



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ANA CLEIA ALVES DA LUZ

EFEITOS DA PINEALECTOMIA NA PLASTICIDADE
NEURONAL: IMPACTO NO COMPORTAMENTO TIPO-
ANSIOSO E NA MEMÓRIA DE RATOS

Orientadora: Profa. Dra. Katty Anne
Amador de Lucena Medeiros

Coorientador: Dr. José Ronaldo dos
Santos

SÃO CRISTOVÃO- SE

2024

ANA CLEIA ALVES DA LUZ

**EFEITOS DA PINEALECTOMIA NA PLASTICIDADE
NEURONAL: IMPACTO NO COMPORTAMENTO TIPO-
ANSIOSO E NA MEMÓRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal
de Sergipe como requisito à obtenção
do grau de mestre em Ciências
Fisiológicas

**Orientadora: Profa. Dra. Katty Anne
Amador de Lucena Medeiros**

**Coorientador: Dr. José Ronaldo dos
Santos**

SÃO CRISTOVÃO-SE

2024

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

L979e Luz, Ana Cleia Alves da
Efeitos da pinealectomia na plasticidade neuronal : impacto no comportamento tipo-ansioso e na memória de ratos / Ana Cleia Alves da Luz ; orientadora Katty Anne Amador de Lucena Medeiros. – São Cristóvão, SE, 2024.
80 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Melatonina. 2. Ansiedade. 3. Memória. 4. Plasticidade. I. Medeiros, Katty Anne Amador de Lucena, orient. II. Título.

CDU 612.821.2.018

ANA CLEIA ALVES DA LUZ

**EFEITOS DA PINEALECTOMIA NA PLASTICIDADE NEURONAL:
IMPACTO NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E NA MEMÓRIA
DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
da Universidade Federal de Sergipe como
requisito à obtenção do grau de mestre em
Ciências Fisiológicas

**Orientadora: Profa. Dra. Katty Anne
Amador de Lucena Medeiros**

Coorientador: Dr. José Ronaldo dos Santos

Presidente da Banca: Dra. Katty Anne Amador de Lucena Medeiros

Prof. ^a. Dra. Jéssica Maria Dantas Araújo Aragão

Prof. Dr. Luís Felipe Souza da Silva

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho em especial a minha irmã Ângela Maria (in memoriam), por sempre acreditar em mim e pelo orgulho que ela sentia em saber que eu estava em uma Universidade Federal. Aos meus pais, Maria e Ailton, que mesmo sem entender minha trajetória na ciência, me apoiam e ficam felizes por mim. E também aos meus pais científicos, Ronaldo e Katty. Especialmente à Katty, por ser minha inspiração na ciência, alicerçando na minha trajetória acadêmica e exemplo de inspiração como mulher”.

EPÍGRAFE

“Eu posso ir muito além de onde estou”

Fábio de Melo

AGRADECIMENTOS

A grande jornada do mestrado está sendo concluída, e aqui deixo os meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram, seja de forma direta ou indireta. Para que este trabalho chegasse ao fim, foi necessário o esforço de muitas pessoas ao longo do caminho, tornando a caminhada mais leve.

Começo agradecendo primeiramente a Deus e as forças do universo que me guiaram ao longo dessa trajetória. Sempre carreguei comigo a fé de que os dias difíceis sempre vamos superar e os dias bons chegarão para nos alegrar. Foi essa fé que nunca me fez desistir, mesmo quando o caminho se tornou difícil e as dúvidas e incertezas começaram a querer ocupar um lugar maior nos meus pensamentos.

Agradeço a mim, por nunca ter desistido, mesmo quando bate o cansaço e o desespero, e um turbilhão de pensamentos começam a surgir, será que sou capaz? Será que vou conseguir? Um dia de cada vez e tudo vai ocorrendo no tempo certo. Agradeço por estar viva contando essa história, pois no dia 14 de junho de 2022, quando sai daquela prova de fisiologia que por sinal era a última prova do primeiro semestre de uma mestranda cheia de sonhos pela frente, fui parar direto na urgência do João Alves com um quadro de apendicite. Naquele momento cheguei a pensar que, não sairia dali bem para continuar minha jornada. Mas, graças ao SUS, e as pessoas incríveis que estiveram comigo, consegui vencer. E hoje estou aqui na reta final, com muita gratidão por tudo que passei e vivenciei.

Agradeço a meus pais Maria e Ailton, sem eles eu não seria nada. Minha mãe sempre será a minha maior inspiração de força e coragem. Assim como o meu pai, que sempre desde que eu era pequena me ensinou valores importantes sobre a vida. Hoje sou essa pessoa graças a vocês.

Agradeça a minhas irmãs Susana e Solange por sempre serem parceiras e grandes amigas, sei que é difícil pra vocês entenderem essa minha rotina, afinal, somente eu segui na carreira acadêmica. Mesmo assim, vocês sempre estão comigo. Agradeço a meu irmão Nilson, que além de irmão sempre cuidava de mim como um pai, sempre conselheiro e presente em todos os passos de minha vida. Meu irmão caçula, Samuel, o gênio da tecnologia que sempre me salva quando preciso.

E aqui, deixo um agradecimento especial a minha irmã Ângela Maria (*in memória*). Queria nesse momento estar te agradecendo pessoalmente, mas a vida tem um jeito estranho de mudar o destino. Era você que na minha infância me arrumava para os primeiros dias de aula na escola e cuidava de mim com muito amor. Os anos passaram e aquela menininha cresceu, mas você continuou cuidando e quando entrei na UFS, foi motivo de muita alegria. Você sempre teve muito orgulho de mim e eu de você. Você partiu tão depressa, mas deixou muitos aprendizados. Carrego você eternamente em minhas memórias.

Agradeço todo apoio da minha cunhada Josilene, que desde a minha infância sempre foi muito preocupada e prestativa comigo em relação a educação. Agradeço minhas duas joias raras que são as minhas sobrinhas Júlia e Myllena. Vocês são alegria e gritaria, e juntas vocês transbordam amor, conseguem ser calma e furacão na vida da tia ao mesmo tempo. Sou muito grata pela vida de vocês e por vocês tirarem os melhores sorrisos de mim.

Agradeço as minhas amigas Samyre, Mirelly e Kauana pelos momentos de descontração que tornam a caminhada mais leve. E em especial Kauana que está comigo nos momentos bons e ruins sempre, se tornou muito mais que uma amiga, como sempre te falo que você é minha irmã de alma. E também agradeço a meu amigo Davi (*in memória*), por sempre ter me apoiado nos estudos, sempre com muitas perguntas e curiosidades sobre o meu projeto, e sempre acreditando que eu chegaria e alcançaria meus objetivos.

Agradeço a minha sogra (Selma) e meu sogro (Laercio) por cuidarem de mim como uma filha e por sempre acreditarem em mim e pelo incentivo para nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço a meu cunhado Laedson pela paciência de sempre me ouvir falando sobre ratos e sobre ciência e pela troca de informações que é sempre bom.

Agradeço a meu esposo Leandro, por todo apoio e parceria de sempre. Por sempre me ajudar nos momentos difíceis e quando estou surtando ele consegue resolver todos os problemas. Agradeço por me apoiar e também por toda ajuda durante os trabalhos desenvolvidos no laboratório. Sua companhia torna a caminhada mais feliz, até nos meus piores dias de humor, você consegue arrancar os melhores sorrisos. Obrigada por tudo!

E aqui início meus agradecimentos a minha segunda casa (UFS), que me acolheu durante esses anos e ainda tenho muita história pela frente. Foi aqui que pude conhecer pessoas incríveis que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente, e uma dessas pessoas é o

professor José Ronaldo (o chefe). Ronaldo me acolheu no seu laboratório, por volta do meu quarto período de Biologia, e desde então aprendi muito sobre neurociência com ele, afinal a mente dele é brilhante. Ele sempre tem as melhores soluções, mesmo quando chegamos desesperados. Ronaldo, se tornou um pai científico e um grande amigo também. Acolhe os seus alunos com muito respeito e dedicação. Obrigada, chefe, por todos os ensinamentos sobre ciência e sobre a vida.

Agradeço a minha mãe científica, Katty Anne, na qual fui agraciada e privilegiada por ser orientada por ela. Ela que me lança vários desafios e eu aceito todos, morrendo de ansiedade, mas vou, por que sei que ela vai estar sempre me guiando. Katty é sinônimo de inspiração, força e garra, exemplo de mulher na ciência a se seguir. Obrigada por todos os ensinamentos e contribuições. Agradeço também pelos cuidados como enfermeira, em um dos momentos difíceis da minha vida.

Agradeço, também, ao professor Auderlan, por todo apoio e ajuda, principalmente na reta final, com a técnica de imuno-histoquímica e por sempre ser tão solícito.

Agradeço a todos que fazem parte do laboratório de neurobiologia comportamental e evolutiva (LaNCE), aprendi e continuarei aprendendo com todos vocês. Somos mais que uma equipe de trabalho, somos família.

Agradeço a Edson Rezende, por ter sido um excelente coorientador durante a iniciação científica, grande parte dos seus ensinamentos foram excepcionais durante o mestrado.

Quero deixar aqui os meus sinceros agradecimentos à equipe que estive comigo desde o início desse projeto. Meu esposo e parceiro de trabalho no qual realizou grande parte das cirurgias comigo e sempre me socorreu em tudo, desde testes comportamentais, estatística, dados, tecnologia e muito mais. Carlos e Tamiris no qual tive a experiência de coorientar vocês, e foi muito gratificante poder ensinar e também aprender com vocês. Sempre estiveram comigo em todas as etapas. Agradeço a Margarida (Cássia), que já chegou no laboratório e de cara já foi trabalhar comigo, sempre muito disposta a aprender e ajudar em tudo que estivesse a seu alcance. Agradeço também pelo fato de ter sido tão amiga e conselheira nessa reta final.

Agradeço a Mylaine por toda a ajuda ao longo dos experimentos, por ter sido parceira de turma durante as disciplinas obrigatórias, tantas idas e voltas no ônibus da associação contando histórias pra o tempo passar. E tenho minha eterna gratidão pelos socorros que você

me prestou naquele último dia de aula do primeiro semestre, quando fui parar na urgência do João com apendicite. Agradeço a Geovanio por toda ajuda suturando os animais na cirurgia. Meu amigo Abraão, agradeço também por toda ajuda. Agradeço a João Melo, por sempre socorrer quando precisávamos de algo de São Cristóvão, ele sempre esteve ali presente disposto a ajudar e socorrer.

Agradeço a Heitor por toda ajuda e suporte durante os experimentos, me socorreu com a caixa de medo condicionado e com o any maze, sempre disposto a ajudar no que fosse preciso. E também agradeço pelos sábios conselhos, se mostrando um grande amigo.

Agradeço a Cézar, aluno de iniciação que chegou a pouco tempo, mas já se mostrou solícito para aprender e ajudar na reta final da imuno, montando as lâminas. Agradeço também a Micaelle, por ter se mostrado tão solícita nessa reta final, me ajudando com as lâminas, mesmo estando na correria do seu experimento.

Meus agradecimentos a professora Dra. Julyana Quintans, por ter me recepcionado tão bem no seu laboratório para que eu pudesse fazer o corte dos encéfalos. E agradeço a Thiago Henrique que fez essa ponte para que eu pudesse falar com Juliana.

Agradeço a professora Dra. Alessandra Ribeiro e a professora Dra. Regina, por sempre fazerem doações para o laboratório, ajudando-nos com reagentes para que pudéssemos desempenhar as técnicas desenvolvidas no laboratório.

Agradeço a toda coordenação do programa de Ciências Fisiológicas, como também ao corpo docente que sem dúvida alguma contribuíram de forma positiva para minha formação. Meus agradecimentos ao professor Enilton, professor Daniel Badauê, professora Patrícia, professora Renata e a todos os demais que forma tão importantes nessa trajetória.

Meus agradecimentos a banca PROASA, que contribuiu ao longo do meu mestrado com sugestões que foram enriquecedoras para o trabalho.

Por fim, deixo meus agradecimentos e respeito aos animais utilizados nas pesquisas científicas, sem eles nada teria sido possível.

Agradeço a agência de financiamento CAPES, pelo apoio financeiro!

RESUMO

A melatonina é um hormônio, produzido principalmente pela glândula pineal, atuando em vários processos fisiológicos. Destacando o papel desempenhado nos fenômenos de plasticidade no hipocampo, memorização e regulação do humor. **Objetivos:** Investigar os efeitos das alterações de plasticidade induzidas pela pinealectomia e como essas alterações podem interferir no comportamento tipo ansioso e na memória de ratos. **Métodos:** O estudo foi desenvolvido com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFS (Nº 3490280722). Utilizou-se 54 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar. Os animais foram divididos: Controle memória (CTR-MM); Sham memória (SHAM-MM); Pinealectomizado memória (PIN-MM); Controle ansiedade (CTR-ANS); Sham ansiedade (SHAM-ANS); Pinealectomizado ansiedade (PIN-ANS). Os animais passaram por cirurgia estereotáxica e posteriormente foi feita avaliação comportamental e imunohistoquímica do cérebro. **Resultados:** No teste de campo aberto, os animais com dois meses de idade do grupo PIN passaram menos tempo no centro do aparato comparados ao CTR e SHAM. O grupo PIN, com quatro meses de idade permaneceu menos tempo no centro quando comparado com o CTR e SHAM. No teste de labirinto em cruz elevado, o grupo PIN-ANS, com dois meses permaneceu menos no braço aberto comparado com o CTR-ANS e SHAM-ANS. O grupo PIN-ANS permaneceu mais tempo no braço fechado comparado com o CTR-ANS e SHAM-ANS. Com quatro meses, os animais do grupo PIN-ANS permaneceram menos tempo no braço aberto comparado com CTR-ANS e SHAM-ANS. No braço fechado, o grupo PIN-ANS permaneceu mais tempo comparado com CTR-ANS e SHAM-ANS. No labirinto em cruz elevado modificado PIN-MM permaneceu menos no braço seguro comparado com o CTR-MM e SHAM-MM. O grupo PIN-MM permaneceu mais tempo no braço aversivo comparado com o CTR-MM e SHAM-MM. No medo condicionado ao contexto na fase de condicionamento houve aumento no tempo de congelamento do PIN-MM comparado com o CTR-MM. No mesmo teste, o PIN-MM apresentou um aumento no tempo de congelamento comparado com o CTR-MM e SHAM-MM. Na imuno-histoquímica para BDNF houve redução na densitometria na região CA1, comparado com o CTR. No experimento de memória foi observado aumento de BDNF nas regiões CA1; CA3; giro denteado; córtex entorrinal e amígdala, com os seus controles. Conclui-se que a pinealectomia foi capaz de causar alterações no comportamento tipo-ansioso e na memória de ratos, assim como alterações de plasticidade.

Palavras-chaves: Melatonina; ansiedade; memória; plasticidade

ABSTRACT

Melatonin is a hormone, produced mainly by the pineal gland, which acts in various physiological processes. In particular, it plays a role in the phenomena of plasticity in the hippocampus, memorization and mood regulation. **Objectives:** To investigate the effects of plasticity alterations induced by pinealectomy and how these alterations may interfere with anxiety-like behavior and memory in rats. **Methods:** The study was carried out with the approval of the UFS Animal Use Ethics Committee (Nº 3490280722). Fifty-four male Wistar rats were used. The animals were divided into: Memory control (CTR-MM); Memory sham (SHAM-MM); Memory pinealectomized (PIN-MM); Anxiety control (CTR-ANS); Anxiety sham (SHAM-ANS); Anxiety pinealectomized (PIN-ANS). The animals underwent stereotactic surgery and subsequently behavioral and immunohistochemical evaluation of the brain was performed. **Results:** In the open field test, the two-month-old animals in the PIN group spent less time in the center of the apparatus compared to CTR and SHAM. The four-month-old PIN group spent less time in the center compared to CTR and SHAM. In the elevated cross maze test, the two-month-old PIN-ANS group spent less time in the open arm compared to CTR-ANS and SHAM-ANS. The PIN-ANS group remained longer in the closed arm compared to CTR-ANS and SHAM-ANS. At four months, the animals in the PIN-ANS group spent less time in the open arm compared to CTR-ANS and SHAM-ANS. In the closed arm, the PIN-ANS group stayed longer compared to CTR-ANS and SHAM-ANS. In the modified elevated cross maze PIN-MM stayed less in the safe arm compared to CTR-MM and SHAM-MM. The PIN-MM group remained longer in the aversive arm compared to CTR-MM and SHAM-MM. In the context-conditioned fear in the conditioning phase, there was an increase in the freezing time of PIN-MM compared to CTR-MM. In the same test, PIN-MM showed an increase in freezing time compared to CTR-MM and SHAM-MM. Immunohistochemistry for BDNF showed a reduction in densitometry in the CA1 region compared to CTR. In the memory experiment, an increase in BDNF was observed in the CA1; CA3; dentate gyrus; entorhinal cortex and amygdala regions, with their controls. It is concluded that pinealectomy was capable of causing alterations in the anxiety-like behavior and memory of rats, as well as alterations in plasticity.

Keywords: Melatonin; anxiety; memory; plasticity

RESUMO PARA A SOCIEDADE

A sociedade moderna tem sido alvo da exposição excessiva à luminosidade, seja ela ambiental e principalmente artificial. Com os avanços tecnológicos e a necessidade de se expor cada vez mais a esses meios, por necessidade de trabalhos noturnos e até mesmo várias horas na frente de telas de computador e celular, prática comum observada principalmente no público infantil e juvenil. A exposição crônica a luminosidade é capaz de causar alterações no nosso sistema circadiano, responsável por regular e detectar informações que vem do meio externo, diferenciando o dia, da noite. A regulação do ciclo claro-escuro ocorre devido a produção do hormônio melatonina, que é uma substância química, produzida por uma estrutura presente no cérebro, chamada de glândula pineal. Este hormônio atua regulando vários mecanismos fisiológicos importantes para a sobrevivência do indivíduo. Sua produção ocorre a noite na ausência de estímulos luminosos, ou seja, a presença de luz é o principal fator inibidor da produção deste hormônio. A diminuição da síntese de melatonina, pode resultar em alterações do sono, alterações do sistema imunológico, diminuição da capacidade de aprendizagem e memorização e também distúrbios de ansiedade. Atualmente observamos um número crescente de adolescentes e adultos com transtornos de ansiedade, depressão e problemas de aprendizagem, comprometendo a qualidade de vida. Estes problemas podem ser resultado de alterações na produção da melatonina, devido a uma frequente exposição à luminosidade. Os modelos de experimentação com animais são uma excelente ferramenta para compreensão de como as alterações na produção da melatonina, pode resultar em comprometimento de memória e ansiedade, uma vez que estudos com roedores possibilitam a execução de técnicas como a pinealectomia (retirada da glândula pineal), resultando na diminuição do hormônio melatonina. Nosso estudo observou que ratos machos, pinealectomizados na infância, apresentaram comprometimento de memória e alterações do comportamento tipo-ansioso na juventude e na fase adulta, observadas a partir da utilização de testes comportamentais que visaram avaliar alterações de memória e comportamento ansiogênico. Desta forma, concluímos que a diminuição da melatonina na infância é capaz de alterar o funcionamento do cérebro, causando alterações de memória e ansiedade na fase juvenil e adulta.

ABSTRACT FOR SOCIETY

Modern society has been subjected to excessive exposure to light, both environmental and artificial. With technological advances and the need to be exposed to these media more and more, due to the need to work nights and even several hours in front of computer and cell phone screens, this is a common practice, especially among children and young people. Chronic exposure to light can cause changes in our circadian system, which is responsible for regulating and detecting information from the external environment, differentiating day from night. The regulation of the light-dark cycle occurs due to the production of the hormone melatonin, which is a chemical substance produced by a structure in the brain called the pineal gland. This hormone acts by regulating various physiological mechanisms that are important for the survival of the individual. It is produced at night in the absence of light stimuli, i.e. the presence of light is the main factor inhibiting the production of this hormone. A decrease in melatonin synthesis can result in sleep disorders, changes to the immune system, a decrease in learning and memorization capacity and anxiety disorders. We are currently seeing a growing number of adolescents and adults with anxiety disorders, depression and learning problems, compromising their quality of life. These problems may be the result of alterations in melatonin production due to frequent exposure to light. Animal experimentation models are an excellent tool for understanding how changes in melatonin production can result in memory impairment and anxiety, since studies with rodents make it possible to perform techniques such as pinealectomy (removal of the pineal gland), resulting in a decrease in the melatonin hormone. Our study found that male rats, pinealectomized in infancy, showed memory impairment and changes in anxiety-like behavior in youth and adulthood, observed through the use of behavioral tests aimed at assessing changes in memory and anxiety-like behavior. We therefore conclude that a decrease in melatonin in childhood is capable of altering brain function, causing changes in memory and anxiety in youth and adulthood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema resumido da via de biossíntese da melatonina.....	4
Figura 2. Sinalização da melatonina em receptores de membrana acoplados a proteína G, receptor citosólico e receptor nuclear.....	7
Figura 3. Representação esquemática da potenciação de longa duração (LTP)	20
Figura 4. Representação esquemática da depressão de longa duração.....	21
Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental.....	29
Figura 6- Representação da incisão cirúrgica para remoção da glândula pineal.	30
Figura 7. Representação dos encéfalos com base nos grupos experimentais.	31
Figura 8. Aparato de campo aberto.....	32
Figura 9. Aparato do labirinto em Cruz elevado.....	33
Figura 10. Aparato para realização do teste comportamental labirinto em cruz elevado modificado.....	34
Figura 11. Aparato para avaliação do medo condicionado ao contexto.....	35
Figura 12. Avaliação da distância total percorrida com dois (A) e quatro meses (B).....	39
Figura 13.....	40
Figura 14. Avaliação do tempo de permanência no braço aberto e no braço fechado com dois (A) e (B) quatro meses no teste de labirinto em cruz elevado.	41
Figura 15. Avaliação do tempo permanência no teste do labirinto cruzado elevado modificado.....	43
Figura 16. Avaliação do tempo de freezing no teste de medo condicionado ao contexto durante as fases de pré-condicionamento, condicionamento e teste.....	44
Figura 17. Efeito da pinealectomia nas alterações de plasticidade avaliadas pela densidade óptica relativa para BDNF nas regiões CA1 (A); CA3 (B); giro denteado (C); córtex entorrinal (D) e amígdala (E), após exposição a um ambiente enriquecido.	46
Figura 18. Imagens representativas da imunomarcção para BDNF nas regiões CA1, CA3, giro denteado, córtex entorrinal e amígdala	46
Figura 19. Efeito da pinealectomia nas alterações de plasticidade avaliadas pela densidade óptica relativa para BDNF nas regiões CA1 (A); CA3 (B); giro denteado (C); córtex entorrinal (D) e amígdala (E), após exposição a um protocolo de medo condicionado ao contexto..	47
Figura 20. Imagens representativas da imunomarcção para BDNF nas regiões CA1, CA3, giro denteado, córtex entorrinal e amígdala	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-TH- 5-hidroxitriptamina

Arc- Proteína do citoesqueleto regulada por atividade

AC- Amígdala central

AT1- Receptor de angiotensina tipo 1

ACTH- Hormônio adrenocorticotrófico

AMPC- Monofosfato cíclico de adenosina

AANAT- Arilalquilamina-N-acetiltransferase

ANOVA- Análise de variância

ASMT- Acetilserotonina-O-metiltransferase

ATP- Trifosfato de adenosina

AMPA- Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

BA- Núcleo basal

BNST- Núcleo intersticial da estria terminal

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro

BLA- Amígdala basolateral

BRAs- Bloqueadores dos receptores de angiotensina

CA1-Corno de ammon 1

CA3- Corno de ammon 2

CEUA- Comitê de ética no uso de animais

CCA- Córtex cingulado anterior

CREB - Proteína-ligante-de-elementos-responsivos-a-cálcio

CPF- Córtex pré-frontal

CPFM- Córtex pré-frontal medial

CRH- Hormônio corticotrófico

CTR- Controle

CTR-MM- Controle memória

CTR-ANS- Controle ansiedade

DA- Dopamina

DAG- Diacilglicerol

DSM-5- Manual diagnóstico e estatístico de transtorno mental

ERK- Quinase regulada por sinal extracelular

GABA- Ácido gama-aminobutírico

GAD- Ácida glutâmica descarboxilase

GMPC- Guanidina-monofosfato-cíclico

HPA- Hipotálamo-hipófise-adrenal

IEGs- Genes precoces de expressão imediata

IpRGC- Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis

IP3- Inositol trifosfato

ISRS- Inibidor seletivo da recaptação de serotonina

LCR- Líquido cefalorraquediano

LTD- Depressão de longa duração

LTP- Potenciação de longa duração

MAPK- Proteína quinase ativada por mitógeno

MT1- Receptor de melatonina 1

MT2- Receptor de melatonina 2

MT3- Receptor de melatonina 3

MLP- Memória de longo prazo

MCP- Memória de curto prazo

mGLURs- Receptores metabotrópicos de glutamato

mRNAs- Ácido ribonucleico mensageiro

NAc- Núcleo acumbens

NO- Óxido nítrico

NRD- Núcleo dorsal da rafe

NMDA- N-metil-D-aspartato

NTS- Núcleo do trato solitário

NSQ- Núcleo supraquiasmático

RTT- trato retino-hipotalâmico

SAA- alfa amilase salivar

SBCAL- Sociedade Brasileira de ciências e animais de laboratório

SNC- Sistema nervoso central

SNS- Sistema nervoso simpático

SCG- Gânglio cervical superior

SCA- Sistema cerebral aversivo

SIC- Sistema de inibição comportamental

SHAM-ANS- Sham Ansiedade

SHAM-MM- Sham Memória

SRAA- Sistema renina angiotensina aldosterona

TAG- Transtorno de ansiedade generalizada

TEPT- Transtorno do estresse pós-traumático

TOC- Transtorno obsessivo compulsivo

PA- Pressão arterial

PAG- Área cinzenta periaquedutal

PIN- Pinealectomizado

PIN-ANS- Pinealectomizado ansiedade

PIN-MM- Pinealectomizado memória

PKA- Proteína quinsase A

PVN- Núcleo paraventricular

PLC- Fosfolipase C

VTa- Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Melatonina	2
2.2 Melatonina e as repercussões negativas da sua secreção inadequada	7
2.3 Memória.....	9
2.4 Ansiedade.....	11
2.5 Plasticidade neuronal	18
2.6 Plasticidade, memória e ansiedade.....	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Aspectos éticos.....	26
4.2. Animais	26
4.3 Drogas	27
4.4 Procedimentos gerais.....	27
4.5 Cirurgia estereotáxica – Pinealectomia	29
4.6 Testes comportamentais	31
4.7 Perfusão dos animais e processamento do cérebro	35
4.7.1 Imuno-histoquímica.....	36
4.7.2 Avaliação da densidade Óptica Relativa (DOR).....	37
4.7.3 Análise estatística	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Testes comportamentais	38
Campo Aberto	38
Campo aberto comparação	39

Labirinto em cruz elevado	40
Labirinto em cruz elevado modificado	41
<i>Medo condicionado ao contexto</i>	43
5.2 Imunorreatividade para BDNF	44
Experimento ansiedade	45
Experimento memória.....	46
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO	56
8. PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICE I.....	77
ANEXO I.....	80

1. INTRODUÇÃO

A melatonina é um neurohormônio anfipático, produzido principalmente pela glândula pineal na ausência de luz, e liberado na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano (LCR). Atua em diversos processos fisiológicos, como a regulação do ciclo circadiano, diminuição da pressão arterial, agente antioxidante, atenua processos degenerativos. Ainda atua também como ansiolítico, antidepressivo e estimulador dos processos de plasticidade sináptica. Sua ação ocorre devido a ativação de receptores de membrana e citoplasmáticos, MT1 e MT2, acoplados a proteína G, e receptores com função quinona redutase classificados como MT3 (Repova *et al.*, 2022).

