferia e menos tempo no centro quando comparados com o grupo controle e sham que ficam menos tempo na periferia e mais tempo no centro.

Assim, os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia (PRUT, *et al.*, 2003). Em relação a distância total percorrida, é visto que não tem diferença significativa entre os grupos, mas esses dados mostram que os animais após a cirurgia de pinealectomia não tiveram comprometimento na atividade locomotora. Além disso, observa-se que não teve diferença significativa no número de rearing para os animais com dois meses, esse resultado mostra que a cirurgia de pinealectomia não afetou o comportamento exploratório nem a atividade locomotora, esses dados corroboram os achados da literatura (TCHEKALAROVA, *et al.*, 2016).

De acordo com os trabalhos (LISTER, 1990; CHOLERIS, *et al.*, 2001) tem sido proposto o emprego do teste para verificar comportamento tipo-ansioso, considerando-se que um aumento na ambulação do animal e maior permanência dele na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade, uma vez que o teste de campo aberto, tornou-se usado em trabalhos que avaliem o comportamento exploratório e o comportamento tipo-ansioso, considerando-se que um aumento na ambulação do animal indica redução de fatores estressantes (CHOLERIS, *et al.*, 2001; LISTER, 1990).

Referente ao teste caixa claro escuro, é um dos testes mais utilizados para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais. Para CRAWLEY E GOODWIN (1980), o teste se baseia na aversão natural dos ratos para áreas iluminadas brilhantemente e em seu comportamento espontâneo exploratório em ambientes novos. Assim, os resultados da literatura estão de acordo com os dados obtidos com o teste, uma vez que os animais do grupo pineal demoram mais para iniciar o tempo de latência no lado claro para o escuro quando comparados com os animais sham e controle passaram que demoram menos tempo para iniciar o movimento de latência do lado claro para o escuro.

## 5. Conclusões

No presente estudo, foi observado que a retirada da glândula pineal causou aumento do comportamento tipo ansioso em ratos Wistar, sem prejudicar o comportamento exploratório dos animais.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

## 6. Perspectivas

Para as perspectivas futuras do trabalho, pretende-se realizar análises neuroquímicas, por meio de imuno-histoquímica, para posteriormente observar as alterações plásticas com a supressão do hormônio.

## 7. Referências bibliográficas

AGUIAR, L. M. V. A. Efeitos comportamentais e neuroquímicos da melatonina em ratos submetidos à lesão estriatal com 6-ohda. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BENARROCH, E. E. Suprachiasmatic nucleus and melatonin Reciprocal interactions and clinical correlations. **Neurology**, 2008, pp. 594–598.

BOURIN, M., HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, 2003.

BURGOS, F.R.N.F.; LIMA, J.L.S.; ALMEIDA, E.L.; SANTOS, L.G.P.; SILVA, J.V.A. Pinealectomy in Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*): Description of a new surgical method. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2016, pp. 2-8.

CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** 2013, pp. 2-11.

CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev.** 2005;

CASTILLO, A.R.G.L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F.R.; MANFRO, G.G. Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** 2000, pp. 1-4.

CRAWLEY J, GOODWIN FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** 1980, pp. 167-70.

CHOLERIS, E., THOMAS, A.W., KAVALIERS, M., & PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2001, pp. 235-260.

ETKIN, A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. *Curr Top Behav Neurosci*, 2010, pp. 77-251.

FOSTER, R. G., & HANKINS, M. W. Circadian vision. *Current Biology*, 2007, pp. 746–751.

HALLER, J., & ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Current Opinion*. 2012, pp. 59-64.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of „fear “-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*. 1984, pp. 1-5.

HUANG, F.; YANG, Z.; LIU, X.; LI, C. Melatonin facilitates extinction, but not acquisition or expression, of conditional cued fear in rats. *BMC Neuroscience*. v. 15, 2014.

LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.* 1990, pp. 321-340.

MARONDE, E., & STEHLE, J. H. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2007, pp. 142–149.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicol. USP*. v.17, n. 4, 2006.

MOORE, R. Y. Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research*, 1996, pp. 125–130.

PANDI-PERUMAL, S.R; TRAKHT, I; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D.W; MAESTRONI, G.J; ZISAPEL, N. Efeitos fisiológicos da melatonina: papel dos receptores de melatonina e vias de transdução de sinal. *Progresso em Neurobiologia*. 2008, pp. 335–

353.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 1986, pp. 9-525.

REPOVA K, BAKA T, KRAJCIROVICOVA K, STANKO P, AZIRIOVA S, REITER RJ,

SIMKO F. Melatonina como uma abordagem potencial para o tratamento da ansiedade. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, 2022, pp. 23-24.

POZA, J.J.; PUJOL, M.; ORTEGA-ALBÁS, J.J; ROMERO, O. Melatonina nos distúrbios do sono. **Neurologia**. 2022, pp. 37-575.

RIBELAYGA, C., PÉVET, P., & SIMONNEAUX, V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2000.

SANTOS, J. R. *et al.*, Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, 2013, pp. 68–77.

SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol Ver**, 2003, pp. 325-395.

SILVA, S. DE O. Oxidação de melatonina e formação de N1-acetil-N2-formil-5 - metoxiquinuramina, possíveis efeitos biológicos. (Tese de Doutorado) **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil**, 2005.

SILVA, A.L.P. O tratamento da ansiedade por intermédio da acupuntura: um estudo de caso. **Psicol Ciênc Prof**, 2010, pp. 3-12.

SOUZA, M. F.; MEDEIROS, K. A. A. L.; LINS, L.C.R.F; BISPO, J.M.M.; GOIS, A. M.; SANTOS, E. R.; ALMEIDA-SOUZA, T. H.; MELO, J. E. C.; FRANCO, H. S.; SILVA, R. S.; PEREIRA-FILHO, E. A.; FREIRE, M. A.; SANTOS, J. R. Motor, memory, and anxiety-like behavioral impairments associated with brain-derived neurotrophic factor and dopaminergic imbalance after inhalational exposure to deltamethrin. **Brain Research Bulletin**, 2022, v. 181, pp. 55–64.

TCHEKALAROVA, J.; NENCHOVSKA, Z.; ATANASOVA, D.; ATANASOVA, M.; KORTENSKA, L.; STEFANOVA, M.; ALOVA, L.; LAZAROV, N. Consequences of longterm treatment with agomelatine on depressive-like behavior and neurobiological abnormalities in pinealectomized rats. **Behavioural Brain Research**, 2016, pp. 11–28.

TCHEKALAROVA, J.; NENCHOVSKA, Z.; KORTENSKA, L.; UZUNOVA, V.; GEORGIEVA, I.; TZONEVA, R. Impact of Melatonin Deficit on Emotional Status and Oxidative Stress-Induced Changes in Sphingomyelin and Cholesterol Level in Young Adult, Mature, and Aged Rats. **Int. J. Mol. Sci.** 2022.

VOLLRATH, L. The Pineal Organ. Mollendorff WaB, W., editor. Heildberg, Germany: **Springer-Verlag**. 1981. pp. 659.

WALL, P.M. E G. MESSIER. Questões metodológicas e conceituais no uso do labirinto em cruz elevado como um instrumento de medição psicológica do comportamento animal ansioso. **Neuroscience and Biobehavior Review**, 2001, pp. 275-286.

## 8. Outras atividades

Participação em minicursos, palestras, reuniões semanais do laboratório, monitoria. Além disso, participação em outros experimentos de pesquisa.