Dentre as funções supracitadas, é possível destacar o papel que a melatonina desempenha nos fenômenos de plasticidade, que é a capacidade que o encéfalo possui de adaptar-se aos estímulos externos para melhor desempenho das sinapses, cognição e comportamento, em geral (Chistiakova *et al.*, 2014; Kourosch-arami; Hosseini; Komaki, 2021). Caracterizando um processo evolutivo e conservado entre os organismos, tornando-os capazes de aprender diante dos estímulos e experiências vivenciadas (Gilmore; Knickmeyer; Gao, 2018; Vorhees; Williams, 2014).

Estudos mostram que a melatonina atua em regiões do hipocampo estimulando a dendritogênese e a sinaptogênese (Kendler *et al.*, 1999; Valdés-Tovar *et al.*, 2018), promove ramificações dendríticas em neurônios piramidais corticais de ratos, prevenindo a perda de neurônios nas regiões CA1 (corno de Ammon 1) e CA3 (corno de Ammon 3) do hipocampo (Pascual; Bustamante, 2010; De Buttes; Pappas, 2007; Valdés-Tovar *et al.*, 2018). Os processos de plasticidade no hipocampo são modulados pela melatonina através da ativação dos receptores de melatonina localizados no giro denteado, nas regiões CA1 e CA3. Ao serem ativados, os receptores MT1 e MT2 modulam a proliferação celular na zona subgranular do giro denteado (Fredrich *et al.*, 2017). Além de atuar na neuroplasticidade hipocampal, a melatonina é capaz de diminuir prejuízos de memória e deficiências cognitivas (Zhang *et al.*, 2013), como também atua na modulação do humor (Liu *et al.*, 2017).

Nesta perspectiva, pessoas que possuem ciclo sono-vigília desregulado apresentam alterações na liberação da melatonina que conseqüentemente podem estar interferindo na neuroplasticidade. Este desequilíbrio pode prejudicar processos de aprendizagem e memória, bem como ocasionar o surgimento de patologias como doenças neurodegenerativas e quadros de ansiedade.

Embora a ciência tenha avançado muito nos estudos com a melatonina, ainda não está totalmente esclarecido na literatura como a diminuição deste hormônio pode interferir na plasticidade e conseqüentemente ocasionar alterações de memória e ansiedade. A hipótese deste estudo é que a pinealectomia na infância de ratos pode levar a alterações na plasticidade sináptica, causando prejuízos de memória e comportamento tipo ansioso na fase adulta desses animais.

Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar os efeitos das alterações na plasticidade induzidas pela pinealectomia e como essas alterações podem interferir na memória e no comportamento tipo ansioso de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio secretado pela glândula pineal (Fu *et al.*, 2016). Foi identificada pela primeira vez por Aron Lerner e colaboradores no final da década de 1950. Devido a sua estrutura anfipática atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica e entra nas células rapidamente (Repova *et al.*, 2022). Apresenta diversas funções no organismo, tendo como destaque a regulação do ritmo circadiano e do sono, ação imunorreguladora e antioxidante (Hardeland *et al.*, 2015a; Manchester *et al.*, 2015; Rudnitskaya *et al.*, 2015). A maior produção de melatonina ocorre na glândula pineal, porém outros órgãos e células tem a capacidade de sintetizá-la em menor quantidade, como o trato gastrointestinal, leucócitos e outras regiões cerebrais (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014; Reyes-Resina *et al.*, 2020; Sánchez; Calpena; Clares, 2015; Thomovsky *et al.*, 2019; Tordjman *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019). Contudo, a melatonina produzida em tecidos extrapineais atua por meio de sinalização autócrina e parácrina, sendo pouco liberada na corrente sanguínea (Hardeland, 2013).

Em mamíferos, o ritmo biológico que regula a produção da melatonina é originado através do relógio circadiano endógeno no núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ).

Sendo o ciclo claro/escuro o principal fator regulador do metabolismo da glândula pineal. Assim, as informações luminosas que chegam até a retina são transferidas para a glândula pineal (Allada; Bass, 2021; Cox; Takahashi, 2019). O NSQ recebe informações luminosas ambientais através de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGC) na retina. Essas células expressam o fotopigmento melanopsina que traduz os comprimentos de onda de luz em estímulos neurais através da via trato-retino-hipotalâmica (RHT) para o NSQ. O NSQ através de projeções gabaérgicas inibe o núcleo paraventricular (PVN), impedindo a produção de melatonina no pinealócito. O PVN na ausência de luz ativa os núcleos cervicais ganglionares (SCG), por meio da coluna intermédia lateral da medula, despolarizando fibras noradrenérgicas que inervam a glândula pineal, liberando noradrenalina e trifosfato de adenosina (ATP) (Tonon *et al.*, 2021).

A síntese endógena da melatonina ocorre no pinealócito, sendo um produto final da via de biossíntese do triptofano e da serotonina. O triptofano inicialmente é transportado para dentro da célula passando por um processo de descarboxilação pela ação das enzimas triptofano-5-hidroxilase e hidroxitriptofano descarboxilase, formando a serotonina, este processo é dependente da entrada neuronal adrenérgica. A serotonina é acetilada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e posteriormente metilada pela acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), formando a melatonina (Ostrin, 2018)

No pinealócito a transdução de sinal inicia-se na membrana, com a projeção dos neurônios adrenérgicos do gânglio cervical superior que liberam noradrenalina, atuando nos receptores β_1 -adrenérgicos e α_1 -adrenérgicos. Os receptores β_1 , sob estimulação da noradrenalina, sinalizam a adenilato ciclase, aumentando os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) no citoplasma, levando a uma ativação da proteína quinase A (PKA), dependente de AMPC, estimulando a produção de AANAT. A noradrenalina também atua estimulando os receptores α_1 , levando a um aumento na concentração de íons cálcio citoplasmático (Figura 1). O aumento da concentração iônica do cálcio pode estar relacionado com uma possível diversificação da via de transdução de sinal adrenérgico atuando na AANAT (Lee; Hille; Koh, 2021).

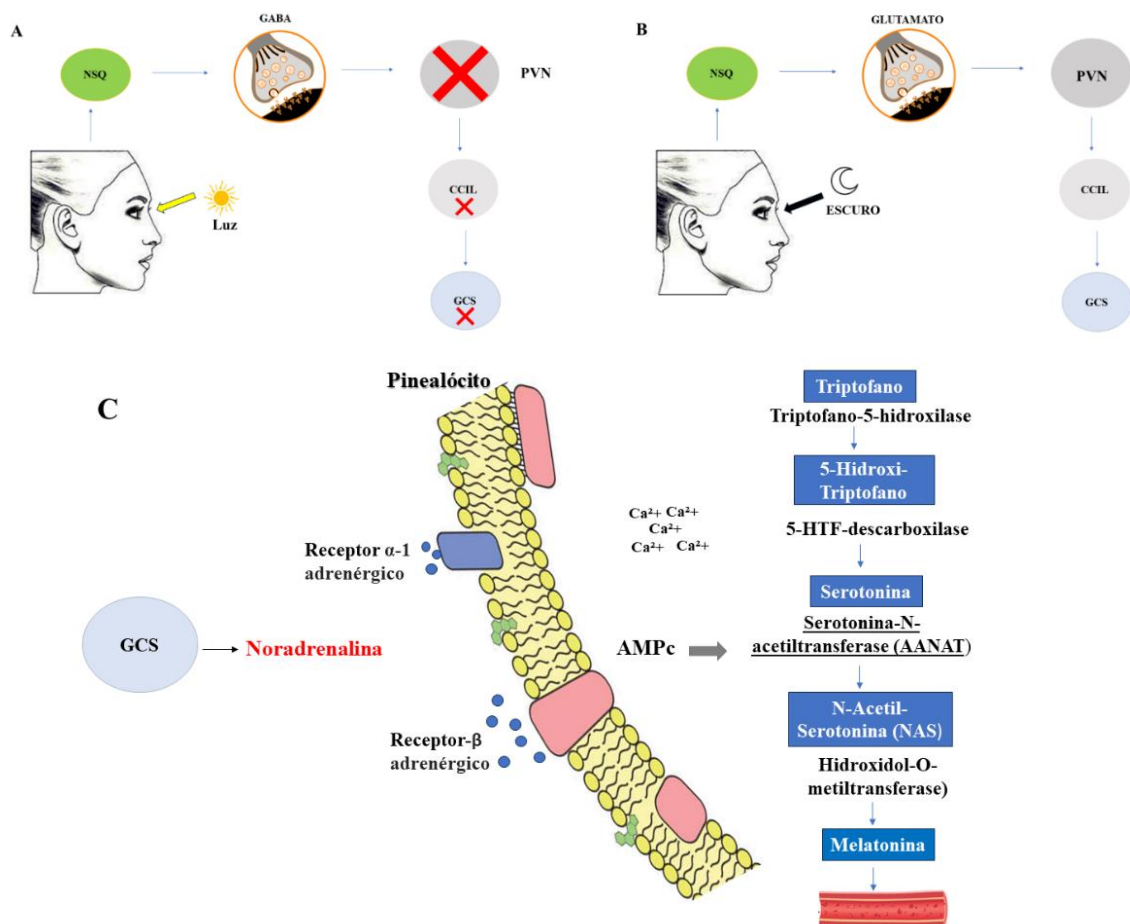


Figura 1. Esquema resumido da via de biossíntese da melatonina: (A) A retina recebe a informação luminosa do meio ambiente, exercendo inibição na produção da melatonina, através da sinalização gabaérgica para o PVN. (B) Na ausência de luz inicia-se a transmissão de sinal da retina para o núcleo supraquiasmático (NSQ), em seguida estímulos glutamatérgicos são enviados para o núcleo paraventricular (PVN), coluna celular intermédica lateral (CCIL), ativando o gânglio cervical superior (GCS) que irá liberar noradrenalina (NE), atuando em receptores alfa adrenérgico (α 1-adrenérgico) e beta adrenérgico (β -adrenérgico) presentes na membrana do pinealócito, aumentando os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). (C) A síntese endógena da melatonina ocorre no pinealócito, sendo um produto final da via de biossíntese do triptofano e da serotonina. O triptofano inicialmente é transportado para dentro da célula passando por um processo de descarboxilação pela ação das enzimas triptofano-5-hidroxilase e hidroxitriptofano descarboxilase, formando a serotonina, este processo é dependente da entrada neuronal adrenérgica. A serotonina é acetilada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e posteriormente metilada pela acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), formando a melatonina. Ao ser sintetizada a melatonina é liberada pela glândula pineal para o líquido cefalorraquidiano e para corrente sanguínea. A ativação de receptores α 1-adrenérgico aumenta os níveis intracelular de cálcio, sendo uma possível diversificação da via de transdução de sinal adrenérgico atuando na também na transcrição de AANAT. Fonte: Adaptado de (Cipolla-Neto *et al*, 2022).

A melatonina apresenta característica anfifílica ao ser secretada atravessa as membranas celulares atingindo sua concentração praticamente em todos os líquidos que compõem o organismo, incluindo o LCR, apresentando uma meia vida de 20 a 40 minutos (Rzepka-Migut; Paprocka, 2020). A melatonina é convertida em 6-sulfatoximelatonina (aMT6s), através do metabolismo de primeira passagem no fígado, sendo excretada na urina (Tonon *et al.*, 2021).

A melatonina atua de forma fisiológica nos receptores de melatonina 1 (MT1) e nos receptores de melatonina 2 (MT2), acoplados a proteína G, exercendo a função de regulação do ritmo circadiano e do sono (Reyes-Resina *et al.*, 2020). Também exerce função benéfica em transtornos do humor, aprendizagem, memória e de neuroproteção (Jilg *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Os receptores de melatonina, MT1 e MT2 são encontrados em diversas áreas do sistema nervoso central (SNC), como o cerebelo, hipocampo, tálamo, amígdala e núcleo supraquiasmático de roedores e humano. Os receptores MT2 estão localizados no cérebro principalmente na região CA3 do hipocampo e no núcleo reticular talâmico, desempenhando funções cognitivas (Millan, 2022).

Em tecidos periféricos é observado também a presença de receptores de melatonina como na retina, testículos, tecido adiposo branco e marrom, células betas e alfa pancreáticas, células granulosas, miométrio, medula óssea, dentre outros (Golan; Lapidot, 2019; (Cecon; Oishi; Jockers, 2017). Durante o envelhecimento é observado uma diminuição dos receptores MT1 no NSQ e no córtex (Pandi-Perumal *et al.*, 2008). A melatonina possui alta afinidade pelos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) MT1 e MT2, descritos inicialmente na membrana plasmática (Cecon; Oishi; Jockers, 2017). O receptor MT1 pode acoplar-se à proteína G α_q , ativando a via da fosfolipase C (PLC), aumentando trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) assim como pode ativar a via da G α_i , inibindo adenilato ciclase, levando a uma diminuição nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). A ativação de MT2 atua aumentando a atividade da fosfolipase C (PLC) via proteína G α_q , como também atua inibindo adenilato ciclase e guanilato ciclase, diminuindo os níveis de monofosfato cíclico guanosina (GMPc) (Figura 2) (BRydon et al., 1999; Ferlazzo *et al.*, 2020; Oishi; Cecon; Jockers, 2018).

A sinalização da melatonina envolve a regulação da transcrição de genes controlados pelo fator de transcrição CREB, bem como pelo fator transcricional da família ERK. Os receptores para melatonina podem se organizar como monômeros, dímeros ou oligômeros, podem encontrar-se na conformação homo ou heterodímero, podendo haver heterodimerização com o receptor órfão acoplado à proteína G50 (GPR50). Em mamíferos este receptor perdeu a

capacidade de se ligar a melatonina e o seu ligante endógeno permanece desconhecido, tornando o GPR 50 parte do grupo dos receptores órfãos (Dufourny *et al.*, 2008; Gautier *et al.*, 2018).

O receptor MT1 quando acoplado ao GPR50, forma um complexo que impossibilita a interação com a melatonina, promovendo um efeito negativo na sua atividade. Esses receptores além de serem encontrados na membrana plasmática são encontrados na membrana das mitocôndrias e em outras organelas. A presença de MT1 na membrana mitocondrial está relacionada a capacidade de inibir a produção de AMPc, protegendo contra lesões isquêmicas (Ahluwalia *et al.*, 2018; Suofu *et al.*, 2017). A ligação da melatonina ao receptor enzimático quinona redutase (MT3) pertence ao grupo das enzimas redutases que atuam contra o estresse oxidativo, diminuindo possíveis reações de transferências de elétrons de quinonas. Este receptor encontra-se presente em tecidos da periferia como fígado, rim, coração, pulmão, entre outros (Cecon; Oishi; Ralf Jockers, 2017).

O receptor MT3 foi descrito inicialmente por Dubocovich em 1998, sendo diferente dos subtipos MT1 e MT2, devido um perfil farmacológico distinto. Foi descrito inicialmente em cérebros de galinhas, como sendo um receptor acoplado a proteína G, atuando através da ativação da enzima fosfolipase C, aumentando os níveis de IP3/IP4 (Dubovovich, 1998). A cinética de ligação deste receptor apresenta característica de uma enzima devido sua ação muito rápida. Nosjean *et al* (2000), confirmaram essa hipótese, uma vez que isolaram esse receptor em rins de hamster, determinando toda sequência de aminoácido da proteína, podendo ser observado homologia de 95 % com a enzima quinona redutase (Figura 2).

A melatonina também atua em receptores nucleares através da ligação com receptores ligados a retinóides (RZR/ROR α), desencadeando efeito imunomodulador e antitumoral (Figura 2). O padrão de expressão desses receptores pode variar e algumas isoformas são específicas para alguns tecidos. Para que ocorra a modulação transcricional, ROR depende de ligantes que são caracterizados pelo seu impacto na atividade de transcrição do receptor, sendo eles agonistas, antagonistas e agonistas inversos. A ligação do agonista aumenta o recrutamento de coativadores, melhorando a expressão dos genes alvos. Os antagonistas apenas bloqueiam a ação mediada pelos agonistas. Porém, os agonistas inversos fazem o recrutamento de co-bloqueadores afim de regular negativamente a atividade basal do receptor (Botas, 2014; Vainer; Rocha; Juvenale, 2021).

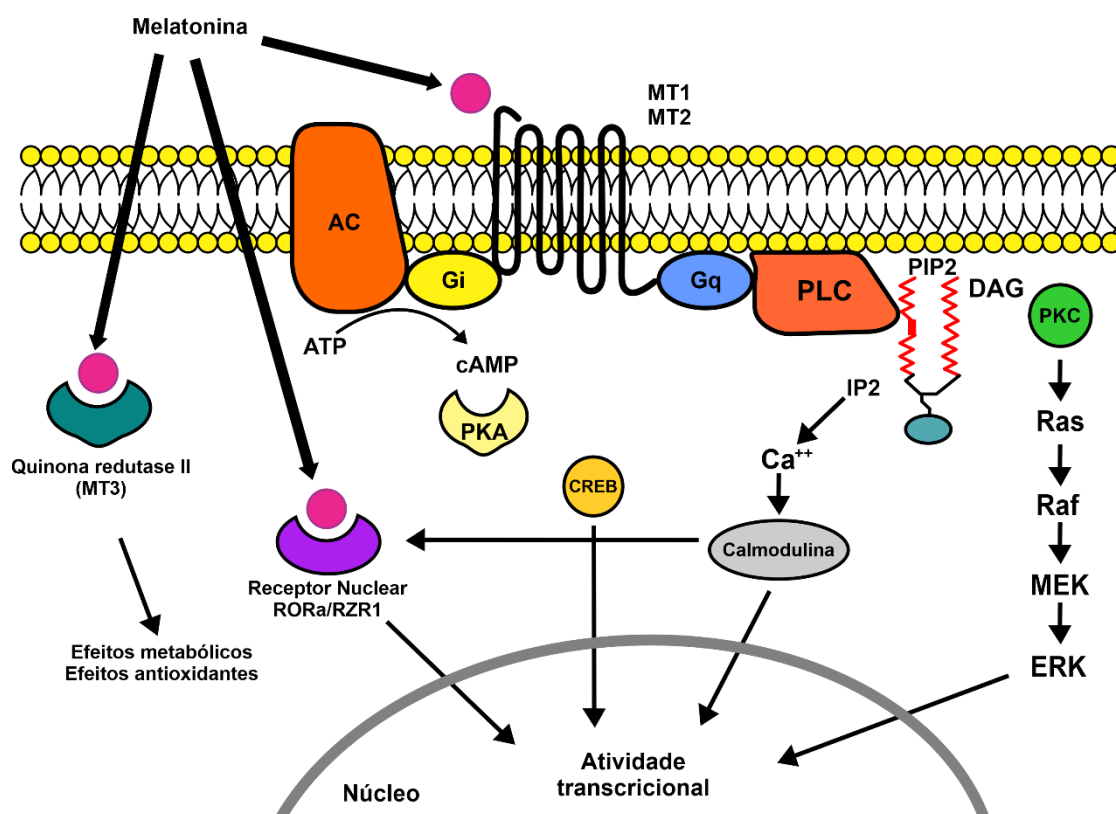


Figura 2. Sinalização da melatonina em receptores de membrana acoplados a proteína G, receptor citosólico e receptor nuclear. O receptor MT1 se liga à proteína Gαq, ativando a via da fosfolipase C (PLC), aumentando trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) assim como pode ativar a via da Gαi, inibindo adenilato ciclase, levando a uma diminuição nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A ativação de MT2 atua aumentando a atividade da fosfolipase C (PLC) via proteína Gαq, como também atua inibindo adenilato ciclase e guanilato ciclase, diminuindo os níveis de monofosfato cíclico guanosina (GMPc). O receptor MT3 possui cinética de ligação característica de uma enzima quinona redutase devido sua ação muito rápida. A melatonina também atua em receptores nucleares através da ligação com receptores ligados a retinóides (RZR/RORα), desencadeando efeito imunomodulador e antitumoral. Fonte: Adaptado de Slominski et al., 2012.

2.2 Melatonina e as repercussões negativas da sua secreção inadequada

Indivíduos que se expõem com frequência à luz noturna apresentam níveis reduzidos de melatonina e perturbação do ritmo circadiano. Interrupções da fase de sono e mudanças abruptas nos ciclos do sono alteram a liberação de melatonina, dificultando sua sincronia com sinais ambientais, sendo associado a dificuldade de concentração e algumas doenças cognitivas (Gandolfi *et al.*, 2020).

Em um estudo desenvolvido por Gooley *et al.*, 2011, foi sugerido que a exposição à luminosidade antes de dormir interfere diretamente na produção de melatonina, prática comum

na sociedade moderna, podendo resultar em alterações fisiológicas reguladas pela secreção de melatonina. A exposição tanto à luz artificial, quanto à luz natural influencia no ritmo circadiano, arrastando “osciladores endógenos” que são constituídos de elementos neurais, hormonais e genéticos. O sistema circadiano apresenta osciladores centrais e periféricos que desempenham funções específicas. O NSQ, que se encontra emparelhado ao hipotálamo de humanos e mamíferos é o principal oscilador central, recebendo informações de neurônios presentes na retina (Brzezinski *et al.*, 2021).

As mudanças no estilo de vida da sociedade moderna têm progredido para um aumento da atividade noturna e diminuição da atividade diurna, levando a perturbações do ciclo circadiano (Tuomi *et al.*, 2016). A exposição às telas de computadores, celulares, dentre outras ferramentas que possuem um amplo espectro de luz no período noturno, tem sido associada a uma diminuição nos níveis plasmáticos da melatonina, causando dissincronia do ciclo circadiano, distúrbios do sono e alterações do sistema imunológico (Posadzki *et al.*, 2018). Além de alterar o ciclo circadiano, a sua diminuição está relacionada com alterações mitocondriais, processos inflamatórios e alterações no SNC, uma vez que sua síntese regular atua mediando esses processos (Hardeland *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2016).

A liberação de melatonina pode ser interrompida por meio da cirurgia para remoção da glândula pineal (pinelectomia), reduzindo os níveis desse hormônio no plasma. Esta técnica cirúrgica permite a diminuição abrupta dos níveis circulantes de melatonina, afetando a ritmicidade circadiana dos animais, surgindo diversas alterações fisiológicas (Gallo *et al.*, 2022).

Uma das alterações observadas com a diminuição da melatonina refere-se a pressão arterial (PA), uma vez que foi observado diminuição dos níveis do metabólito da melatonina (6-sulfatoximelatonina) em pacientes hipertensos que tem dificuldade de diminuir a PA a noite. A melatonina atua, aumentando a vasodilatação, reduzindo a contratilidade miocárdica e diminuição da atividade do sistema nervoso simpático. Em ensaios clínicos foram observados que a administração oral de melatonina diminui a PA em indivíduos hipertensos, uma vez que a melatonina foi capaz de diminuir a concentração plasmática de noradrenalina e diminuiu os β -adrenoceptores tipo 1 no coração (Obayashi *et al.*, 2013). Em um estudo com ratos observou-se que a administração aguda de melatonina foi capaz de reduzir a PA (Repova *et al.*, 2022b).

A ausência ou redução da melatonina também causa prejuízos no metabolismo dos indivíduos, podendo surgir casos de resistência à insulina, intolerância a glicose, distúrbios na produção da insulina, como também distúrbios do balanço energético, levando a casos de

obesidade. Além de atuar na regulação da insulina, a melatonina atua sob os hormônios glucagon e cortisol e sua diminuição também resulta no desbalanço da síntese e liberação desses hormônios reguladores de processos fisiológicos essenciais (SEMB, 2023).

2.3 Memória

A memória é caracterizada pela aquisição, consolidação, armazenamento e evocação de informações, proporcionando a individualidade dos seres por meio da aquisição de novas informações ao longo da vida (Izquierdo, 2002; Parsons, 2018; Tovote; Fadok; LüthI, 2015). A aquisição compreende a fase em que a informação é percebida pelo cérebro. A consolidação é a fase em que as informações são selecionadas, tornando-se estáveis, possibilitando que esta memória seja armazenada e posteriormente evocada (Ortega-de San Luis; Ryan, 2022; Squire; Dede, 2015). Após a memória ser armazenada, esta, por sua vez, pode ser evocada, caracterizando o processo de recuperação da memória, nesta fase ocorre a organização dos traços da memória em uma sequência coerente que será organizada pelo córtex pré-frontal (CPF) (Moura & Melo, 2011).

As memórias foram classificadas inicialmente em memórias de curta duração e memórias de longa duração. As de curta duração podem durar minutos e até mesmo horas, diferente das memórias de longa duração que podem durar dias, semanas ou até mesmo serem armazenadas por toda vida. As memórias estáveis e duradouras, de longa duração, são importantes para que os organismos possam codificar e recuperar informações sobre fatos e eventos vivenciados e até mesmo recordar de habilidades necessárias para o seu comportamento (Sudhakaran; Ramaswami, 2017).

As memórias de curta duração apresentam um papel importante nos processos cognitivos, incluindo a memória de trabalho, raciocínio e tomadas de decisões (yin *et al.*, 2022). Foi observado em várias espécies, incluindo primatas e roedores, atividade neuronal relacionada às memórias de trabalho em diversas regiões que compõem o cérebro, como o córtex pré-frontal (PFC), córtex parietal, córtex pré-motor, córtex motor e tálamo (Gallero-Salas *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2018; Mayrhofer *et al.*, 2019). Há uma diversidade de mecanismos neurais que atuam em paralelo retendo informações de curto prazo na memória de trabalho. A capacidade que os neurônios têm de gerar atividade persistente na ausência de um estímulo externo é importante para as bases neurais da memória de trabalho. Em humanos foi observada

atividade desses neurônios no córtex pré-frontal (CPF), responsável por codificar informações relevantes durante tarefas que envolvam a memória de trabalho (D'esposito; Postle, 2015).

A memória de longa duração pode ser do tipo declarativa ou não declarativa. As memórias declarativas correspondem a memórias semânticas, ou seja, de conhecimento acerca do mundo e memórias episódicas que são memórias de eventos. Já o desempenho de hábitos e habilidades são classificados como memórias não declarativas ou implícitas (Crosson, 2021; Squire; Zola-Morgan, 2015). As memórias episódicas têm suas informações implementadas na região CA3 do hipocampo. As informações que foram armazenadas na forma de memória episódica podem ser convertidas em memória semântica, uma vez que a memória episódica apresenta algum valor, que será sinalizado para o córtex orbitofrontal, córtex pré-frontal ventro medial e córtex cingulado anterior (Rolls *et al.*, 2022).

A formação da memória de longo prazo (MLP) depende da ligação de neurotransmissores a seus receptores específicos, dando início a uma cascata de reações bioquímicas. Deve-se destacar a função da transmissão glutamatérgica para formação de MLP, uma vez que o glutamato se liga aos seus receptores ionotrópicos do tipo AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) e NMDA (N-metil-D-aspartato) e metabotrópicos, ocorrendo a ativação de guanilil-ciclase. A ação desta enzima induz o aumento de GMPc (guanidina-monofosfato-cíclico), ativando a proteína quinase G, que irá promover a formação de óxido nítrico e monóxido de carbono. Aumentando a potencialização da ação do glutamato nos terminais pré e pós-sináptico, uma vez que o óxido nítrico atua como mensageiro retrogrado (Kemenes *et al.*, 2002; Menzel, 2001). O hipocampo é a principal região onde ocorre a formação da MLP, principalmente em uma sub-região hipocampal denominada de CA1 que envia projeções para o córtex entorrinal e para outras duas sub-regiões, o giro denteado e a sub-região CA3 (GUSEV; Alkon, 2001).

As informações duradouras são resultado de alterações plásticas estruturais e funcionais das sinapses codificando o comportamento. É importante observar que a formação de memórias de longa duração necessita da expressão de novos genes. Envolvendo a transcrição de novos mRNAs em neurônios que codificam as memórias, como também a tradução induzida por meio de mRNAs quiescentes que estão armazenados nas sinapses, sendo ativados pela experiência. Sendo assim, para que uma memória de longo prazo seja consolidada é necessário a tradução do mRNA em toda a célula, permitindo a regulação da expressão de genes em neurônios. Já as

memórias de curto prazo são induzidas sem haver a necessidade da expressão gênica (Ortega-de San Luis; Ryan, 2022).

Dentre a diversidade de classificações em que as memórias são organizadas é importante destacar o papel modulador das emoções sob a memória, podendo atuar de forma positiva e negativa (Packard; Gadberry; Goodman, 2021). O aprimoramento da memória emocional tornou-se uma adaptação para sobrevivência das espécies, uma vez que lembramos com maior frequência de eventos com componente emocional quando comparado com um neutro. Contudo, memórias emocionais traumáticas podem contribuir para transtornos de ansiedade. Destacando o hipocampo e a amígdala como regiões integradoras nos processos de memórias com contexto emocional (Bocchio; Nabavi; Capogna, 2017; Costa *et al.*, 2022; Strange *et al.*, 2014).

2.4 Ansiedade

A ansiedade é uma emoção humana comum, no entanto, possui capacidade de afetar negativamente a vida do indivíduo quando se encontra desordenada (Perusini; Fanselow, 2015). A ansiedade e o medo são emoções que estão correlacionadas, uma vez que o medo é subjetivamente qualificado como uma sensação desconfortável, sendo acompanhado por alterações comportamentais e psicofisiológicas. O medo é uma resposta desencadeada a partir de uma ameaça conhecida, definida e externa. A ansiedade é desencadeada em uma situação em que o perigo é incerto, sendo difícil especificar as causas (Davis *et al.*, 2010; Tovote; Fadok; Lüthi, 2015).

Fisiologicamente a função do medo e da ansiedade é prever, reagir ou ajustar-se a um perigo ou ameaça. Sendo caracterizados por um aumento da atividade excitatória do sistema autonômico, ativação de sistemas neuroendócrinos e manifestações de comportamentos específicos (Ledoux; Pine, 2016). Evolutivamente a ansiedade e o medo tem origem nas reações de defesa em que o indivíduo evita danos prejudiciais ao organismo e também prejuízos psicológicos. A ansiedade apresenta valor adaptativo, porém quando os níveis dessa emoção se encontram superiores aos considerados normais, torna-se uma ansiedade patológica ou transtorno de ansiedade, causando prejuízos na qualidade de vida do indivíduo (Tovote; Fadok; Lüthi, 2015).

Os transtornos de ansiedade são as doenças mentais mais comuns, as quais atingem de 2,7 a 7% da população, com uma prevalência de 63% para o sexo feminino (MENTAL

HEALTH, 2023). A ansiedade patológica é marcante e causa prejuízos diários na qualidade de vida. Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é caracterizada pela preocupação excessiva persistindo por pelo menos 6 meses no qual o indivíduo apresenta dificuldades para controlar a ansiedade excessiva. Sintomas como fadiga inadequada, irritabilidade, distúrbios do sono, dificuldade para se concentrar, tensão muscular e disfunções autonômicas são comuns em indivíduos acometidos pelos transtornos de ansiedade (Craske; Stein, 2016; Psychiatric association, 2014).

O cérebro é a estrutura responsável por determinar o que é ameaçador, facilitando as respostas comportamentais e fisiológicas à ameaça. Joseph LeDoux foi um dos grandes responsáveis por descrever as bases biológicas da ansiedade e do medo como sendo circuitos responsáveis pela sobrevivência por meio de mecanismos que regulam comportamentos de defesa diante de uma situação de perigo. Essa circuitaria é constituída por um sistema sensório-motor, capaz de detectar sinais do ambiente que serão utilizados para o controle das respostas comportamentais, como também para os ajustes fisiológicos necessários, auxiliando na sobrevivência dos animais. Os circuitos neurais responsáveis pelo processamento das emoções compreendem várias estruturas, como amígdala, hipocampo, ínsula, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG), lócus cerúleos, cada uma desempenhando uma função específica (Ledoux, 2012; MCewen *et al.*, 2012).

A ínsula atua interconectada com a amígdala, PAG e com o hipotálamo, sendo responsável pela regulação do sistema autonômico, interpretando as sensações físicas internas diante de emoções negativas. O hipotálamo também participa diretamente da regulação do sistema nervoso autônomo simpático, mediando a resposta humoral, visceromotora, e somático-motora, regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A atividade excessiva do sistema límbico nos transtornos de ansiedade e no medo resulta em alterações do sistema nervoso autonômico simpático (SNS), juntamente com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e sistema imune em resposta a agentes estressores físicos ou psicológicos (Godoy *et al.*, 2018a). O SNS atua liberando noradrenalina pelas glândulas adrenais, mediando uma resposta rápida ao estresse, em contrapartida o sistema HPA é ativado alguns minutos após o estímulo, secretando o fator liberador de corticotropina (CRF) na região do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Jurueña *et al.*, 2020).

O SNS participa de forma ativa na ansiedade, estimulando a secreção de alfa-amilase salivar (SAA), uma enzima digestiva produzida pelas glândulas salivares (Nater; Rohleder, 2009). O nível de SAA é aumentado em resposta ao estresse agudo ou crônico na ansiedade (Chojnowska *et al.*, 2021). Em indivíduos com transtorno de ansiedade é observado um aumento nos níveis plasmáticos de noradrenalina (Holwerda *et al.*, 2018) e SAA (Van veen *et al.*, 2008), quando comparado com indivíduos controles. O bloqueio do SNS é capaz de reduzir os níveis de ansiedade, mecanismo pelo qual alguns fármacos betas bloqueadores atuam, como o propranolol e nadolol (Zaidi *et al.*, 2020).

Além da ativação do SNS diante de uma situação estressora, ocorre também a ativação do eixo HPA. Uma vez estimulado é liberado CRF no PVN que por consequência estimula a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior. Após ser sintetizado, o ACTH irá atuar na região cortical da glândula adrenal, estimulando a síntese e secreção de glicocorticoides, dentre os principais destaca-se o cortisol. Em seguida, o cortisol atua em receptores para glicocorticoides e mineralocorticoides que estão distribuídas em diversas regiões. No cérebro, o cortisol atua modificando o sistema imunológico, a cognição, alterando a fisiologia e o comportamento (Godoy *et al.*, 2018b). A liberação do cortisol é regulada por meio de feedback negativo que em situações de estresse crônico pode ser alterado, resultando em um aumento da atividade do eixo HPA e por consequência pode ocorrer o surgimento de transtornos do humor e quadros de ansiedade (Tafet; Nemeroff, 2020).

O aumento da atividade do SNS diante de um estresse interfere diretamente também no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). A angiotensina II atua estimulando a liberação de catecolaminas no lócus cerúleos central e na medula adrenal periférica. Em resposta ao estresse ocorre aumento da expressão do receptor Ang II tipo 1 (AT1) na região do PVN, hipófise e glândulas adrenais periféricas também, ativando o eixo HPA, resultando na liberação de CRH, ACTH e glicocorticóides. A expressão de receptores AT1 é aumentada no PVN pela ação dos glicocorticoides. Desta forma a Ang II estimula o SNS central e periférico, e todos os componentes do eixo HPA, aumentando a resposta ao estresse (Bali; Jaggi, 2013). É observado em humanos e animais que fármacos inibidores do SRAA medeiam o efeito ansiolítico, como é o caso dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs), reduzindo os sintomas de estresse (Chrissobolis *et al.*, 2020; Khoury *et al.*, 2012; Repova *et al.*, 2022). O efeito ansiolítico observado com o bloqueio do SRAA pode ser mediado também através da regulação positiva

dos receptores de Ang II no cérebro, atenuando a atividade do SNS central e periférico, como também diminuição da resposta do eixo HPA (Anil kumar *et al.*, 2015; Genaro *et al.*, 2017; Pavel *et al.*, 2008).

Deve-se destacar que além das alterações em diversas áreas já mencionadas a amígdala é a principal responsável pelo controle das alterações do sistema límbico. A região da amígdala é o local onde são avaliados os estímulos com potencial de ameaça, caracterizada como o centro de registro dos estímulos com significado emocional, resultando na facilidade de processar informações que serão armazenadas (Sah; Sun; Gooch, 2020). As múltiplas subdivisões que compõem a amígdala têm como destaque importante no processamento da ansiedade e medo a amígdala basolateral (BLA) e a amígdala central (AC) (Janak; Tye, 2015; Sah; SUn; Gooch, 2020). A amígdala basolateral recebe informações que vem do tálamo, córtex pré-frontal (PFC) e áreas de associação cortical através do núcleo lateral (LA), estas informações são processadas no núcleo basal (BA), sendo enviadas posteriormente até a amígdala central, podendo sofrer alterações adicionais. Quando a amígdala basolateral é excitada, os neurônios de projeções da amígdala centrolateral e amígdala centromedial atuam regulando várias regiões envolvidas na ansiedade, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo leito da estria terminal (BNST), hipotálamo e complexo vagal dorsal (DVC), dando origem a respostas autonômicas e motoras (Tovote; Fadok; Lüthi, 2015).

A BLA é constituída de neurônios principais glutamatérgicos e interneurônios gabaérgicos que medeiam as respostas de ansiedade e medo. A saída excitatória dos neurônios principais determina a resposta ao medo, sendo reduzida pela rede de interneurônios que liberam GABA. Os neurônios principais e interneurônios recebem projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NRD) e da substância cinzenta periaquedutal (PAG), projeções glutamatérgicas do hipocampo (HPC), projeções noradrenérgicas do locus cerúleos (LC) e do núcleo do trato solitário (NTS) e projeções dopaminérgicas da área tegmentar ventral (VTA) e da substância negra (SN). Já a amígdala basolateral através dos neurônios principais enviam projeções glutamatérgicas para a amígdala central, núcleo accumbens (NAc) e para o núcleo leito da estria terminal (NLET) (Lai *et al.*, 2023).

A atividade sincronizada dos neurônios principais e interneurônios regulam as respostas de medo e ansiedade. Entretanto, nos transtornos de ansiedade a amígdala encontra-se superativada, causando desbalanço nessa circuitaria, levando a um aumento na liberação de glutamato que resulta em uma hiperexcitabilidade da amígdala. As diminuições das projeções

serotoninérgicas e noradrenérgicas também alteram a atividade da BLA, como também a diminuição de dopamina em VTA e SN, contribuindo para alterações no comportamento de defesa como esquiva ou congelamento e reações fisiológicas (Flores-Cuadrado *et al.*, 2017; Kopchia *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2021).

Os comportamentos de defesa envolvem dois sistemas cerebrais, o sistema cerebral aversivo (SCA) e o sistema de inibição comportamental (SIC) (Graeff, Hetem, 2004; (Hirsh; Kang, 2016)). O SCA constitui-se de estruturas, como hipotálamo, amígdala e a substância cinzenta periaquedutal dorsal, respondendo a estímulos incondicionados de medo (Baldi; Bucherelli, 2015; Giustino; Maren, 2015; Marek; Sun; Sah, 2019; Tovote; Fadok; Lüthi, 2015d). O SIC atua comparando o estímulo atual com um estímulo esperado, em que o subículo (região entre o hipocampo e o córtex entorrinal) agiria comparando informações sensoriais providas do córtex entorrinal, com as expectativas criadas pelo circuito de Papez (tálamo ântero-ventral, corpo mamilar do hipotálamo e córtex cingulado), que atua integrando as informações que tem origem no córtex pré-frontal, áreas responsáveis pela tomada de decisões. Se as informações recebidas forem compatíveis com o esperado, o sistema irá permanecer em modo “checagem”, não ocorrendo o controle comportamental exercido pelo SIC. Porém, quando a informação recebida não é compatível com o esperado, o SIC começa a operar no modo “controle”, gerando inibição do comportamento (ansiedade), com aumento da atenção ao meio e aumento do estado de vigília em direção aos estímulos de ameaça (Graeff, 2004; Hirsh; Kang, 2016; Brandão, 2008). Foi observado que lesões na amígdala em humanos e roedores são capazes de inibir a capacidade de reconhecer estímulos de medo, uma vez que a estimulação elétrica na região da amígdala gera medo e ansiedade (Janak; Tye, 2015).

O hipocampo também atua na regulação das respostas de medo e ansiedade. Foi observado que em pacientes com transtornos de ansiedade ocorre uma redução do volume hipocampal e da amígdala (Çalışkan; Stork, 2019; Sanders; Wiltgen; Fanselow, 2003; Van Mierlo *et al.*, 2015; Vriend *et al.*, 2016). Projeções diretas do hipocampo ventral para o córtex pré-frontal medial são importantes para os comportamentos relacionados a ansiedade (Padilla-Coreano *et al.*, 2016). O PFC atua regulando a expressão comportamental do medo e a extinção de memórias de medo que foram de forma prévia adquiridas, atuando também na formação inicial de memórias que apresentam um componente emocional (Alvarez *et al.*, 2008; Gilmartin; Balderston; Helmstetter, 2014; Terasawa *et al.*, 2013).

Além das estruturas encefálicas presentes na circuitaria neuronal da ansiedade, tem-se os neurotransmissores como outro componente primordial para que ocorra a comunicação entre as áreas encefálicas. Vários neurotransmissores atuam na regulação dos mecanismos que medeiam a ansiedade, e a desregulação desses mecanismos pode resultar em alterações fisiológicas e comportamentais, aumentando o risco do desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos (Babaev; Piletti Chatain; Krueger-Burg, 2018a; Martin *et al.*, 2010). A serotonina (5-HT), derivado do aminoácido triptofano é um dos principais neurotransmissores que está envolvido na regulação da ansiedade. Durante uma situação de perigo o sistema de defesa da amígdala é acionado ativando neurônios serotoninérgicos que estão situados no núcleo dorsal da rafe, inervando a amígdala e a PAG, o aumento da serotonina na amígdala produz aumento da resposta de ansiedade, enquanto o seu aumento na PAG está mais relacionado com um fenótipo ansiolítico, desta forma a serotonina desempenha um papel dual na sua neurotransmissão. A serotonina é também alvo de umas das principais classes de fármacos utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade e depressão, sendo eles os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). As principais regiões onde são encontrados os corpos de neurônios contendo serotonina são as regiões mesencefálicas, ponte, bulbo e os núcleos da rafe que distribuem suas fibras para estruturas do mesencéfalo (PAG), diencefalo, hipotálamo, hipocampo, tálamo, amígdala e neocórtex. Desempenhando funções que envolvem a regulação do humor, sono, vigília, aprendizagem, memória, ansiedade e medo (Pourhamzeh *et al.*, 2022; Żmudzka *et al.*, 2018).

O ácido gama-aminobutírico (GABA), sintetizado a partir do ácido glutâmico que sofre uma reação catalítica, através da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), apresentando as isoformas GAD 76 e GAD 65, é o principal neurotransmissor inibitório presente no SNC dos mamíferos, atuando de forma importante no equilíbrio entre excitação e inibição neuronal, regulando a atividade dos neurônios (Harris; Saleh; Edden, 2017; Nuss, 2015). A desregulação em sua transmissão tem sido associada com alterações presentes nos transtornos de ansiedade. Uma vez liberado na fenda sináptica, liga-se aos receptores pós-sinápticos, podendo ser absorvido pelo neurônio pré-sináptico (Möhler, 2012; Nasir *et al.*, 2020a). Após ser absorvido, o GABA pode ser ainda reciclado, atuando em alguma reação química, porém este neurotransmissor não é absorvido pelas vesículas sinápticas. Possui uma ação semelhante à do glutamato, uma vez que a sua liberação é dependente de cálcio após a despolarização do terminal pré-sináptico. Estudos em modelos animais observaram que os interneurônios presentes no córtex pré-frontal medial (CPFM) exercem controle inibitório sobre neurônios

piramidais de glutamato, influenciando a atividade de CPFM e também respostas autonômicas diante de estímulos ameaçadores (Ledoux, 2012).

Os receptores para GABA podem ser ainda subdivididos em: GABAA e GABAc com ação ionotrópica, estando ligados a canal de cloreto, responsáveis pela rápida inibição neuronal. E ainda possui ação metabotrópica mediada pelo subtipo GABAB, estando acoplado a proteína G, canal de cálcio e potássio, mediando uma resposta inibitória mais lenta. Dentro dos subtipos de receptores, o GABAA é o que possui um papel na circuitaria da ansiedade, projetando-se da amígdala central para o tronco cerebral e para o hipotálamo, ativando neurônios dessas regiões, levando a manifestações somáticas de ansiedade (Nuss, 2015; Prager *et al.*, 2016; Stefanits *et al.*, 2018).

O glutamato também exerce funções na circuitaria da ansiedade, sendo o principal neurotransmissor excitatório do SNC. As projeções glutamatérgicas participam ativamente de toda circuitaria neural, interligando vias corticais e subcorticais. Distribui-se por todo SNC, desempenhando funções fisiológicas no neurodesenvolvimento, aprendizagem, cognição e em processos mnemônicos (Barkus *et al.*, 2010; Nasir *et al.*, 2020b). Sua síntese ocorre e, em seguida, este neurotransmissor é empacotado em vesículas nos terminais pré-sinápticos dos neurônios glutamatérgicos. Durante o potencial de ação, as vesículas contendo glutamato se fundem com a membrana do terminal pré-sináptico, liberando-o na fenda sináptica. Uma vez liberado atua em seus receptores pós-sináptico ionotrópicos, que são canais catiônicos regulados por voltagem dependente, ou receptores metabotrópicos transmembrana acoplados a proteína G. Os receptores do tipo ionotrópicos para glutamato são: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e receptores de cainato. Já os receptores metabotrópicos são aqueles pertencentes a família dos mGluR (Niswender; Conn, 2010; Swanson *et al.*, 2005).

O glutamato tem sido alvo de estudo nos transtornos de ansiedade, depressão, transtorno obsessivo compulsivo (TOC), transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Uma vez que em estudos *post-mortem* nesses distúrbios é observado alterações nos níveis de glutamato, presentes no plasma, líquido cefalorraquidiano e tecido cerebral, bem como alterações na expressão do receptor NMDA (Averill *et al.*, 2017; Krystal *et al.*, 2010). Diversas regiões como, amígdala, hipocampo, CPFM, CCA, são inervadas por neurônios piramidais glutamatérgicos. A amígdala recebe projeções do CPFM que são enviadas para outras regiões do sistema límbico e até mesmo para o CPFM. A exposição a situações estressoras está relacionada com o aumento

da concentração de glutamato no CPFM, como também aumento das projeções glutamatérgicas que saem da amígdala. O uso de antagonistas glutamatérgicos tem sido alvo de estudos para fármacos com ação ansiolítica (Nasir *et al.*, 2020b).

A dopamina (DA) é um neurotransmissor derivado do aminoácido tirosina, que também atua como mediador da emoção. O sistema dopaminérgico tem origem na área tegmental ventral (VTA), e disfunções nessa região estão associadas ao desenvolvimento de características semelhantes a ansiedade em humanos e roedores (Qi *et al.*, 2022). A liberação de DA por VTA atua diretamente em várias regiões, como o CPFM, NAc e amígdala. Além de VTA liberar DA em regiões mesocorticolímbicas, ela também é liberada localmente, no entanto a ação local em comportamentos de ansiedade ainda é pouco compreendida (Adell; Artigas, 2004; Nguyen *et al.*, 2021; Rice; Patel, 2015). A DA regula a sinalização neuronal através dos seus receptores para dopamina 1 (D1) e 2 (D2). A ativação de D1 depende de sua ligação com a proteína Gs, ativando adenilato ciclase (AC) e aumentando os níveis de AMP cíclico. O receptor D2 atua via proteína Gi, inibindo AC e diminuindo o cálcio citoplasmático. Sendo este receptor D2, alvo dos fármacos com ação antipsicótica. Disfunções no córtex cingulado anterior e NAc tem sido associado ao agravamento de comportamentos semelhantes a ansiedade. A ação dos receptores D1 além de apresentarem funções na cognição, também atuam de forma jussante a VTA regulando comportamentos semelhantes a depressão e ansiedade. No CPFM a ativação de neurônios piramidais que expressam receptores D1 atua produzindo respostas antidepressivas e ansiolíticas rápida e também duradouras (Tong *et al.*, 2023; Tu *et al.*, 2019).

2.5 Plasticidade neuronal

A plasticidade é a capacidade que o cérebro tem de mudar suas estruturas e funções durante o curso da vida, adaptando-se a mudanças fisiológicas resultantes das interações do organismo com o meio ambiente. A plasticidade recebeu esse termo pela primeira vez por William James em 1890 (James, 1890), posteriormente foi denominado de plasticidade neural por Jerky Konorsky em 1948 (Konorsky, 1948). A base para os processos plásticos é formada por moléculas e suas interações com circuitos sinápticos, celular e neuronal. A plasticidade atua criando ou removendo conexões sinápticas, a fim de manter o equilíbrio da atividade entre os neurônios. Caracterizando os processos de potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), resultantes de uma série de eventos moleculares, alterações na expressão de genes e síntese de novas proteínas (Gulyaeva, 2017).

Os receptores para glutamato *N* - metil - D -aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoleproprionato (AMPA) e receptor metabotrópico para glutamato (mGLUR) possuem função importante na formação de LTP e LTD (Diering; Huganir, 2018). Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados em receptores de glutamato ionotrópicos e metabotrópicos. O receptor ionotrópico responde de forma rápida, alterando os estímulos que medeiam o influxo e efluxo do íon Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} em neurônios (Salussolia et al., 2011). A sinalização jusante de receptores NMDA, quando ativados desempenha uma função importante na plasticidade sináptica, caracterizando um mecanismo celular para aprendizado e memória (Parsons; Raymond, 2014). (Mukherjee; Manahan-Vaughan, 2013; Reiner; Levitz, 2018).

A LTP pode ser entendida como o fortalecimento de sinapses após estimulação sináptica repetitiva (Bliss *et al.*, 2018). Inicialmente, os disparos basais de sinapses ativam primordialmente os receptores AMPA, uma vez que os receptores NMDA permanecem inibidos pela ação do magnésio. A estimulação de alta frequência em neurônio pré-sinápticos aumenta a eficácia elétrica da sinapse, ocorrendo influxo de sódio via abertura de receptores AMPA, despolarizando o terminal pós-sináptico de forma suficiente para remover a ação do magnésio, recrutando os receptores NMDA para que possa haver influxo de íons cálcio (Chen; Gouaux, 2019; Haering *et al.*, 2014; Lüscher; Malenka, 2012). O cálcio atua como mensageiro secundário, podendo induzir alterações que levam à estimulação da LTP. Aumentando a resposta pós-sináptica que será maior do que o seu nível de pré-estimulação. É importante destacar também a importância exercida pelo óxido nítrico (NO) nesta cascata de sinalização, atuando como mensageiro retrogrado, potencializando ainda mais a saída de glutamato das vesículas pré-sinápticas para atuar nos seus receptores pós-sinápticos (Shahoha *et al.*, 2022).

O aumento de cálcio intracelular leva a ativação de enzimas como a proteína quinase C (PKC), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), MEK e ERK que atuam ativando fatores de transição, como a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), proteína associada ao citoesqueleto regulado por atividade (ARc), genes de expressão imediata (erg-1-Zif268), resultando na expressão de novos RNAm, formação de novos receptores, sinaptogênese, constituindo novos processos plásticos. Além da cascata de sinalização mediada pelos receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, deve-se destacar também a atuação do receptor mGLU acoplado a proteína G que também é ativado pela transmissão glutamatérgica, desencadeando cascatas de segundo mensageiro e vias de sinalização intracelular, ativando também fatores transcricionais que vão resultar no aumento de sinapses e eventos de

plasticidade. No entanto por se tratar de um receptor metabotrópico sua resposta é mais lenta quando comparado com os receptores ionotrópicos (Figura 2).

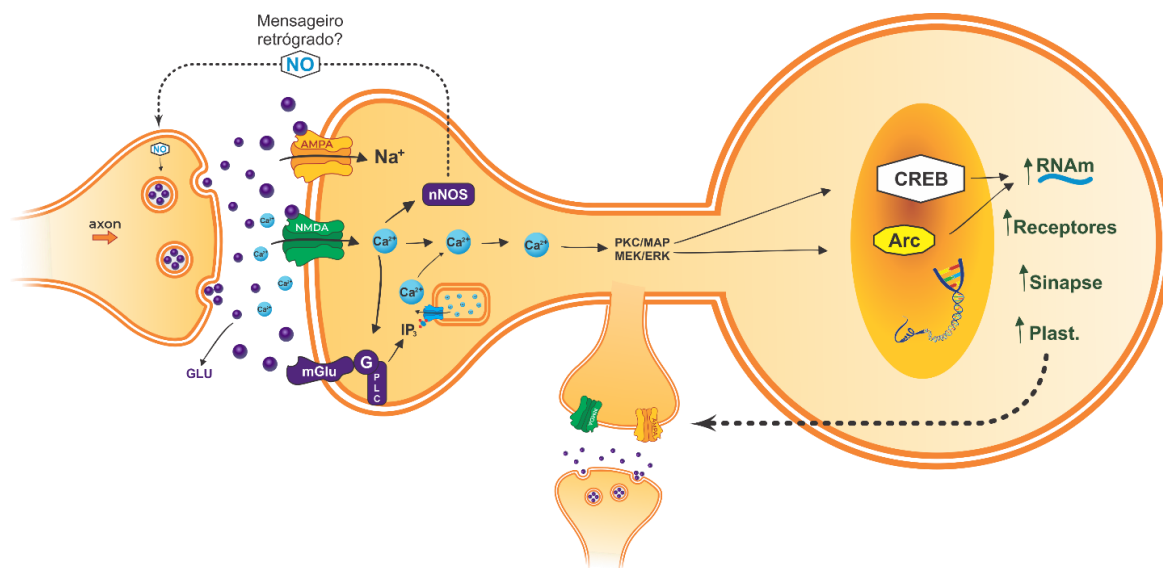


Figura 3. Representação esquemática da potenciação de longa duração (LTP): A despolarização do terminal pré-sináptico ocasiona a liberação do neurotransmissor glutamato na fenda sináptica, ligando-se aos seus receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, ocorrendo influxo de sódio e despolarização do terminal pós-sináptico de forma suficiente para remover a ação do magnésio, recrutando os receptores NMDA para que possa haver influxo de íons cálcio. O cálcio atua como mensageiro secundário, podendo induzir alterações que levam à estimulação da LTP, aumentando a resposta pós-sináptica que será maior do que o seu nível de pré-estimulação. O óxido nítrico atua como mensageiro retrógrado, potencializando ainda mais a saída de glutamato das vesículas pré-sinápticas para atuar nos seus receptores pós-sinápticos. O aumento de cálcio intracelular leva à ativação de enzimas como a proteína quinase c (PKC), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), MEK e ERK que atuam ativando fatores de transição, como a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), proteína associada ao citoesqueleto regulado por atividade (Arc), genes de expressão imediata (erg-1-Zif268), resultando na expressão de novos RNAm, formação de novos receptores, sinaptogênese, constituindo novos processos plásticos. Além da cascata de sinalização mediada pelos receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, além da cascata de sinalização mediada pelos receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, o receptor mGlu acoplado a proteína G também é ativado pela transmissão glutamatérgica, desencadeando cascatas de segundo mensageiro e vias de sinalização intracelular, ativando também fatores transcricionais que vão resultar no aumento de sinapses e eventos de plasticidade. No entanto por se tratar de um receptor metabotrópico sua resposta é mais lenta quando comparado com os receptores ionotrópicos. Fonte: Souza, 2023.

Assim como o fortalecimento das sinapses é essencial para os processos de plasticidade, a atenuação das sinapses neuronais também é importante. Uma vez que os organismos necessitam adaptar-se constantemente as mudanças ambientais que podem não se alinhar com experiências anteriormente aprendidas, é necessário que ocorra o enfraquecimento das forças sinápticas através do processo de LTD (Collingridge *et al.*, 2010). A LTD pode ser expressa pela ativação sináptica dependente de NMDA e também pela ativação de receptores mGluR (Compans *et al.*, 2021). A diminuição nos níveis de cálcio resulta na ativação de proteínas fosfatases calcineurina, causando uma desfosforilação dos receptores AMPA e subsequente indução da LTD. A frequência de um estímulo interfere na liberação do neurotransmissor, afetando diretamente a despolarização da célula pós-sináptica e por consequência o grau de ativação do receptor NMDA, resultando em um maior ou menor influxo de íons cálcio (Figura 3) (Naoki, 2008).

A LTD é o resultado da diminuição de sinapses decorrentes da diminuição da atividade de neurônios, principalmente no hipocampo, reduzindo a atividade dos receptores NMDA, diminuição do influxo de cálcio e diminuição do número de receptores pós-sináptico e também diminuição na produção de óxido nítrico. Contribuindo para a formação de plasticidade, uma vez que esse processo medeia a permanência de memórias relevantes, contribuindo para o não armazenamento de informações que não possuem relevância (Kandel, 2014).

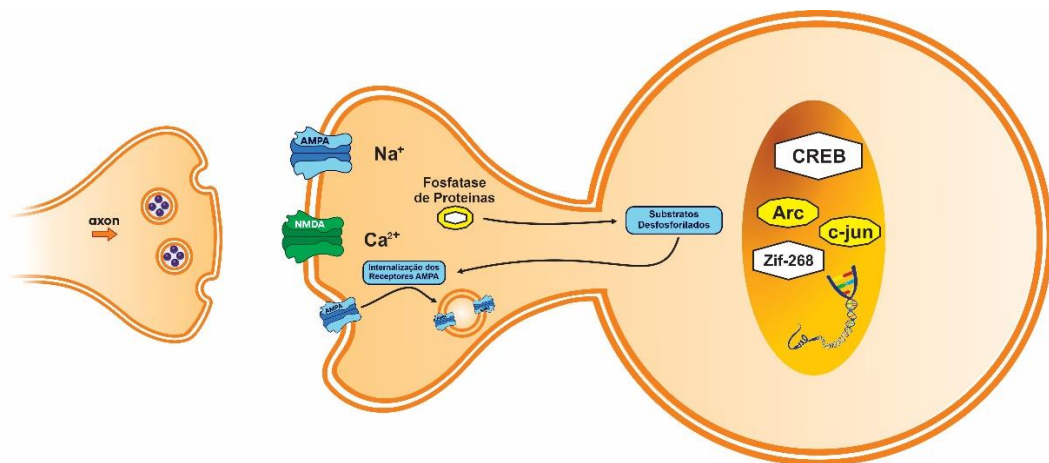


Figura 4. Representação esquemática da depressão de longa duração: Durante a LTD tem-se um enfraquecimento das sinapses e consequente diminuição dos receptores NMDA, influxo de cálcio reduzido que por sua vez essa diminuição resulta na ativação de enzimas fosfatases, como a calcineurina, causando uma desfosforilação dos receptores AMPA e subsequente indução da LTD. Com a diminuição do cálcio não é possível ativar cascatas de fosforilação, resultando na diminuição da ativação de fatores transcritoriais da família CREB, Arc, Zif-268, entre outros. ocasionando uma diminuição dos processos de sinaptogênese e neurogênese. Fonte: Souza, 2022.

Os processos de plasticidade mencionados, contribuem de forma positiva para que possa ocorrer a consolidação das memórias, que mesmo armazenadas podem sofrer alterações em momentos de reativação, caracterizando uma fase de reconsolidação ou manutenção da memória. Com o avanço das técnicas para estudo do sistema nervoso foi possível entender cada vez mais os mecanismos envolvidos nos processos plásticos. A partir do desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica criada em 1980, foi possível identificar a expressão de genes que estão envolvidos com a formação dos processos plásticos. Destacando a importância do gene Zif268, considerado um gene de expressão imediata, foi identificado por Lau and Nathans (1987) pela primeira vez (Milbrandt, 1987). Este gene atua codificando o fator de transcrição Zif268 (Christy; Nathans, 1989), possuindo sítio de ligação em promotores de vários genes de expressão tardia.

Além de atuar em processos plásticos esses genes atuam como marcadores de atividade neural. Os genes precoces de expressão imediata (IEGs) mais utilizados para marcar atividade do neurônio são c-Fos e também zif268 (Erg-1), tendo o seu curso de tempo e expressão amplamente estudados para expressão de RNAm e expressão de proteínas. A ação desses genes codifica fatores de transcrição, influenciando a fisiologia neuronal, regulando a expressão de genes com resposta tardia (Farina; Commings, 2016). Tanto c-Fos quanto Egr-1 interagem com uma série de outros fatores de transcrição. Além disso, outros IEGs codificam proteínas que influenciam diretamente a função celular, como no caso de Arc (proteína do citoesqueleto regulada por atividade) (Herdegen; Leah, 1998; Zhai *et al.*, 2021).

Arc é um gene precoce de expressão imediata que também desempenha funções primordiais para a memória. Esta proteína atua regulando o tráfego de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, realizando o recrutamento de vias endossomais, atuando diretamente nos processos plásticos (Plath *et al.*, 2006).

Os processos de plasticidade também são mediados por proteínas que pertencem ao grupo das neurotrofinas. Sendo elas, proteínas que atuam na manutenção, crescimento e regeneração do sistema nervoso. Destacando aqui o papel desempenhado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), sendo uma das neurotrofinas mais importantes, localizada em todas as regiões do SNC, principalmente na amígdala, hipocampo e no hipotálamo dos mamíferos. Atuando em mecanismos de reparo e proliferação celular, atuando em processos de plasticidade (Leal; Bramham; Duarte, 2017). Os efeitos do BDNF na estruturação do cérebro podem variar de curto a longo prazo, atuando em sinapses excitatórias e inibitórias. Mediado pelos receptores TrkB e p75 atuam ativando diversas vias de sinalização,

regulando o transporte de RNAm ao longo dos dendritos, modulando as fases iniciais e de alongamento da síntese de proteínas (Leal; Comprido; Duarte, 2014). Os efeitos sob a regulação da transcrição contribuem para as mudanças de longo prazo no proteossoma sináptico. O BDNF atua de forma positiva regulando a dinâmica dos receptores AMPA e NMDA, durante a transmissão do glutamato, modulando os processos de plasticidade de longo prazo. Alterações no controle do BDNF estão associados diretamente com o comprometimento da plasticidade, podendo resultar no surgimento de doenças mentais (Severini, 2023).

2.6 Plasticidade, memória e ansiedade

O cérebro é considerado o órgão central para os processamentos de aprendizagem e memória, sendo capaz de aprender, treinar e armazenar na forma de memória as informações. Para que o cérebro desempenhe corretamente essas tarefas é imprescindível a participação de uma propriedade capaz de sofrer alterações que é a plasticidade (Buckner; Dinicola, 2019; Martin; Grimwood; Morris, 2000). As sinapses são os principais alvos de estudos de local de plasticidade nos processos de aprendizagem e memória no cérebro. As primeiras especulações de Tanzi e Ramon y Cajal acerca da plasticidade ocorreram em 1893. Segundo Tanzi pode haver mudanças em conexões sinápticas pré-existentes. No entanto, Ramon y Cajal enfatizavam a formação e a perda de conexões novas. Somente na década de 1970 é que foi possível investigar adequadamente as possibilidades que Tanzi e Ramon y Cajal defendiam, graças a estudos anatômicos e eletrofisiológicos. Evidenciando a capacidade que o sistema nervoso tem de alterar sua conectividade funcional conforme novas informações são consolidadas. A capacidade que o cérebro tem de mudar sua estrutura e função a partir de conexões novas ou pré-existentes é o que caracteriza a plasticidade sináptica, sendo a base fisiológica para os processos de adaptação comportamental e psicológica (Kourosh-Arami; Hosseini; Komaki, 2021).

A plasticidade desempenha função crítica na aprendizagem, formação de memória, emoção, na cognição e em diversas alterações reguladas pelo sistema nervoso. Mudanças estruturais e funcionais induzem processos plásticos, mediados pela LTP e LTD (Yang *et al.*, 2016). A plasticidade cerebral atua regulando emoções, como a ansiedade, por meio da atividade neuronal, da excitabilidade e da transmissão sináptica em regiões específicas que modulam as respostas de ansiedade, como a amígdala e o hipocampo. A excitabilidade neuronal é influenciada pela condutância de canais iônicos voltagem dependente, expressos na região do

soma ou dendritos dos neurônios, modulando as entradas sinápticas e a capacidade de geração do potenciação de ação (Shim; Lee; Kim, 2018).

A tensão de grande condutância e a atividade dos canais de K^+ , dependentes de Ca^{+} , atuam regulando a excitabilidade de neurônios presentes no hipocampo, envolvidos na ansiedade desenvolvida pelo estresse e no comportamento de ansiedade associado a dor (Ghasemi *et al.*, 2022). Além da condutância de íons, a plasticidade atua regulando o processamento de informações nas sinapses das fibras musgosas e região CA3 do hipocampo. Alterações na plasticidade sináptica induzidas pelo estresse no início da vida tem sido associado a mudanças nas sinapses das fibras musgosas e CA3, aumentando o comportamento tipo-ansioso em camundongos (Shin *et al.*, 2016).

A plasticidade cerebral pode ser mediada pela ação de neurotrofinas como o BDNF que se liga ao receptor transmembrana TrKB (receptor de tropomiosina quinase B), resultando na ativação de cascatas de sobrevivência neuronal, crescimento e diferenciação celular. A expressão reduzida dessa neurotrofina, juntamente com o seu receptor nem regiões corticais e do hipocampo está relacionada com o surgimento de transtornos psiquiátricos (Bagheri *et al.*, 2021).

Estudos tem mostrado que alterações na plasticidade neural apresentam uma relação direta com a fisiopatologia dos transtornos do humor. Alterações na plasticidade durante o desenvolvimento pode resultar em alterações estruturais e funcionais em circuitos importantes, levando a um comprometimento duradouro do cérebro, causando alterações na fase adulta. Nos distúrbios do humor é observado uma diminuição de espinhas dendríticas e densidade sináptica, alterando os processos de plasticidade que por sua vez resulta em modificações na eficácia da neurotransmissão sináptica (Romcy-Pereira; Leite; Garcia-Cairasco, 2009; Bessa *et al.*, 2009). Em um estudo desenvolvido por Ryan et al 2010, observou-se que um estresse agudo induzido por choque nas patas de roedores, utilizado para estudar desamparo aprendido, houve inibição de LTP no hipocampo dorsal com duração de quatro semanas.

Em situações de estresse crônico, observa-se uma maior ativação de receptores para cortisol que por sua vez prejudica a capacidade no desempenho de tarefas, devido a hiperexcitabilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e acentuada atividade do sistema límbico (Tripathi *et al.*, 2019). E é com base nessas alterações que muitas técnicas de psicoterapias trabalham em prol da qualidade e melhoria das alterações cognitivas, emocionais e comportamentais de indivíduos com distúrbios do humor, uma vez que a psicoterapia promove mudanças na plasticidade, por meio de novas conexões sinápticas e manifestações

neurofisiológicas, regulando funções neuronais capazes de equilibrar os sistemas de emoção e cognição (Cezar *et al.*, 2022; Månsson *et al.*, 2013; Ulrich-Lai; Herman, 2009).

.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as alterações de plasticidade induzidas pela pinealectomia e como essas alterações podem interferir no comportamento tipo ansioso e na memória de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos da pinealectomia no comportamento tipo ansioso em ratos;
- Analisar as alterações de memória em ratos submetidos a remoção da glândula pineal;
- Avaliar as alterações de plasticidade no hipocampo, amígdala e córtex entorrinal de ratos pinealectomizados;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Os procedimentos realizados no presente estudo foram conduzidos de acordo com a lei brasileira para o uso de animais em pesquisas (Lei Arouca, nº 11.794/2008) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de 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.

4.2. Animais

Foram utilizados 54 *Rattus norvegicus* machos da linhagem *Wistar* em todo o experimento 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 ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e livre acesso ao alimento e água. Os animais foram alojados em número de 4-5 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 foram feitas através do software *Any-Maze*.

4.3 Drogas

Foram utilizados, Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União); Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União); Pentabiótico (Zoetis indústria de produtos veterinários Ltda); Banamine (Schering-Plough Santé Animale Z.A); Cloridrato de lidocaína (Cristália) com hemitartarato de norepinefrina.

4.4 Procedimentos gerais

Os animais foram, inicialmente, divididos em três grupos: controle (CTR): animais que não foram submetidos a cirurgia estereotáxica; SHAM: animais que foram submetidos a cirurgia estereotáxica, mas não ocorreu a retirada da glândula pineal; Pinealectomizados (PIN): animais submetidos a cirurgia estereotáxica para retirada da glândula pineal, com n de 7 a 12 animais por grupos (Figura 5). Para os testes comportamentais, os grupos foram subdivididos em subgrupos de animais que passaram pelos testes para avaliar memória e os subgrupos de animais que passaram pelos testes para avaliar o comportamento tipo ansioso. Sendo assim, ficaram seis grupos experimentais:

1. **Controle memória (CTR-MM) -12:** animais que não passaram por procedimento cirúrgico, e foram submetidos a avaliação de memória;
2. **Sham memória (SHAM-MM) -11:** animais que passaram por procedimento cirúrgico sem a retirada da pineal, e foram submetidos a avaliação de memória;
3. **Pinealectomizado memória (PIN-MM) -12:** animais que passaram por cirurgia para remoção da glândula pineal, e foram submetidos a avaliação de memória;
4. **Controle ansiedade (CTR-ANS) -7:** animais que não passaram por procedimento cirúrgico, e foram submetidos a avaliação do comportamento tipo-ansioso;
5. **Sham ansiedade (SHAM-ANS) -7:** animais que passaram por procedimento cirúrgico sem a retirada da pineal, e foram submetidos a avaliação do comportamento tipo-ansioso;
6. **Pinealectomizado ansiedade (PIN-ANS) -9:** animais que passaram por cirurgia para remoção da glândula pineal, e foram submetidos a avaliação do comportamento tipo-ansioso.

Os animais dos grupos SHAM e PIN foram submetidos a cirurgia estereotáxica com um mês e meio de vida, equivalente a 45 dias a partir do dia de nascimento. Após a cirurgia, os animais foram devolvidos ao biotério e ficaram em observação até completarem dois meses de vida. Nessa fase, os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação dos

parâmetros de alterações de memória e comportamento tipo ansioso. Inicialmente todos os grupos (CTR, SHAM e PIN) foram submetidos a avaliação comportamental no teste de campo aberto, com o intuito de avaliar se houve alteração locomotora devido à realização da cirurgia estereotáxica. Posteriormente, os animais dos grupos CTR-MM, SHAM-MM, e PIN-MM foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado modificado para avaliação de alterações de memória. Os animais dos grupos CTR-ANS, SHAM-ANS e PIN-ANS foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado clássico para avaliação do comportamento tipo ansioso. Ao completarem quatro meses de vida, os animais passaram por avaliação comportamental novamente. Todos os grupos foram submetidos a avaliação comportamental no teste de campo aberto. Posteriormente, os animais dos grupos CTR-MM, SHAM-MM e PIN-MM foram submetidos ao teste de medo condicionando ao contexto para avaliação de alterações de memória, posteriormente os animais foram perfundidos 60 minutos após a exposição ao aparato. Os animais dos grupos CTR-ANS, SHAM-ANS e PIN-ANS foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado para avaliação do comportamento tipo ansioso. No dia seguinte os animais foram expostos a um ambiente enriquecido durante 10 minutos e perfundidos 60 minutos após a exposição ao aparato, afim de avaliar alterações de plasticidade. (Figura 5). Os tecidos cerebrais perfundidos de ambos os grupos experimentais foram cortados em fatias de 50 µm (micrometro), e submetidos a imunohistoquímica para avaliação histológica.

A idade para realização da pinealectomia com 45 dias (transição da infância para juventude) e avaliação dos testes comportamentais com dois meses (jovem) e quatro meses (adulto) de vida, foi baseado no trabalho de Andreollo *et al.*, (2012), no qual mostra a idade cronológica de roedores.

É importante salientar que antes de qualquer experimento comportamental, os animais foram submetidos a etapa de manipulação que consiste em sessões diárias de 5 minutos de manipulação dos ratos pelos pesquisadores envolvidos, durante 5 dias. Essa etapa tem finalidade de habituar os animais aos experimentadores e reduzir possíveis alterações comportamentais decorrentes do estresse e do comportamento tipo ansioso causados pelo contato e presença de pessoas durante o experimento.

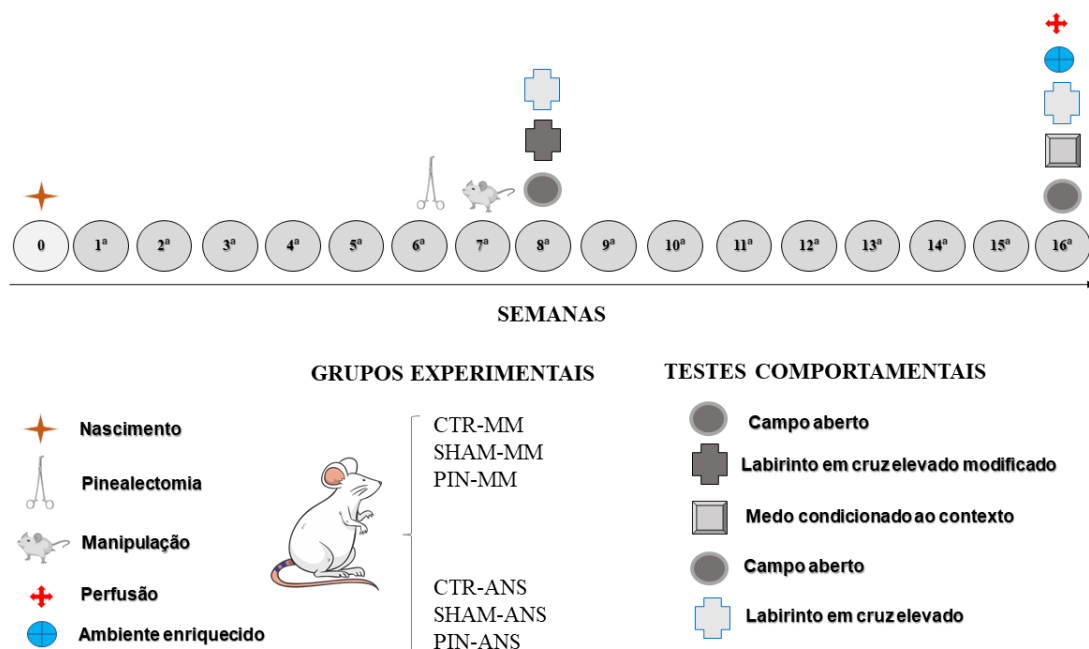


Figura 5. Representação esquemática do delineamento experimental. O delineamento experimental teve duração de 16 semanas, contando a partir do dia 0 referente ao nascimento dos animais. Na 6ª semana, equivalente a 45 dias de nascidos, os animais do grupo SHAM e PIN, passaram por cirurgia estereotáxica. Na 7ª semana os animais foram manipulados, afim de habituar-se ao toque do experimentador, para que na 8ª semana inicia-se os testes comportamentais. Todos os animais passaram pelo teste de campo aberto para avaliação de alterações motoras, posteriormente, foram agrupados com base na avaliação do comportamento tipo-ansioso e alterações de memória. Na 16ª semana os animais passaram por uma nova avaliação de testes comportamentais e após a finalização da avaliação comportamental os animais foram perfundidos para processamento do cérebro e posterior análise histológica. Os animais do grupo ansiedade foram expostos a um ambiente enriquecido, 60 minutos antes da perfusão para que fosse possível avaliar alterações plásticas nos tecidos cerebrais. Os animais do grupo memória, após serem expostos a fase de teste na avaliação do medo condicionado ao contexto foram perfundidos após 60 minutos da exposição ao teste.

4.5 Cirurgia estereotáxica – Pinelectomia

Os animais foram anestesiados com xilazina 10% (10 mg/kg) e ketamina 10% (100 mg/kg) pela via intraperitoneal. Os animais só foram submetidos ao procedimento cirúrgico quando não respondiam 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 uma estrutura estereotáxica, dando início a tricotomia. Em

Após retirada da peça óssea retangular, esta ficou imersa em soro fisiológico 0,9 % para prevenir o ressecamento. Posteriormente, a dura-máter foi removida, cuidadosamente, expondo a veia sagital superior, a qual foi suturada, utilizando um fio de sutura nº 5 para hemostasia; foi feito um corte transversal no vaso entre os pontos de sutura, o qual possibilitou a visualização da glândula pineal. Após a retirada da glândula pineal, foi adicionado novamente o pedaço da calota craniana e em seguida a pele do animal foi suturada. Os animais receberam 1 ml de pentabiótico via intramuscular após a finalização do processo cirúrgico para evitar possível infecção e também receberam 1 ml de anti-inflamatório Banamine por via intramuscular. Em seguida os animais foram posicionados em uma placa de calor com temperatura regulada a fim de manter a temperatura corporal dos animais estável. Posteriormente os animais foram devolvidos ao biotério (Burgos *et al.*, 2016).

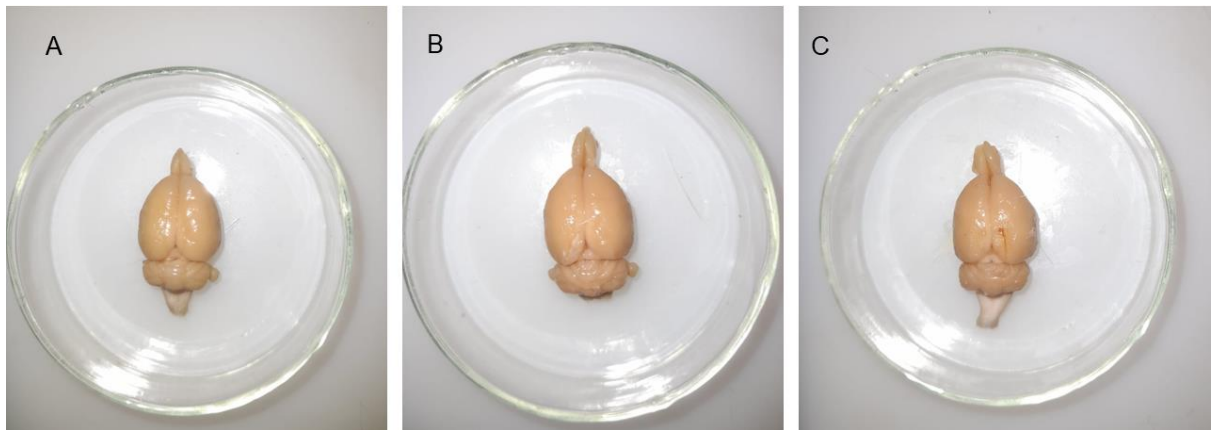


Figura 7. Representação dos encéfalos com base nos grupos experimentais: (A) - Encéfalo de animal controle que não passou por procedimento cirúrgico; (B) – Encéfalo de animal SHAM que passou por cirurgia sem a retirada da glândula pineal; (C) – Encéfalo de animal pinealectomizado que passou por cirurgia para remoção da glândula pineal.

4.6 Testes comportamentais

Campo aberto

Para a avaliação de atividade locomotora, comportamento exploratório e de estado de ansiedade em modelos animais o teste de campo aberto é uma ferramenta muito utilizada (Bispo *et al.*, 2022; Leal *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2013). O teste de campo aberto consiste em um aparato circular medindo 80cm de diâmetro por 40cm de altura, com seu interior pintado de preto afim de aumentar o contraste, favorecendo a identificação do animal. O animal é exposto ao aparato, colocado no centro para livre exploração durante 5 minutos, toda a sessão foi registrada por uma câmera posicionada sobre o aparato a uma altura de 230 cm. As imagens

capturadas foram processadas com o auxílio do software de rastreamento animal (Anymaze, Stoelting, Wood Dale, IL, USA), para mensuração dos parâmetros comportamentais de distância percorrida e tempo de permanência no centro do aparato.

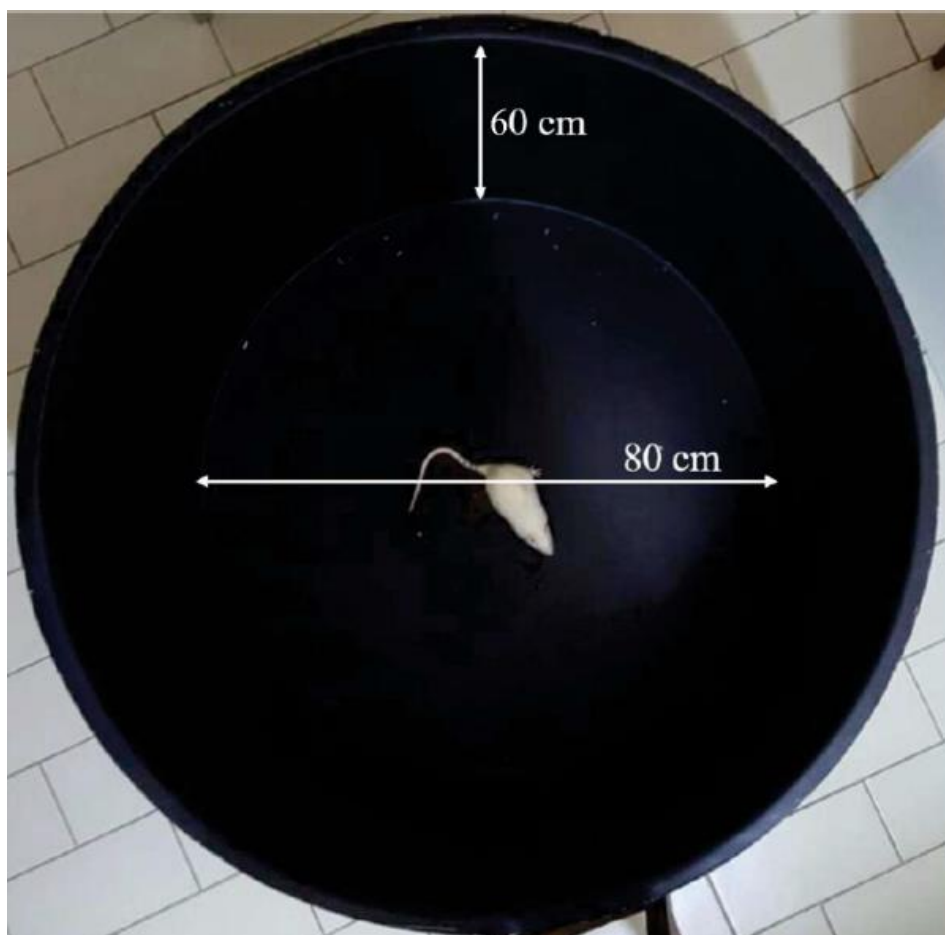


Figura 8. Aparato de campo aberto. Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado consiste em um aparato experimental para modelos animais, visando a avaliação do comportamento tipo-ansioso. Sua primeira utilização ocorreu em 1987 de forma sistematizada em camundongos. Durante o teste ocorre o evento de “conflito de aproximação-esquiva” (approach-avoidconflict) do animal avaliado diante da exposição a um ambiente desconhecido e a tendência natural de esquiva a regiões abertas, com potencial perigo e conflito, gerando comportamentos de respostas incondicionadas. 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 70 cm do solo. O tempo total

de aplicação do teste é em geral de 5 a 10 minutos, independente do uso de sistemas informatizados de avaliação ou esquema de rastreamento fenotípico. Os animais são colocados em um dos braços fechados sendo contabilizado os seguintes parâmetros: latência para saída do braço fechado para o braço aberto, tempo de permanência nos braços fechados e braços abertos, número de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados. Ao final de uma sessão de testes com cada animal, foi feita a limpeza e higienização da plataforma, evitando pistas deixadas por outros animais (Morato, 2006; Pinto *et al.*, 2011).

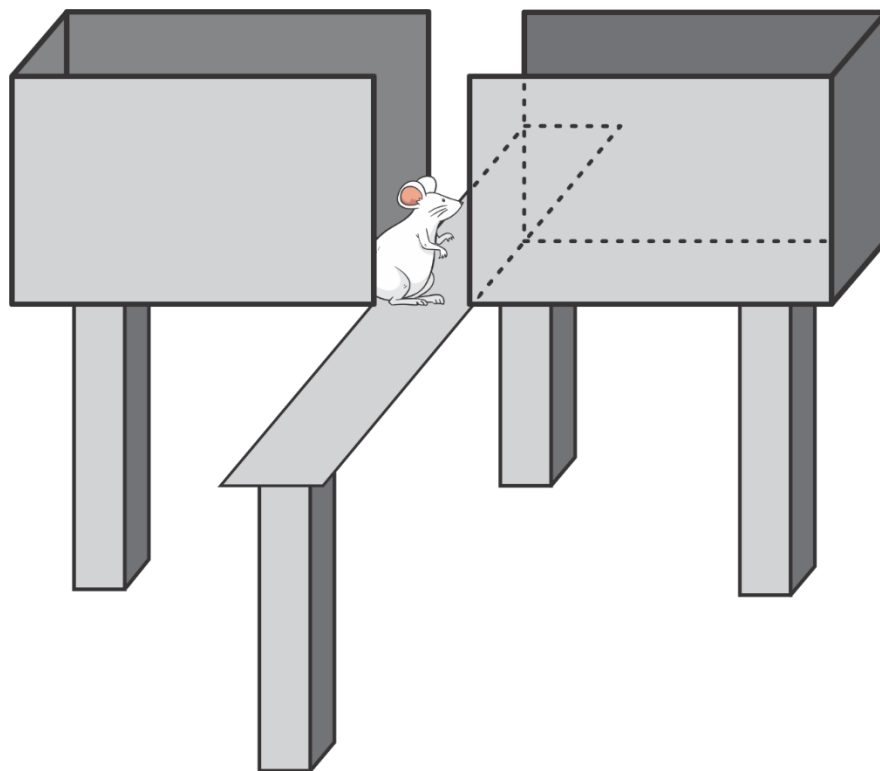


Figura 9. Aparato do labirinto em Cruz elevado. Fonte: Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE). (Bourin; Hascoët, 2003).

Labirinto em cruz elevado modificado

O teste de labirinto em cruz elevado modificado, consiste na avaliação da aprendizagem e de memória. O aparato é pintado de preto e constituído de dois braços abertos e dois braços fechados, dispostos em um ângulo de 90°. O piso do labirinto é elevado 70 cm do chão e um dos braços fechados contém uma lâmpada de 100W e som, que são ligados cada vez que o animal entra nesse braço, durante a sessão treino. Após essa fase, 24 horas depois, ocorre o teste, nesta fase o animal não recebeu nenhum estímulo de luz e som. Em ambas as etapas, os ratos foram observados durante 10 minutos e foram avaliados os seguintes parâmetros: o

número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, braço fechado e no braço fechado aversivo ambiente fechado modificado e distância total percorrida (Medeiros, 2011).

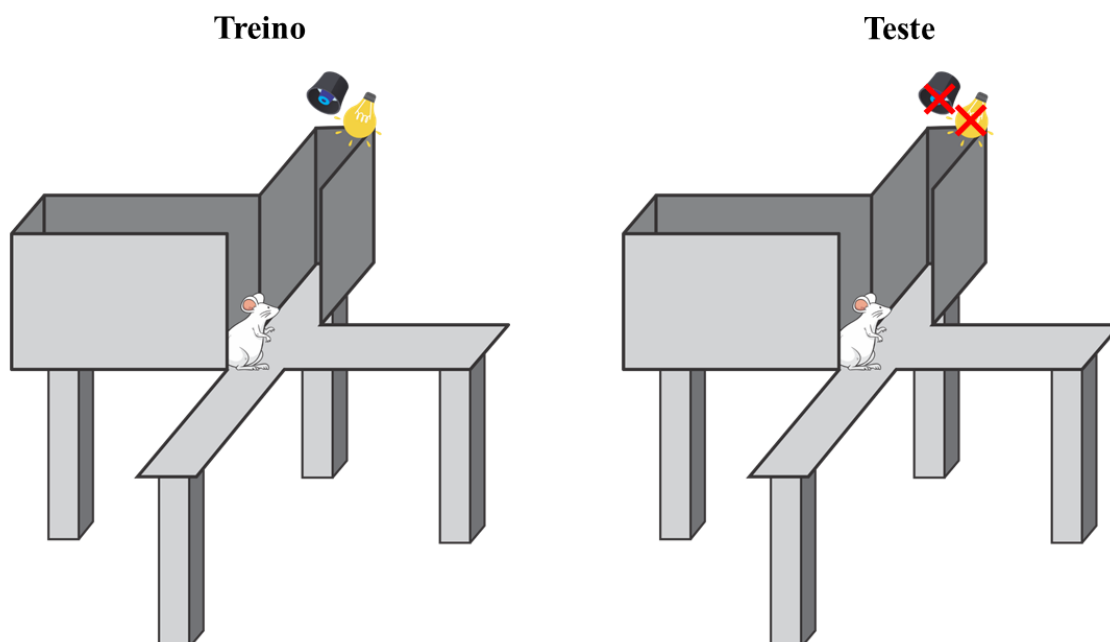


Figura 10. Aparato para realização do teste comportamental labirinto em cruz elevado modificado. Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

Medo condicionado ao contexto

O teste de medo condicionado ao contexto foi utilizado para avaliação da memória. Os animais foram submetidos a um protocolo de condicionamento pavloviano. O aparato consiste em uma caixa de condicionamento ($22 \times 22 \times 25$ cm) com piso forrado com barras de aço inoxidável que geram choques elétricos na pata dos animais. Nesse teste, a caixa que forma o aparato consiste no estímulo condicionado e o choque elétrico no estímulo incondicionado. A prova foi dividida em duas fases (cinco minutos cada), realizadas sequencialmente em intervalos de 24 horas.

Na fase 1 ocorreu o treino de condicionamento, em que o animal foi colocado no aparelho e após 150 segundos de habituação, recebeu o primeiro choque elétrico nas patas. Nesta etapa, um esquema de seis choques elétricos de 0,3 mA (2 s cada) e intervalos (28 s) foram realizados. Na fase 2 que ocorreu 24h após a fase 1, os animais foram reexpostos ao aparato, porém sem o choque elétrico. Os animais foram avaliados quanto ao tempo de

congelamento (animal completamente parado, com um tempo mínimo de 10 segundos, orelhas arqueadas, demonstrando atenção, e pelos eriçados) na fase 1 e na fase 2 do teste (Cavalcante *et al.*, 2020).

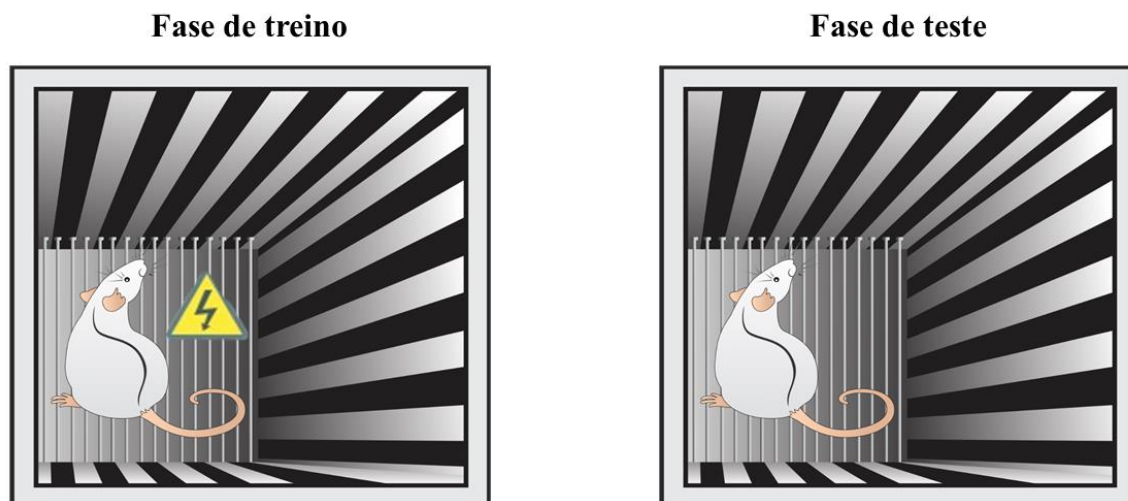


Figura 11. Aparato para avaliação do medo condicionado ao contexto. Fonte: Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

4.7 Perfusão dos animais e processamento do cérebro

Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina i.m. nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, pela via intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, foi realizada uma incisão longitudinal na cavidade torácica, seccionando a pele, músculo e costelas, para exposição da cavidade abdominal e torácica. Com o coração exposto, 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 10 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 20 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 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. Após este período os cérebros foram levados a um criostato à -20 °C para obtenção de secções frontais de 50 µm, que foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução de etilenoglicol e tampão fosfato. Cada um desses compartimentos correspondeu a 1 de 6 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte seja de aproximadamente 200 µm. Os cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e tampão fosfato e, posteriormente, conservados a 4°C até as reações de imuno-histoquímica.

4.7.1 Imuno-histoquímica

Foi realizada imunohistoquímica contra a proteína BDNF. Os cortes contidos de cada animal foram lavados 4 vezes (durante 5 minutos cada) com tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, sob agitação automática, e logo após foram pré-tratados com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena e novamente passaram por 4 lavagens (5 minutos cada) em PB. Os cortes foram colocados por 15 minutos em um tampão bloqueador (TB) composto de leite desnatado 5% em PB 0,1M, e foi feita uma lavagem com PB, sem agitar. Em seguida, as secções foram incubadas a 25°C em overnight (de 18 a 24 horas) em um anticorpo primário produzidos em Rabbit (1:1000; Santa Cruz) diluído em PB contendo Triton-X 100 a (ICN Biomedicals) 0,4% e de soro normal (Sigma Chemical Company) a 2% do animal em que foi obtido o anticorpo secundário. Após uma nova bateria de 4 lavagens em PB, as secções foram colocadas em contato por 120 minutos com o anticorpo secundário biotinilado (anti-Rabbit), na concentração de 1:750, diluído em uma solução de Triton-X 100 a 0,4% em PB 0,1 M. Logo em seguida, os cortes foram novamente passados por uma bateria de 4 lavagens em PB e foram incubados numa solução de Avidina-Biotina-Peroxidase (Vectastain Standard ABC kit, Vector Labs, USA; 2% da solução total) mais Triton-X 100 NaCl, por 120 minutos, e foram lavados novamente 4 vezes em PB. Para revelar a reação, os cortes foram colocados em contato com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4). Então foram realizadas 4 lavagens dos tecidos (5 minutos cada) com PB a 0,1 M e pH 7,4. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secas em temperatura ambiente, e posteriormente mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05%, por 30 segundos, para intensificação da reação.

4.7.2 Avaliação da densidade Óptica Relativa (DOR)

As imagens foram obtidas em um mesmo momento, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste, sendo que os valores em pixels encontrados em cada imagem correspondem a uma intensidade maior ou menor de marcação da proteína analisada. Cada animal foi representado por 4 imagens hipocampo (CA1, CA3 e giro denteado (GD), córtex entorrinal e amígdala. Foi utilizado o atlas The Rat Brain (Paxinos e Watson's, 2017) para localização anatômica das áreas, que foram analisadas utilizando o software Image J (versão 1.6.0, NIH). Na mesma imagem também foram selecionadas um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação no tecido. O número médio de pixels calculados nos campos de interesse foi subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido.

4.7.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal para todas as variáveis nos testes comportamentais. Em seguida foram aplicados testes paramétricos apropriados. Os dados comportamentais do campo aberto foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Fisher para avaliação da distância total percorrida e tempo no centro. Para avaliar a interação do tempo na distância percorrida no teste de campo aberto, utilizou-se a ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher. Os dados comportamentais do labirinto em cruz elevado modificado e medo condicionado ao contexto foram submetidos a ANOVA de duas vias com e sem medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher. Os dados do teste de labirinto em cruz elevado foram submetidos a ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Fisher. Para avaliação da imunorreatividade para BDNF os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Willk, apresentando uma distribuição não normal, sendo utilizado o teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significativas. Para realização das análises foram utilizados o *Graphpad Prism 8.0* (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA).

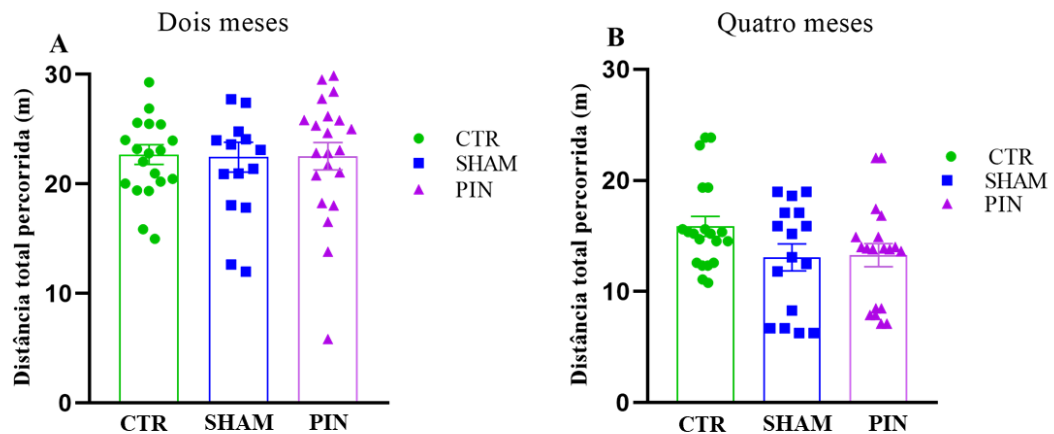
5. RESULTADOS

5.1 Testes comportamentais

Campo Aberto

Para a distância total percorrida com dois meses (Figura 12-A) a ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa ($F(2, 54) = 0,010$; $p=0,989$). A ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os grupos para o parâmetro distância total percorrida com quatro meses (Figura 12-B) ($F(2, 52) = 2,330$; $p=0,107$).

No parâmetro tempo no centro com dois meses (Figura 12-C), a ANOVA de uma via mostrou diferença significativa no tratamento entre os grupos ($F(2, 54) = 6,129$; $p=0,004$). O teste de Fisher LSD evidenciou que os animais do grupo PIN passaram menos tempo no centro comparados aos CTR ($p = 0,001$) e SHAM ($p=0,037$). Com quatro meses, também foi observado através da ANOVA de uma via diferença no tratamento entre os grupos, ($F(2, 54) = 11,31$; $p < 0,001$) (Figura 12-D). O teste de Fisher LSD evidenciou que o grupo PIN permaneceu menos tempo no centro quando comparado com o CTR ($p < 0,001$) e com o grupo SHAM ($p = 0,014$).



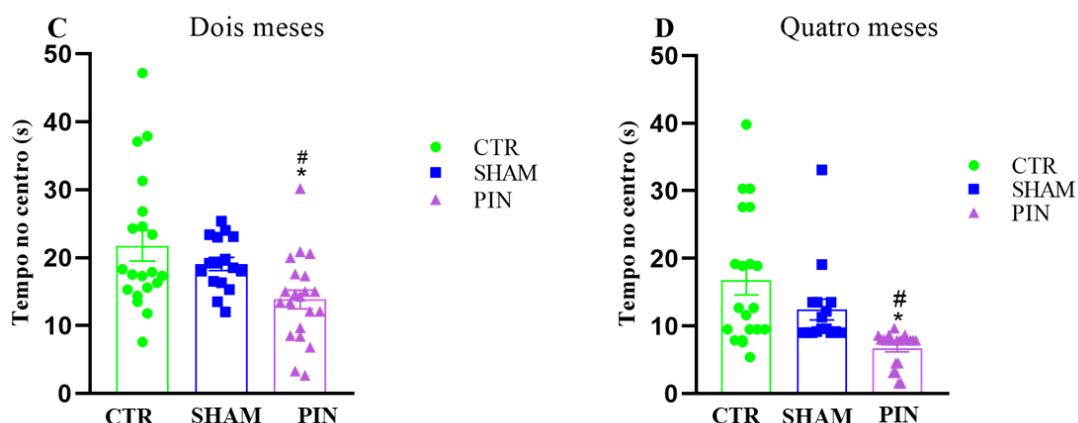


Figura 12. Avaliação da distância total percorrida com dois (A) e quatro meses (B); tempo no centro do campo aberto com dois (C) e quatro meses (D) de vida. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM; & $p < 0,05$ comparado ao grupo pin (ANOVA unidirecional seguido de pós-teste Fisher LSD). CTR= controle; SHAM= SHAM; PIN= Pinealectomizado).

Campo aberto comparação entre as fases

A avaliação no teste de campo aberto, utilizando a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, para avaliar os grupos experimentais com dois meses e quatro meses no parâmetro distancia total percorrida (Figura 13-A), revelou efeito significativo do tempo ($p = <0,001$), mas não do tratamento ($p = 0,3130$). O pós-teste de Fisher revelou que o grupo CTR ($p = <0,001$); SHAM ($p = 0,003$); PIN ($p = <0,001$) com dois meses, diminuíram a distância percorrida quando comparado com os quatro meses.

No parâmetro tempo no centro (Figura 13-B), quando comparado dois meses com quatro meses a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, revelou efeito do tempo $F(1,000, 20,00) = 23,75$; ($p = 0,001$) e do tratamento $F(1,312, 26,25) = 18,22$; ($p = 0,001$). O pós-teste de Fisher revelou que o grupo SHAM ($p = 0,009$) e PIN ($p = 0,002$) com dois meses, diminuíram o tempo no centro quando comparado com os quatro meses, mas não houve diferença para o grupo controle ($p = 0,150$).

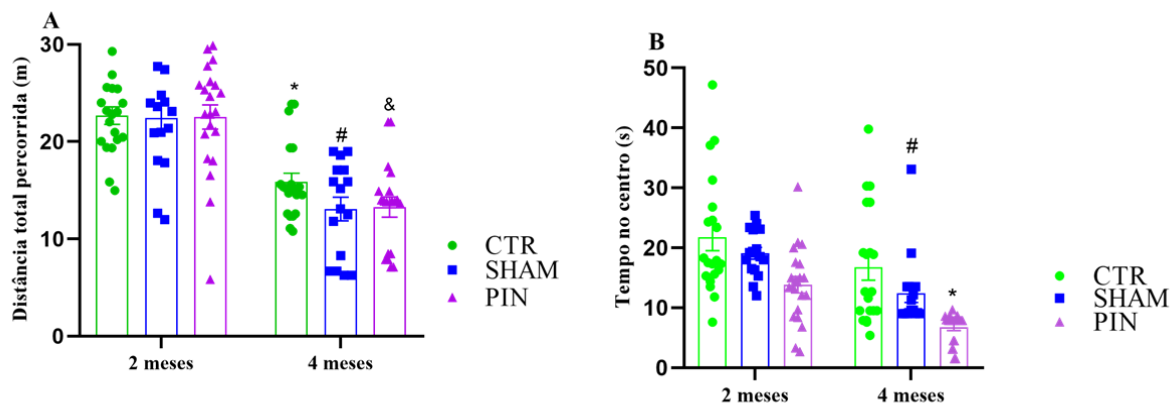


Figura 13. Avaliação do campo aberto, comparação de dois meses com quatro meses no parâmetro distância total percorrida (A); tempo no centro (B). Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM; & $p < 0,05$ comparado ao grupo pin (A). * $p < 0,05$ comparado ao grupo PIN; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM (ANOVA bidirecional seguido de pós-teste Fisher LSD). CTR= controle; SHAM= SHAM; PIN= Pinealectomizado).

Labirinto em cruz elevado

No teste de labirinto em cruz elevado com dois meses de idade (Figura 14-A), a ANOVA de uma via mostrou diferença significativa no tratamento entre os grupos no braço aberto ($F(2, 21) = 13.18$; $p = 0,002$) e no braço fechado $F(2, 21) = 3,620$; ($p = 0,044$). O teste de Fisher LSD mostrou que o grupo PIN-ANS permaneceu menos no braço aberto quando comparado com o CTR-ANS ($p = 0,003$) e com o SHAM-ANS ($p < 0,001$). O teste de Fisher LSD também mostrou que o grupo PIN-ANS permaneceu por mais tempo no braço fechado quando comparado com o CTR-ANS ($p = 0,022$) e como SHAM-ANS ($p = 0,049$).

Na avaliação do comportamento tipo-ansioso no teste de labirinto em cruz elevado com quatro meses de idade, através da ANOVA de uma via, foi observada diferença significativa no tratamento entre os grupos no braço aberto ($F(2,20) = 7.860$; $p = 0,003$) e braço fechado $F(2,20) = 8.768$; $p = 0,001$ (Figura 14-B). O teste de Fisher LSD mostrou que os animais do grupo PIN-ANS permaneceram menos tempo no braço aberto quando comparado com o CTR-ANS ($p = 0,005$) e SHAM-ANS ($p = 0,001$). No braço fechado, o grupo PIN-ANS permaneceu por mais tempo quando comparado com o grupo CTR-ANS ($p = 0,003$) e o grupo SHAM-ANS ($p = 0,001$).

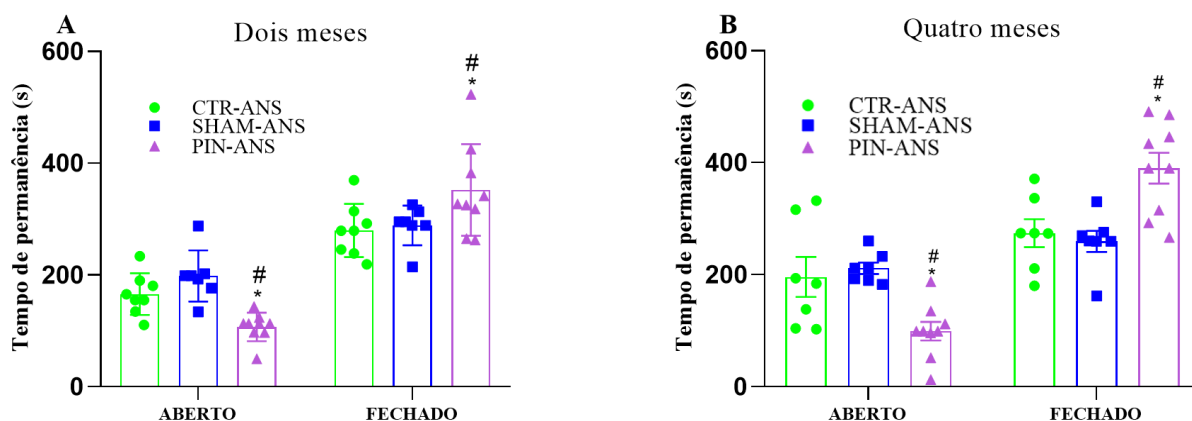


Figura 14. Avaliação do tempo de permanência no braço aberto e no braço fechado com dois (A) e (B) quatro meses no teste de labirinto em cruz elevado. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente, * $p < 0,05$ PIN em relação ao grupo CTR; # $p < 0,05$ PIN comparado ao grupo SHAM. ANOVA de uma via seguida de Fisher LSD (B). CTR-ANS= controle ansiedade; SHAM-ANS= sham ansiedade; PIN-ANS= Pinealectomizado ansiedade.

Labirinto em cruz elevado modificado

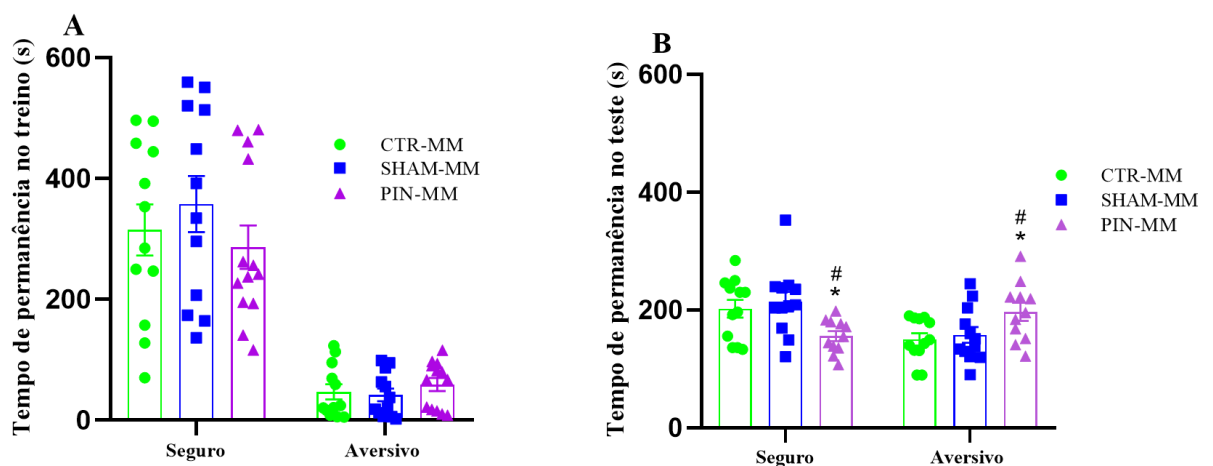
No teste de labirinto em cruz elevado modificado com dois meses de idade, durante a fase de treino (Figura 15-A), não foi observada diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência nos braços ($F(1,984, 43,65) = 0,962$; ($p = 0,389$)). Na fase de teste (Figura 15-B), foi observada diferença significativa no tempo de permanência nos braços entre os grupos ($F(2, 40) = 9,440$; ($p < 0,001$)). O teste de Fisher LSD mostrou que o grupo PIN-MM permaneceu menos tempo no braço seguro quando comparado com os grupos CTR-MM ($p = 0,011$) e SHAM-MM ($p = 0,028$). Além disso, o grupo PIN-MM permaneceu por mais tempo no braço aversivo quando comparado com o CTR-MM ($p = 0,023$) e com o SHAM-MM ($p = 0,046$).

Durante a avaliação minuto a minuto na fase de treino, foi realizada uma análise intragrupo, através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste de Fisher, podendo ser observado que os animais dos grupos CTR-MM ($p < 0,000$), SHAM-MM ($p = 0,002$) e PIN-MM ($p = 0,003$), mostraram diferença significativa no aumento do tempo no braço seguro (15-C) nos minutos 4-7 em relação aos minutos 1-3. E somente, os grupos CTR-MM ($p = 0,005$) e SHAM-MM ($p = 0,007$) foram diferentes nos minutos 8-10 em relação aos minutos 4-7. O grupo PIN-MM nos minutos 8-10 mostrou-se diferente dos minutos 1-3 ($p = 0,023$).

No braço aversivo durante o treino o grupo CTR-MM mostrou diferença entre os minutos 8-10 em relação aos minutos 1-3 ($p = 0,002$) e 4-7 ($p = 0,017$), apresentando uma redução no tempo de exploração nesse braço. Os animais dos grupos SHAM-MM ($p = 0,002$) e

PIN-MM ($p=0,003$) mostraram diferença nos minutos 8-10 quando comparado com os minutos 1-3 e os grupos SHAM-MM ($p=0,019$) e PIN-MM ($p=0,037$) nos minutos 8-10 foram diferentes comparado com os minutos 4-7 (Figura 15-D). Observando uma redução na exploração do braço aversivo.

Durante a fase de teste, a avaliação minuto a minuto no braço seguro (Figura 15-E), através da ANOVA de duas vias mostrou diferença entre os grupos no tempo de permanência dos braços ($F(1,989, 21,88) = 3,954$; ($p=0,034$)). O teste de Fisher LSD mostrou diferença significativa entre o grupo PIN-MM, que permaneceu por menos tempo no braço seguro, comparado com o CTR-MM entre o minuto 1 e 3 ($p = 0,026$). O mesmo foi observado entre o grupo PIN-MM, que permaneceu por menos tempo no braço seguro, comparado com o SHAM-MM ($p = 0,045$). No braço aversivo, a ANOVA de duas vias mostrou diferença entre os grupos no tempo de permanência no braço ($F(1,889, 20,78) = 5,676$; ($p = 0,011$)). O teste de Fisher LSD mostrou diferença significativa entre o grupo PIN-MM, que permaneceu por mais tempo no braço aversivo, comparado com o CTR-MM entre o minuto 1 e 3 ($p=0,045$). O mesmo foi observado entre o grupo PIN-MM, que permaneceu por mais tempo no braço aversivo, quando comparado com o SHAM-MM ($p = 0,046$). Essa diferença também foi observada entre o minuto 4 e 7 para o grupo PIN-MM, que permaneceu por mais tempo no braço aversivo, quando comparado com o CTR-MM ($p = 0,019$) e comparado com o SHAM-MM ($p = 0,028$) (Figura 15-F).



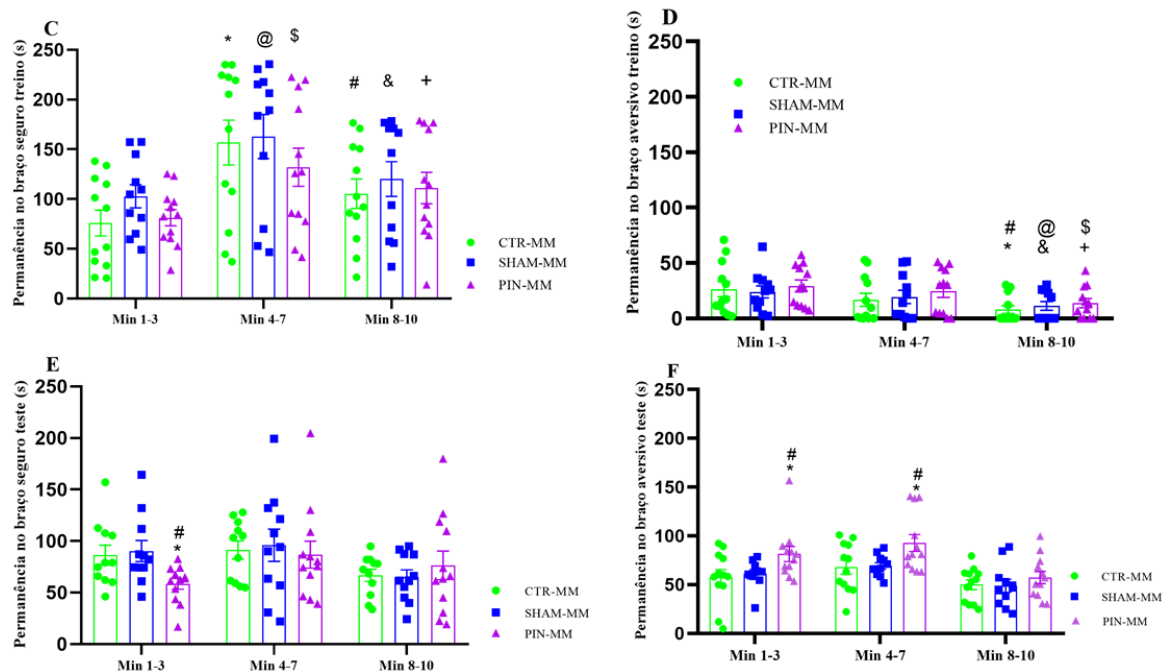


Figura 15. Avaliação do tempo permanência no teste do labirinto cruzado elevado modificado. Tempo de permanência no braço seguro e no braço aversivo durante o treino (A) e o teste (B). Tempo de permanência minuto a minuto no braço seguro (C) e no braço aversivo (D) na fase de treino. Tempo de permanência minuto a minuto no braço seguro (E) e no braço aversivo (F) na fase de teste. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatísticas. (A e B) $*p < 0,05$ PIN em relação ao grupo CTR; $\#p < 0,05$ PIN em relação ao grupo SHAM (ANOVA bidirecional seguida de pós-teste Fisher LSD). (C) $*p < 0,05$ CTR min 4-7 em relação ao min 1-3; $@p < 0,05$ SHAM min 4-7 em relação ao min 1-3; $\$p < 0,05$ PIN min 4-7 em relação ao min 1-3; $\#p < 0,05$ CTR min 8-10 em relação ao min 4-7; $\&p < 0,05$ SHAM min 8-10 em relação ao min 4-7; $+p < 0,05$ PIN min 8-10 em relação ao min 1-3. (D) $*P < 0,05$ CTR min 8-10 em relação ao min 1-3; $\# P < 0,05$ CTR min 8-10 em relação ao 4-7; $\& p < 0,05$ SHAM min 8-10 em relação ao min 1-3; $@ p < 0,05$ SHAM min 8-10 em relação ao min 4-7; $+ p < 0,05$ PIN min 8-10 em relação ao min 1-3; $\$ p < 0,05$ PIN min 8-1 em relação ao min 4-7. (ANOVA bidirecional com medidas repetidas seguida de pós-teste Fisher LSD). (E e F) $*p < 0,05$ PIN em relação ao grupo CTR; $\#p < 0,05$ PIN em relação ao grupo SHAM. (ANOVA bidirecional seguida de pós-teste Fisher LSD). CTR-MM= controle memória; SHAM-MM= sham memória; PIN-MM= Pinelectomizado memória.

Medo condicionado ao contexto

No teste de medo condicionado ao contexto, a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa entre os grupos no parâmetro tempo de freezing (Figura-16), ($F(1,483, 16,31) = 4,804$; ($p = 0,031$). Seguindo do pós-teste de Fisher LSD, não foi observada diferença entre os grupos na fase de pré-condicionamento, porém na fase de condicionamento houve um aumento

no tempo de freezing do grupo PIN-MM quando comparado com o CTR-MM ($p = 0,042$). Na fase de teste o grupo PIN-MM apresentou um aumento no tempo de freezing quando comparado com o CTR-MM ($p = 0,003$) e com o SHAM-MM ($p = 0,047$).

Utilizando a ANOVA de duas vias com medidas repetidas para avaliar as diferenças intergrupos, observou-se que os grupo CTR-MM ($<0,001$), SHAM-MM ($<0,001$) e PIN-MM ($<0,000$) apresentaram diferença significativa da fase de teste quando comparado com o pré-condicionamento. Assim como os grupos CTR-MM ($<0,001$), SHAM-MM ($<0,001$) e PIN-MM ($<0,001$) na fase de teste mostrou-se diferente da fase de condicionamento.

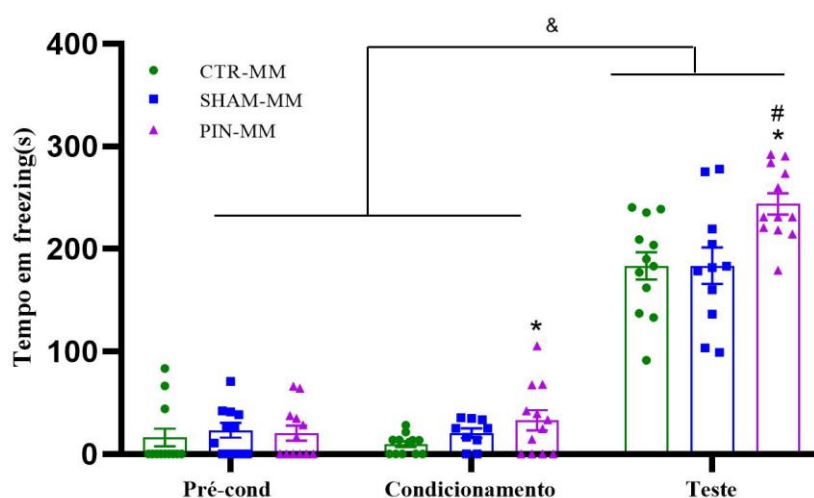


Figura 16. Avaliação do tempo de freezing no teste de medo condicionado ao contexto durante as fases de pré-condicionamento, condicionamento e teste. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente, * $p < 0,05$ em relação ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM; & $p < 0,05$ comparado com o pré-cond e condicionamento (ANOVA bidirecional seguida de pós-teste Fisher LSD). CTR-MM= controle memória; SHAM-MM= sham memória; PIN-MM= Pinealectomizado memória.

5.2 Imunorreatividade para BDNF

As análises imunorreativas para BDNF foram feitas nas áreas CA1, CA3, giro denteado, córtex entorrinal do hipocampo e amígdala, que são áreas envolvidas nos processos de plasticidade sináptica, modulando a emoção e a cognição. Os resultados foram divididos em experimento ansiedade, no qual os animais foram submetidos ao ambiente enriquecido para avaliar alterações de plasticidade, e experimento memória no qual os animais após passarem

pela fase de teste no medo condicionado ao contexto foram perfundidos, para avaliação da plasticidade após um estímulo aversivo.

Experimento ansiedade

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk, apresentando uma distribuição não normal. Deste modo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O pós-teste de Dunn, revelou que o grupo PIN mostrou redução na densitometria na região CA1, quando comparado com o grupo CTR ($p=0,044$) (Figura 17- A). O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre os grupos nas regiões CA3 ($p=0,277$) (Figura 17-B); giro denteado ($p=0,160$) (Figura 17-C); córtex entorrinal ($p=0,742$) (Figura 17- D) e amígdala ($p=0,510$) (Figura 17-E).

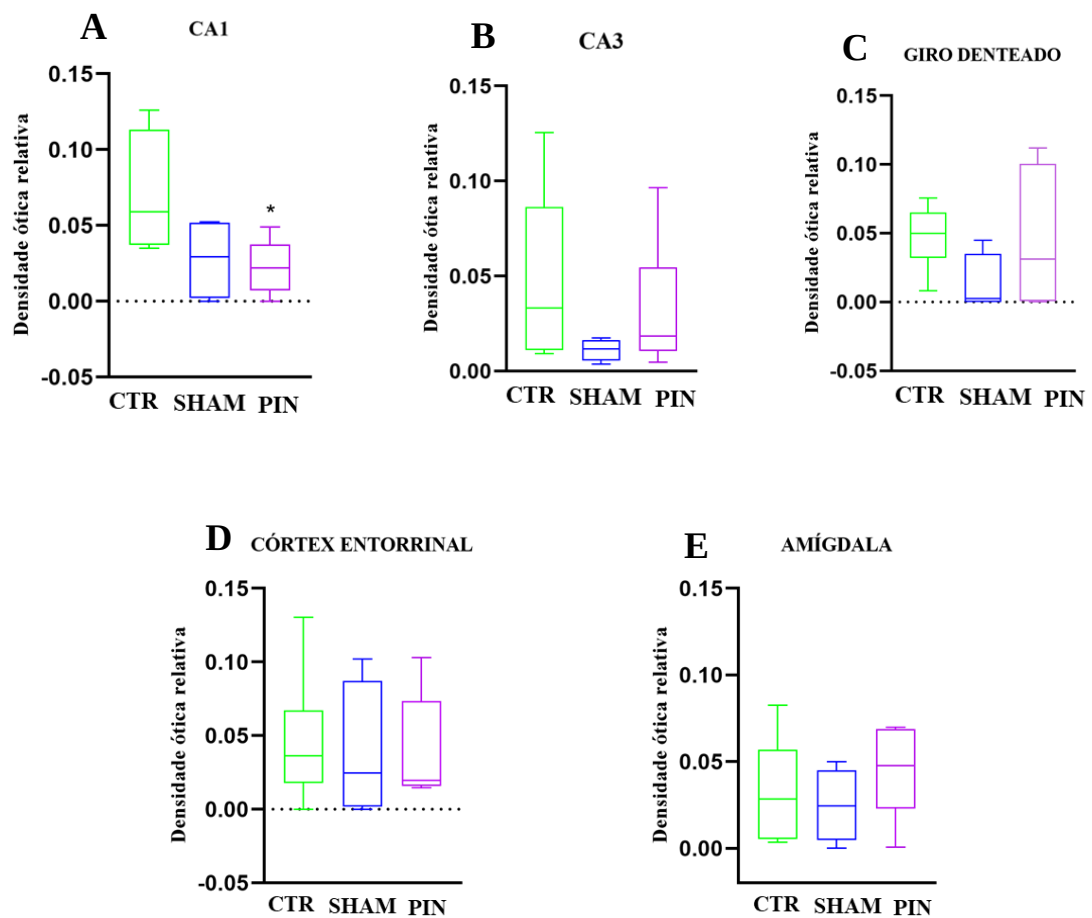


Figura 17. Efeito da pinealectomia nas alterações de plasticidade avaliadas pela densidade óptica relativa para BDNF nas regiões CA1 (A); CA3 (B); giro denteado (C); córtex entorrinal (D) e amígdala (E), após exposição a um ambiente enriquecido. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente, $*p < 0,05$ em relação ao grupo CTR (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn). CTR (Controle); SHAM (SHAM); PIN (Pinealectomizado).

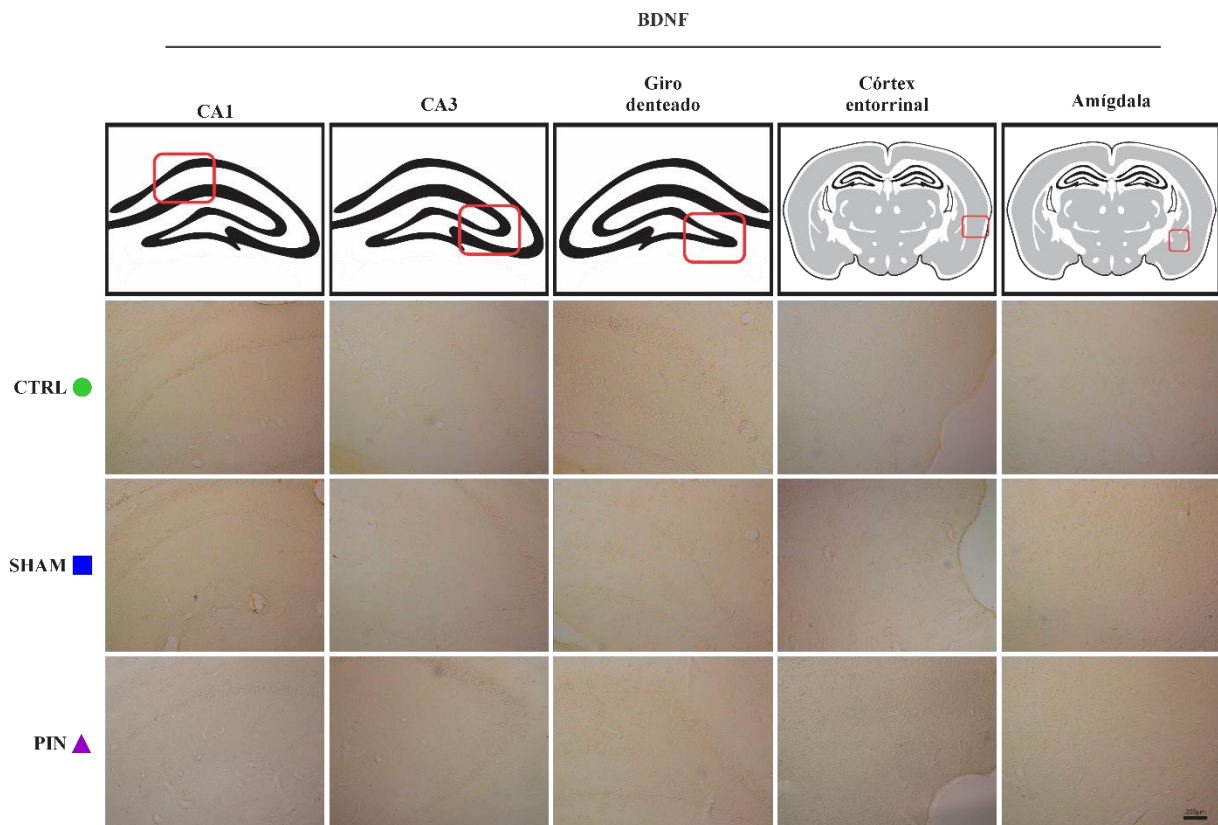


Figura 18. Imagens representativas da imunomarcção para BDNF nas regiões CA1, CA3, giro denteado, córtex entorrinal e amígdala. CTR (Controle); SHAM (SHAM); PIN (Pinelaectomizado).

Experimento memória

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wik, apresentando uma distribuição não normal. Deste modo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, podendo ser observado diferença significativa na região CA1 ($p = 0,010$), seguido do pós-teste de Dunn o grupo PIN apresentou um aumento da densitometria quando comparado com o grupo CTR ($p = 0,020$) e SHAM ($p = 0,008$) (Figura 19- A). O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença significativa entre os grupos experimentais na região CA3 ($p = 0,015$). O pós-teste de Dunn revelou que o grupo PIN apresentou uma maior densidade para BDNF quando comparado com o CTR ($p = 0,044$) e SHAM ($p = 0,008$) (Figura 19-B).

Na região do giro denteado (Figura 19- C) o teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os grupos ($p= 0,038$). O pós-teste de Dunn revelou que o grupo PIN apresentou maior densitometria quando comparado com o grupo SHAM ($p= 0,041$). O teste de Kruskal-Wallis mostrou que os grupos apresentam diferença significativa na região do córtex entorrinal ($p= 0,015$), seguido do pós-teste de Dunn, o grupo PIN apresenta aumento na densitometria quando comparado com o CTR ($p= 0,013$) e SHAM ($0,018$) (Figura 19- D).

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que os grupos apresentam diferença significativa na região da amígdala ($p= 0,027$), seguido do pós-teste de Dunn, observou-se que o grupo PIN apresenta aumento da densidade para BDNF comparado com o grupo SHAM ($p= 0,03$) (Figura 19-E).

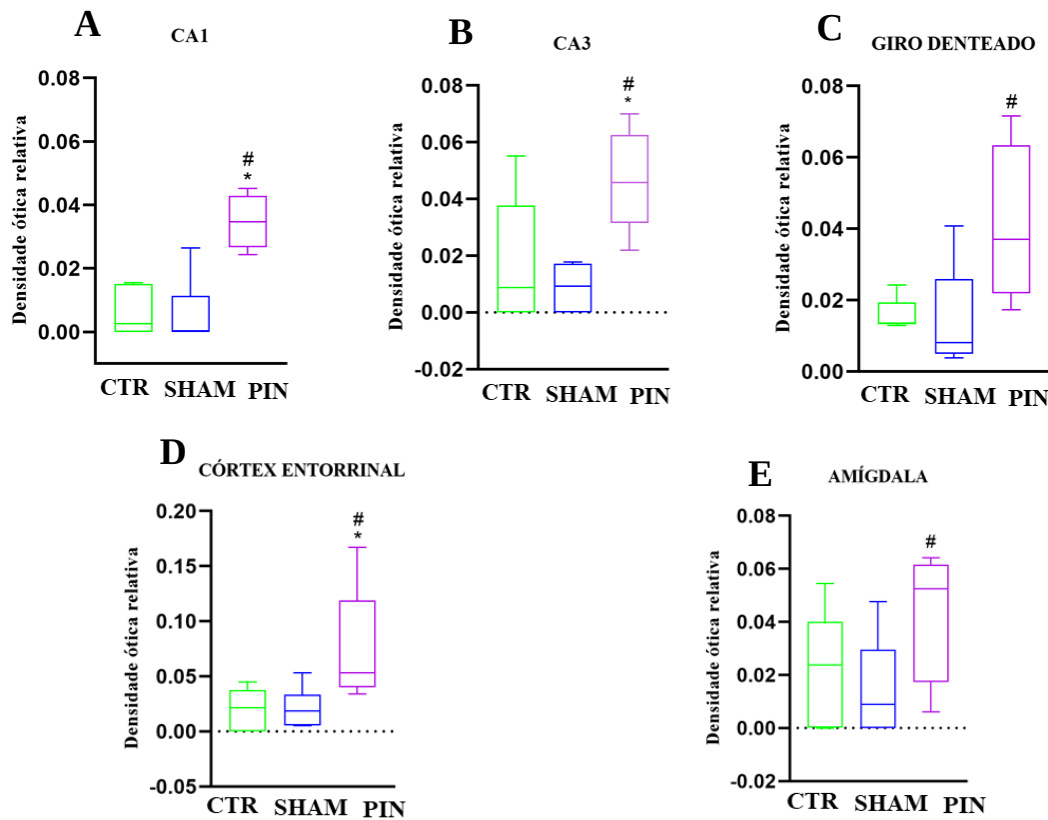


Figura 19. Efeito da pinealectomia nas alterações de plasticidade avaliadas pela densidade óptica relativa para BDNF nas regiões CA1 (A); CA3 (B); giro denteado (C); córtex entorrinal (D) e amígdala (E), após exposição a um protocolo de medo condicionado ao contexto. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro
Efeito da pinealectomia sob as alterações de plasticidade avaliadas pela densidade óptica relativa para BDNF nas regiões CA1 (A); CA3 (B); giro denteado (C); córtex entorrinal (D) e amígdala (E). Os dados

foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente, $*p < 0,05$ em relação ao grupo CTR; (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn). CTR (Controle); SHAM (SHAM); PIN (Pinelectomizado). da média ($\pm$ E.P.M.) e nível de significância de $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente, $*p < 0,05$ em relação ao grupo CTR; $\#p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn). CTR (Controle); SHAM (SHAM); PIN (Pinelectomizado).

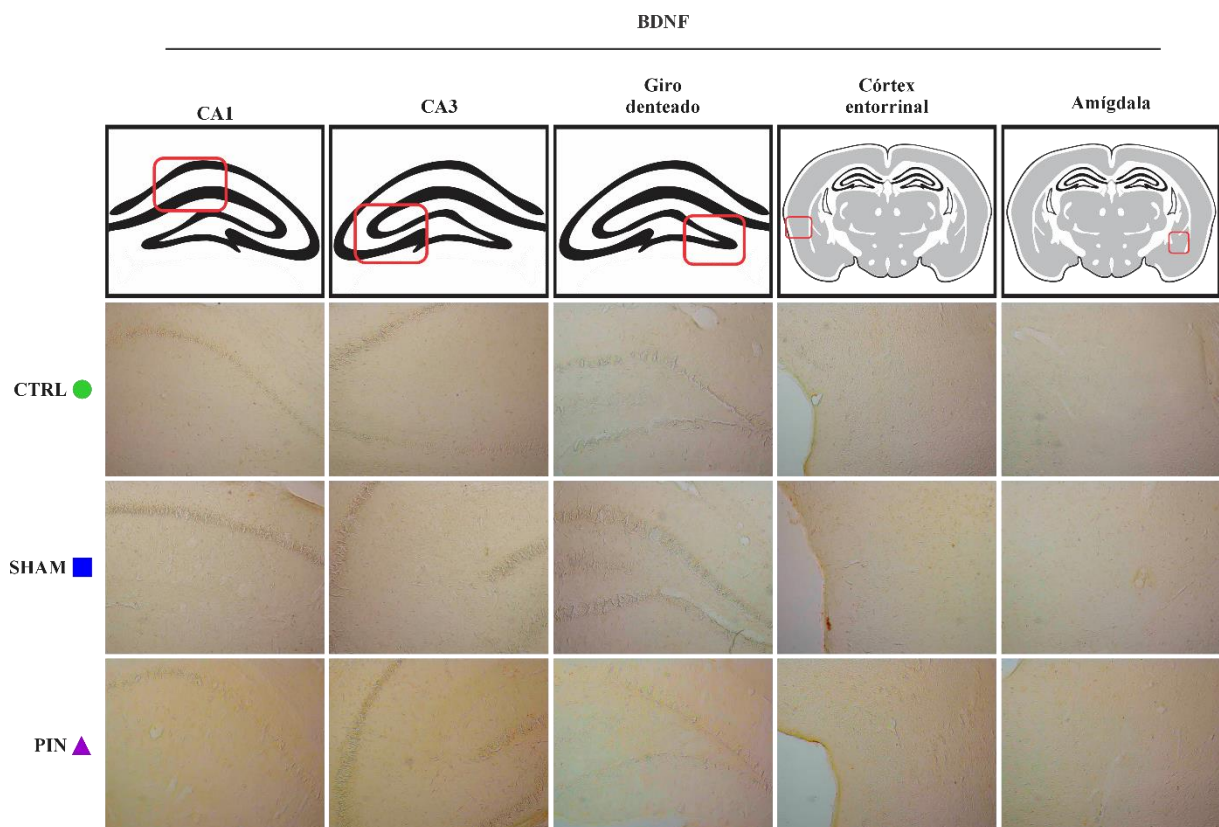


Figura 20. Imagens representativas da imunomarcção para BDNF nas regiões CA1, CA3, giro denteado, córtex entorrinal e amígdala. CTR (Controle); SHAM (SHAM); PIN (Pinelaectomizado).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, buscamos avaliar as possíveis alterações que a pinealectomia pode causar na plasticidade cerebral, resultando em alterações no comportamento tipo-ansioso e na memória aversiva de roedores. Foi observado que os animais pinealectomizados apresentaram aumento do comportamento tipo ansioso, evidenciado pela diminuição no tempo no centro no teste de campo aberto realizado com 2 e 4 meses de vida, aumento no tempo de permanência no braço fechado no labirinto em cruz elevado com 2 e 4 meses, e diminuição no tempo de

permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Os animais do grupo PIN também apresentaram prejuízo na memória aversiva, evidenciado pelo aumento do tempo de permanência no braço aversivo no teste do labirinto em cruz elevado modificado com 2 meses. Vale salientar que os animais cirurgiados não apresentaram prejuízo motor com 2 e 4 meses, conforme observado no teste de campo aberto, em que os animais dos 3 grupos não mostraram diferença na distância total percorrida.

A pinealectomia consiste em uma técnica cirúrgica, capaz de remover a glândula pineal, onde ocorre a maior síntese e liberação de melatonina. Resultando em alterações na ritmicidade e liberação deste hormônio, e por consequência diminuição dos níveis circulantes de melatonina. O déficit deste hormônio está associado a alterações comportamentais, bem como aumento do comportamento tipo ansioso em roedores (Simko *et al.*, 2013). Nessa perspectiva podemos destacar a importância e relevância deste trabalho em mostrar de forma crônica alterações de ansiedade e de memória aversiva em ratos pinealectomizados ainda na infância/juventude, podendo ser observado que essas alterações perduram até a fase adulta. Nos trabalhos presentes na literatura, em que se avalia o efeito da pinealectomia no comportamento de roedores é comum observar que as investigações se restringem somente a uma fase específica do desenvolvimento (Koc *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017; Tzoneva *et al.*, 2021). No entanto, no nosso trabalho foi possível observar alterações comportamentais ao longo do desenvolvimento desses animais.

As alterações no comportamento tipo-ansioso de roedores podem ser visualizadas utilizando ferramentas como aparatos comportamentais. Esses animais apresentam hábitos noturnos, mostrando uma preferência por ambientes fechados e escuros, evitando ambientes e espaços abertos, luminosos e altos (Pi *et al.*, 2020; Shanazz *et al.*, 2021; Steimer, 2011). O teste de campo aberto é um aparato que avalia o comportamento exploratório dos animais. Além disso, é possível identificar alterações no comportamento tipo-ansioso dos animais, uma vez que o centro do aparato representa uma área desprotegida. Desse modo, os animais tendem a passar mais tempo na periferia, representada pela área próxima as paredes do aparato (Lezak; Missig; Carlezon, 2017; Seibenhener; Wooten, 2015). A distância total percorrida também é outro parâmetro que pode ser avaliado em roedores, utilizando o teste de campo aberto. No entanto, quando os animais são reexpostos mais de uma vez ao aparato ocorre o efeito de habituação (Reis *et al.*, 2021).

Desta forma observamos que os resultados do teste de campo aberto realizados com dois e quatro meses de idade para avaliação do tempo no centro, mostraram alterações do comportamento tipo-ansioso no grupo PIN, como menciona a literatura nos estudos desenvolvidos por Pi *et al.*, (2020); Xie *et al.* (2022) observaram que o tratamento com melatonina aumentou o tempo gasto no centro do aparato de campo aberto, em roedores com lesão cerebral traumática, como também aumentou o número de entradas e o tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

O labirinto em cruz elevado também representa uma ferramenta para avaliar o comportamento tipo-ansioso de roedores, uma vez que o aparato possui dois braços abertos, representando perigo para os roedores, e dois braços fechados, nos quais representam um espaço seguro, devido às características inatas desses animais. Desta forma, com a utilização deste aparato pode ser avaliado o tempo e o número de entradas dos animais em cada braço (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019).

Nossos resultados apontam alterações no comportamento tipo-ansioso no grupo PIN-ANS, quando comparado com o CTR-ANS e SHAM-ANS com dois e quatro meses no teste de labirinto em cruz elevado, uma vez que este grupo permaneceu por mais tempo no braço fechado, evitando o braço aberto. Corroborando os dados da literatura que mostraram aumento no comportamento tipo-ansioso em ratos pinealectomizados, no teste de labirinto em cruz elevado, em que os animais reduziram o número de entradas nos braços abertos e o tempo de exploração nesse braço (Mohammadi; Zahmatkesh, 2023; Simko *et al.*, 2013). Esses resultados apoiam um possível papel ansiolítico da melatonina e que a sua diminuição está diretamente relacionada com alterações no comportamento tipo-ansioso.

Estudos com humanos observaram o efeito ansiolítico da melatonina em pacientes pré e pós-operatórios, atuando como adjuvante de medicamentos anestésicos e analgésicos, prevenindo delírios do pós-operatório (Abbasivash *et al.*, 2019; Caumo; Levandovski; Hidalgo, 2009; Patel; Kurdi, 2015). Crianças submetidas a pequenas cirurgias eletivas tiveram a ansiedade de separação pré-operatória diminuída, ao serem tratadas com melatonina, obtendo-se um efeito semelhante ao do midazolam (Impellizzeri *et al.*, 2017). Os efeitos ansiolíticos da melatonina ainda não são totalmente conhecidos, no entanto, esta molécula pode atuar de forma direta e indireta. Sua ação direta está relacionada com os seus receptores distribuídos no encéfalo, já a sua ação indireta é através da modulação do SNS, SRAA, glicocorticoides e neurotransmissores, interferindo nos processos de reação ao estresse, modificações no estresse

oxidativo e nitrosativo, devido sua característica antioxidante e anti-inflamatória. Os receptores MT1 e MT2 modulam as respostas semelhantes a ansiedade, uma vez que a distribuição desses receptores se encontra em áreas do sistema nervoso responsáveis pela modulação da ansiedade e do medo, como a amígdala, hipocampo e CPF (Huang; Yang; Li, 2017).

Um estudo com camundongos com deleção no receptor MT1 mostrou aumento do comportamento tipo-ansioso na tarefa de enterrar bolinha de gude e na exposição a um ambiente novo, os animais enterraram mais bolinhas quando comparado com o grupo controle do experimento e demoraram um tempo maior para comer em um ambiente novo (Liu; Clough; Dubocovich, 2017). Em contrapartida, a estimulação do receptor MT2 pelo UCM765 (agonista do receptor de melatonina) em ratos aumentou o tempo de exploração no braço aberto do labirinto em cruz elevado modificado (Ochoa-Sanchez *et al.*, 2012) . Indicando um comportamento ansiolítico mediado pelos receptores de melatonina. (Shanazz *et al.*, 2021).

Estudos tem mostrado que a ação ansiolítica da melatonina ocorre devido a sua capacidade de aumentar as concentrações de GABA no hipotálamo e em várias regiões do cérebro, potencializando a corrente iônica do cloreto induzida por GABA (Månsson *et al.*, 2013b; Rosenstein; Cardinali, 1986; Zhang *et al.*, 2017). Em um modelo de estresse induzido por privação de sono, foi observado que o tratamento com melatonina reduziu níveis de ansiedade através da manutenção da transmissão gabaérgica e glutamatérgica na amígdala (Zhang *et al.*, 2017).

Relativo à avaliação das alterações de memória aversiva, nossos resultados, com dois meses de vida, foram observados que os animais pinealectomizados durante a fase de treino no labirinto em cruz elevado modificado aprenderam a tarefa, juntamente com os grupos controles. No entanto, ao expor esses animais ao aparato 24 h após o treino, sem a presença do estímulo aversivo (som e luz), observa-se um prejuízo de memória, uma vez que este grupo passa mais tempo no braço aversivo e um menor tempo no braço seguro. Sugerindo assim, que a pinealectomia foi capaz de causar prejuízos no processamento da memória. Esses dados apresentam um resultado semelhante ao trabalho desenvolvido por Huang *et al.*, 2014, no qual foi observado que a ausência do receptor de MT2 causou prejuízos no desempenho da tarefa de labirinto em cruz elevado modificado. Estudos tem mostrado que a pinealectomia no zebrafisher, foi capaz de comprometer o processo de aprendizagem desse animal (Rawashdeh *et al.*, 2007; Jilg *et al.*, 2019c).

Aos quatro meses de vida foi feita uma nova avaliação para observar o desempenho dos animais na tarefa de medo condicionado ao contexto. Observou-se que durante a fase de pré-condicionamento, ou seja, habituação ao aparato que representa um condicionamento neutro, não houve diferença entre os grupos. No entanto, na fase de condicionamento em que os animais recebem um estímulo de choque nos pés, representando um estímulo aversivo incondicionado os animais pinealectomizados apresentam alterações no comportamento com resposta de congelamento aumentada em relação aos seus controles. À reexposição desses animais ao aparato 24 h após o treino, sem a presença do estímulo aversivo, mostrou que os animais pinealectomizados permaneceram com o comportamento de congelamento alterado em relação aos seus controles.

A resposta de medo tem como principal característica preparar o organismo de forma antecipada para o perigo, seja um medo com característica inata ou aprendido. A aquisição do medo condicionado exige o recrutamento da atividade de neurônios na amígdala, principal região envolvida no processamento de emoções e na resposta de medo (Nura *et al.*, 2021). A resposta de medo em roedores pode ser avaliada através de alterações comportamentais, como o congelamento associado a um estímulo contextual (Small, 1899). Segundo Bouton e Bolles (1980), no condicionamento contextual aversivo, a observação e quantificação do congelamento é eficaz para medição do medo, uma vez que roedores que não recebem o condicionamento aversivo não apresentam a resposta de congelamento. Além disso, uma única sessão de pareamento de choque e do contexto é suficiente para que o animal apresente o estado de congelamento.

O condicionamento contextual, representa uma forma de aprendizado associativo entre o estímulo condicionado e incondicionado, utilizado para avaliação de memórias aversivas. Desencadeando níveis elevados de comportamentos como ansiedade e medo persistente, associado a incapacidade de inibir a resposta de medo (Jovanovic; Ressler, 2010). Esse tipo de comportamento também está associado a uma falha na memória no que se refere a capacidade de extinção de uma memória aversiva, característica observada nos quadros de ansiedade patológica em que ocorre uma falha na extinção do medo condicionado. Podemos observar um comportamento semelhante em indivíduos que sofrem de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), em que o medo condicionado não é extinguido e os indivíduos acabam reexperimentando o evento traumático por muito tempo, mesmo sem a presença do perigo eminente. É importante destacar que o TEPT, além de se tratar de uma ansiedade patológica é

considerado também um distúrbio de memória em um contexto de condicionamento de medo pavloviano (Hayes; Van Elzaker; Shin, 2012). Em um estudo desenvolvido por Huang; Yang e Li, 2016, foi observado efeito facilitador da melatonina na extinção do medo, sugerindo que a melatonina possa atuar como um coadjuvante no tratamento de transtornos de ansiedade, como o TEPT, revertendo alterações de memórias com componente aversivo.

Vários estudos relatam uma correlação entre BDNF e doenças do cérebro, como transtornos de ansiedade e depressão (Nakahashi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). De forma intrigante, neste estudo, a expressão de BDNF foi distinta a depender do estímulo dado antes da eutanásia. Os animais do grupo PIN que foram expostos a um estímulo não-aversivo (campo aberto com objetos para exploração) apresentaram menor imunorreatividade para BDNF na região de CA1 hipocampal, comparados aos animais controles (CTL e SHAM). Enquanto nos animais do grupo PIN, que foram colocados em um ambiente aversivo (aparato do medo condicionado no dia teste), foi observado um aumento significativo da imunorreatividade para BDNF na amígdala, hipocampo e córtex entorrinal.

As neurotrofinas e a melatonina são moléculas essenciais para plasticidade neuronal, sinaptogênese, neurogênese e proteção neuronal contra estresse oxidativo. O hormônio melatonina regula o aprendizado e a memória através de sua ação nas conexões sinápticas de neurônios no SNC. Sua ação na formação de memória está relacionada com a produção de BDNF, uma neurotrófica essencial nos processos de plasticidade no que diz respeito a fase de extinção do medo (Heldt *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2008). Assim, nós hipostenizamos que a retirada da única fonte de melatonina para o sistema nervoso central pode ter causado um grande desequilíbrio na neuroproteção fisiológica, o qual culminou na liberação de BDNF desproporcional em ambas as situações (ambiente aversivo e não aversivo).

Alterações abruptas nos níveis de melatonina podem interferir diretamente na concentração circulante de BDNF, como observado no trabalho de Ogłodek *et al.* (2016). Desencadeando fatores de risco para transtornos do humor, depressão, transtorno bipolar, entre outros. No presente estudo, observamos que animais pinealectomizados, que apresentaram alterações no comportamento tipo-ansioso, quando expostos a um ambiente enriquecido tiveram redução dos níveis de BDNF na região CA1 do hipocampo. Essa diminuição pode estar associada com achados da literatura, onde mostram que animais com alterações de ansiedade apresentam níveis reduzidos de BDNF (Zou *et al.*, 2024). Como também a liberação de BDNF muda com base na tarefa de aprendizagem dependente do hipocampo (Tyler *et al.*, 2002).

No entanto, animais pinealectomizados que foram expostos ao paradigma de medo condicionado ao contexto, apresentaram uma maior imunorreatividade ao BDNF, quando comparado com os grupos controles nas regiões do hipocampo (CA1 (Figura 18-A), CA3 (Figura 18-B), giro denteado (Figura 18-C), córtex entorrinal (Figura 18-D) e na amígdala (Figura 18-E). Essas áreas atuam em conjunto modulando os processos de emoção, bem como na modulação dos processos de memória. A amígdala recebe informações do hipocampo através do núcleo basolateral, que processa e codifica as informações de caráter emocional. Após a codificação das informações a amígdala central é a responsável por enviar suas projeções para outras estruturas como o hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo (Gale *et al.*, 2004; Fanselow; Gale, 2003; Ledoux, 2000). As regiões do hipocampo e da amígdala são amplamente moduladas pela expressão de BDNF (Shimizu *et al.*, 2003). Esses resultados apontam que a expressão de BDNF em regiões de processamento de emoções e da memória parece ser dependente do tipo e da intensidade do estímulo.

Em uma meta-análise publicada por Zou *et al.* (2024) foi constatado que os níveis de BDNF no Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) apresentam uma elevação, diferentemente do padrão observado em outros distúrbios psiquiátricos. Os pesquisadores explicam que o intervalo de tempo decorrido desde a ocorrência do trauma até a coleta de amostras sanguíneas pode exercer uma influência marcante nos níveis de BDNF. A elevação na concentração sérica de BDNF no contexto do TEPT sugere que os níveis aumentados após o trauma podem representar um mecanismo compensatório protetor, possivelmente visando a restauração da plasticidade neural e a intensificação do potencial de reparo neural. Adicionalmente, a concentração mais elevada de BDNF pode desempenhar uma função intrínseca na fisiopatologia do TEPT.

Os dados deste estudo são semelhantes com achados na literatura onde observaram que durante uma situação aversiva ou traumática, o evento estressor associado com a emoção resulta em uma resposta exagerada ou potencializada. Os estudos desenvolvidos por Hawley e Morch (2012); Simone Hauck (2010); Nooshinfar, Meisami e Baghban (2011); Ward, Summers, Vickers (2014), observaram a influência do BDNF e do estresse na consolidação da memória. A expressão de BDNF no hipocampo atua mediando os processos de aprendizagem dependente de estímulos externos. Na presença de estímulos estressores, os níveis de BDNF podem aumentar rapidamente devido a uma estimulação neuronal excessiva.

Estudos utilizando um agonista (agomelatina) dos receptores MT1 e MT2 de melatonina, observaram que houve proteção estrutural e neuroquímica na amígdala, como também inibição do efluxo de sinalizações glutamatérgicas em roedores expostos a estresse de contenção e estresse por choque nas patas (Grillo *et al.*, 2015; Reagan *et al.*, 2012). Podendo concluir que a melatonina e seus análogos exercem funções primordiais na manutenção e na qualidade da formação de processos de plasticidade, bem como sua diminuição está associada a alterações plásticas, principalmente em contextos que envolvem exposição a componentes aversivos.

7. CONCLUSÃO

- Os animais pinealectomizados apresentaram aumento no comportamento tipo-ansioso na fase juvenil e adulta;
- A diminuição da melatonina ocasionou prejuízos de memória num contexto aversivo;
- A pinealectomia causou alterações de plasticidade, como observado na expressão aumentada de BDNF no hipocampo, amígdala e córtex entorrinal após estímulo aversivo; e expressão diminuída de BDNF na região de CA1, do hipocampo, após exposição a um ambiente não aversivo.
- Os dados trazem evidências claras de que a melatonina desempenha funções importantes nos aspectos de ansiedade e memória, e a sua diminuição está diretamente atrelada a alterações de componentes emocionais e cognitivos.

8. PERSPECTIVAS

No presente trabalho observamos que a diminuição da melatonina pela retirada da glandula pineal foi capaz de alterar o comportamento tipo-ansioso de ratos machos e também ocasionou prejuízos de memória e aumento da resposta de medo, resultante de alterações na plasticidade. No entanto, esses resultados abrem novas lacunas para entender como a melatonina pode estar atuando na sinalização de neurotransmissores específicos que modulam aspectos da emoção e da cognição. Bem como, se faz necessário novos estudos que busquem comparar essas alterações comportamentais em ratos machos e fêmeas, visando o entendimento de mecanismos e circuitarias neuronais envolvidos na ansiedade e na memória em ambos os sexos, afim proporcionar uma melhor compreensão da ação da melatonina e da expressão de seus receptores no dimorfismo sexual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasivash, R., *et al.* The Effect of Melatonin on Anxiety and Pain of Tourniquet in Intravenous Regional Anesthesia. **Advanced Biomedical Research**, v. 8, n. 1, p. 67, 1 Jan. 2019.

Acuña-Castroviejo, D., *et al.* Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences Birkhauser Verlag AG**, 2014.

Adell, A.; Artigas, F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 4, p. 415–431, 2004.

Ahluwalia, A., *et al.* Melatonin signaling in mitochondria extends beyond neurons and neuroprotection: Implications for angiogenesis and cardio/gastroprotection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National, 27 fev. 2018.

Alberto Mourão Junior, C.; BANDEIRA RODRIGUES MELO, L. Integração de Três Conceitos: Função Executiva, Memória de Trabalho e Aprendizado Integration of Three Concepts: Executive Function, Working Memory and Learning. 2011.

Allada, R.; BASS, J. Circadian Mechanisms in Medicine. **New England Journal of medicine**, v. 384, n. 6, p. 550–561, 11 fev. 2021.

Alvarez, R. P. *et al.* Contextual fear conditioning in humans: Cortical-hippocampal and amygdala contributions. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 24, p. 6211–6219, 11 jun. 2008.

Anil Kumar, K. V. *et al.* Anti-stress and nootropic activity of drugs affecting the renin-angiotensin system in rats based on indirect biochemical evidence. **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 801–812, 1 dez. 2015.

Anxiety Disorders Rethinking and Understanding Recent Discoveries. 2020.

Andreollo, N. A.; Santos, E. F.; Araújo, M. R.; Lopes, L. R. RAT'S AGE VERSUS HUMAN'S AGE: WHAT IS THE RELATIONSHIP? **ABCD Arq Bras Cir Dig** 2012;25(1):49-51.

Averill, L. A. *et al.* Glutamate dysregulation and glutamatergic therapeutics for PTSD: Evidence from human studies. **Neuroscience Letters Elsevier Ireland Ltd**, 10 maio 2017.

- Babaev, O.; PILETTI CHATAIN, C.; KRUEGER-BURG, D. **Inhibition in the amygdala anxiety circuitry**. Experimental and Molecular Medicine Nature Publishing Group, 1 abr. 2018.
- Bagheri, S., *et al.* Melatonin improves learning and memory of mice with chronic social isolation stress via an interaction between microglia polarization and BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 908, 5 out. 2021.
- Baldi, E.; Bucherelli, C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews Elsevier Ltd**, 1 jun. 2015.
- Bali, A.; Jaggi, A. S. Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. **Pharmacological Research Academic Press**, 2013.
- Barkus, C., *et al.* Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. **European Journal of Pharmacology**, 10 jan. 2010.
- Bispo, J. M. M., *et al.* Testosterone propionate improves motor alterations and dopaminergic damage in the reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 187, p. 162–168, 1 set. 2022.
- Bliss, T. V. P., *et al.* Long-term potentiation in the hippocampus: Discovery, mechanisms and function. Neuroforum Walter de Gruyter GmbH, 7 ago. 2018.
- Bocchio, M.; Nabavi, S.; Capogna, M. Synaptic Plasticity, Engrams, and Network Oscillations in Amygdala Circuits for Storage and Retrieval of Emotional Memories. **Neuron Cell Press**, 17 maio 2017.
- Bourin, M.; Hascoët, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology Elsevier**, 28 fev. 2003.
- Brzezinski, A., *et al.* Melatonin, clock genes, and mammalian reproduction: What is the link? **International Journal of Molecular Sciences MDPI**, 1 dez. 2021.
- Buckner, R. L.; Dinicola, L. M. The brain's default network: updated anatomy, physiology and evolving insights. **Nature Reviews Neuroscience Nature Research**, 1 out. 2019.

Burgos, F. R. N. F., *et al.* Pinealectomia em ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*): Descrição de um novo método cirúrgico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 1, p. 119–126, 2016.

Çalışkan, G.; Stork, O. Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. **Psychopharmacology Springer Verlag**, 1 jan. 2019.

Caumo, W.; Levandovski, R.; Hidalgo, M. P. L. Preoperative Anxiolytic Effect of Melatonin and Clonidine on Postoperative Pain and Morphine Consumption in Patients Undergoing Abdominal Hysterectomy: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. **Journal of Pain**, v. 10, n. 1, p. 100–108, jan. 2009.

Cavalcante, K. M. H., *et al.* Short-term but not long-term exposure to an enriched environment facilitates the extinction of aversive memory. **Behavioural Brain Research**, v. 393, 1 set. 2020.

Cezar, B., *et al.* Alterações neuroplásticas subjacentes ao tratamento com terapia cognitivo comportamental Neuroplastic changes underlying treatment with cognitive behavioral therapy Cambios neuroplásticos subyacentes al tratamiento con terapia cognitiva conductual. 2022.

Chen, S.; GOUAUX, E. Structure and mechanism of AMPA receptor — auxiliary protein complexes. **Current Opinion in Structural Biology Elsevier Ltd**, 1 fev. 2019.

Chojnowska, S., *et al.* Clinical Medicine Salivary Biomarkers of Stress, Anxiety and Depression. *J. Clin. Med*, p. 10, 2021.

Chrissobolis, S., *et al.* Targeting the renin angiotensin system for the treatment of anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **Elsevier Inc.**, 1 dez. 2020.

Christy, B.; Nathans, D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268 (“zinc fingers” /transcription factor/cell growth) *Biochemistry*. 1989.

Collingridge, G. L., *et al.* Long-term depression in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, abr. 2010.

Compans, B., *et al.* NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

Costa, M., *et al.* Aversive memory formation in humans involves an amygdala-hippocampus phase code. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

Cox, K. H.; Takahashi, J. S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 63, n. 4, p. R93–R102, 1 nov. 2019.

Craske, M. G.; Stein, M. B. Anxiety. The Lancet Publishing Group, 17 dez. 2016.

Crosson, B. The Role of the Thalamus in Declarative and Procedural Linguistic Memory Processes. **Frontiers in Psychology Media S.A.**, 23 set. 2021.

Davis, M., *et al.* Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, jan. 2010.

D'esposito, M.; Postle, B. R. The cognitive neuroscience of working memory. **Annual Review of Psychology**, v. 66, p. 115–142, 1 jan. 2015.

Diering, G. H.; Huganir, R. L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. **Neuron Cell Press**, 24 out. 2018.

Dufourny, L., *et al.* GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: Evidence of rapid evolution in mammals. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, 2008.

Fanselow, M.S.; Gale, G.D. The Amygdala, Fear and Memory. Annual N.Y. Academy of Sciences, V. 985, pp. 125 – 134, 2003.

Farina, F. R.; Commins, S. Differential expression of immediate early genes Zif268 and c-Fos in the hippocampus and prefrontal cortex following spatial learning and glutamate receptor antagonism. **Behavioural Brain Research**, v. 307, p. 194–198, 1 jul. 2016.

Ferlazzo, N., *et al.* Is melatonin the cornucopia of the 21st century? Antioxidants. MDPI, 1 nov. 2020.

Flores-Cuadrado, A., *et al.* α -synucleinopathy in the human amygdala in Parkinson disease: Differential vulnerability of somatostatin- and parvalbumin-expressing neurons. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 76, n. 9, p. 754–758, 1 set. 2017.

Fredrich, M., *et al.* Impact of melatonin receptor-signaling on Zeitgeber time-dependent changes in cell proliferation and apoptosis in the adult murine hippocampus. **Hippocampus**, v. 27, n. 5, p. 495–506, 1 maio 2017.

Fu, W., *et al.* Piromelatine ameliorates memory deficits associated with chronic mild stress-induced anhedonia in rats. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 12, p. 2229–2239, 1 jun. 2016.

Gallo, C.; Nishino, F. A.; Amaral, F. G.; Cipolla-Neto, J. (2022). Pinealectomia em Ratos. In: Jockers, R., Cecon, E. (eds) Melatonina. Métodos em Biologia Molecular, vol 2550. Humana, Nova York, NY.

Gale, G.D.; Anagnostaras, S.G.; Godsil, B.P.; Mitchell, S.; Nozawa, T.; Sage, J.R.; Wiltgen, B.; Fanselow, M.S. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *The Journal of Neuroscience*, V. 14, pp. 3810-3815, 2004.

Gallero-Salas, Y., *et al.* Sensory and Behavioral Components of Neocortical Signal Flow in Discrimination Tasks with Short-Term Memory. **Neuron**, v. 109, n. 1, p. 135- 148.e6, 6 jan. 2021.

Gandolfi, J. V., *et al.* The Effects of Melatonin Supplementation on Sleep Quality and Assessment of the Serum Melatonin in ICU Patients: A Randomized Controlled Trial. **Critical Care Medicine**, v. 48, n. 12, p. E1286–E1293, 1 nov. 2020.

Gao, Z., *et al.* A cortico-cerebellar loop for motor planning. **Nature**, v. 563, n. 7729, p. 113–116, 1 nov. 2018.

Gautier, C., *et al.* Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *PLoS ONE*, v. 13, n. 3, 1 mar. 2018.

Genaro, K., *et al.* Angiotensin AT1 receptors modulate the anxiogenic effects of angiotensin (5–8) injected into the rat ventrolateral periaqueductal gray. *Peptides*, v. 96, p. 8–14, 1 out. 2017.

Gerstner, J. R., *et al.* Cycling behavior and memory formation. **Journal of Neuroscience**. Anais. 14 out. 2009.

Ghasemi, M., *et al.* Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. **Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience** Springer, 1 jun. 2022.

Gilmartin, M. R.; BALDERSTON, N. L.; HELMSTETTER, F. J. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends in Neurosciences Elsevier Ltd**, 2014.

Gilmore, J. H.; Knickmeyer, R. C.; Gao, W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. **Nature Reviews Neuroscience, Publishing Group**, 16 fev. 2018.

Giustino, T. F.; Maren, S. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. **Frontiers in Behavioral Neuroscience Frontiers Research Foundation**, 9 nov. 2015.

Godoy, L. D., *et al.* A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. **Frontiers in Behavioral Neuroscience Frontiers Media S.A.**, 3 jul. 2018a.

González- Franco, D. A., *et al.* Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 140, p. 17–26, 1 abr. 2017.

Gooley, J. J., *et al.* Exposure to room light before bedtime suppresses melatonin onset and shortens melatonin duration in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 3, mar. 2011.

Gray, J. A. *Precis of The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.* **The behavioral and brain sciences**. 1982.

Green, J. D. *Physiological Reviews The Hippocampus*. 1964.

Grillo, C.A.; Risher, M.; Macht, V. A.; Bumgardner, A.L.; Hang, A.; Gabriel, C.; Mocaer, E.; Piroli, G. G *et al.*, Repeated restraint stress-induced atrophy of glutamatergic pyramidal neurons and decreases in glutamatergic efflux in the rat amygdala are prevented by the antidepressant agomelatine, *Neuroscience* 284 (2015) 430–443.

Gulyaeva, N. V. Molecular mechanisms of neuroplasticity: An expanding universe. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 3, p. 237–242, 1 mar. 2017.

Gusev, P. A.; Alkon, D. L. Intracellular Correlates of Spatial Memory Acquisition in Hippocampal Slices: Long-Term Disinhibition of CA1 Pyramidal Cells. 2001.

Haering, S. C., *et al.* Auxiliary subunits: Shepherding AMPA receptors to the plasma membrane. **Membranes MDPI AG**, 8 ago. 2014.

Hardeland, R. Chronobiology of melatonin beyond the feedback to the suprachiasmatic nucleus-consequences to melatonin dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, mar. 2013.

Hawley, D. F; Morch, K. Differential response of hippocampal subregions to stress and learnig. *Plos One*, 2012.

Hardeland, R., *et al.* Melatonin and brain inflammaging. **Progress in Neurobiology Elsevier Ltd**, 1 abr. 2015a.

Harris, A. D.; Saleh, M. G.; Edden, R. A. E. **Edited 1H magnetic resonance spectroscopy in vivo: Methods and metabolites**. Magnetic Resonance in Medicine John Wiley and Sons Inc, 1 abr. 2017.

Herdegen, T.; Leah, J. D. **Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREBrATF proteins**. Brain Research Reviews. 1998.

Hirsh, J. B.; Kang, S. K. Mechanisms of Identity Conflict: Uncertainty, Anxiety, and the Behavioral Inhibition System. **Personality and Social Psychology Review**, v. 20, n. 3, p. 223–244, 1 ago. 2016.

Holwerda, S. W., *et al.* Relative burst amplitude of muscle sympathetic nerve activity is an indicator of altered sympathetic outflow in chronic anxiety. **J Neurophysiol**, v. 120, p. 11–22, 2018.

Huang, F.; Yang, Z.; Li, C. Q. The Melatonergic System in Anxiety Disorders and the Role of Melatonin in Conditional Fear. Em: Vitamins and Hormones Academic Press Inc., v. 103p. 281–294. 2017.

Impellizzeri, P., *et al.* Premedication with melatonin vs midazolam: efficacy on anxiety and compliance in paediatric surgical patients. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 7, p. 947–953, 1 jul. 2017.

Janak, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature Publishing Group**, 15 jan. 2015.

Jarome, T. J.; KWAPIS, J. L. Special issue “molecular mechanisms of memory formation and modification”. **International Journal of Molecular Sciences MDPI AG**, 2 abr. 2021.

Jilg, A., *et al.* Melatonin modulates daytime-dependent synaptic plasticity and learning efficiency. **Journal of Pineal Research**, v. 66, n. 3, 1 abr. 2019.

Jovanovic, T.; Ressler, K. J. 2010. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *The American Journal of Psychiatry*, 167(6), 648–662.

Kemenes, I., *et al.* Critical Time-Window for NO-cGMP-Dependent Long-Term Memory Formation after One-Trial Appetitive Conditioning. 2002.

Khoury, N. M., *et al.* The renin-angiotensin pathway in posttraumatic stress disorder: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers are associated with fewer traumatic stress symptoms. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 73, n. 6, p. 849–855, 2012.

Kopchia, K. L., *et al.* Effects of Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala on Anxiety-Like Behaviors in the Rat *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1992,

Kourosh-Arami, M.; Hosseini, N.; Komaki, A. Brain is modulated by neuronal plasticity during postnatal development. *Journal of Physiological Sciences BioMed Central Ltd*, 1 dez. 2021.

Kraeuter, A. K.; Guest, P. C.; Sarnyai, Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Em: Methods in Molecular Biology*. **Humana Press Inc.**, 2019. v. 1916p. 69–74.

Krystal, J. H., *et al.* Potential Psychiatric Applications of Metabotropic Glutamate Receptor Agonists and Antagonists. 2010.

Li, Y., *et al.* Effects of Pinealectomy and Gonadectomy on Olfactory Bulb Dopaminergic Neurons in Rats. **Chinese Medical Journal**. October 5, 2017.

Ladage, L. D.; Cobb Irvin, T. E.; Gould, V. A. Assessing spatial learning and memory in small squamate reptiles. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 119, 3 jan. 2017.

- Lai, T. T., *et al.* Anxiety in synucleinopathies: neuronal circuitry, underlying pathomechanisms and current therapeutic strategies. *npj Parkinson's Disease*, **Nature Research**, 1 dez. 2023.
- Leal, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. Em: Vitamins and Hormones. **Academic Press Inc.**, 2017. v. 104p. 153–195.
- Leal, G.; COMPRIDO, D.; DUARTE, C. B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, jan. 2014.
- Leal, P. C., *et al.* Cognitive and anxiety-like impairments accompanied by serotonergic ultrastructural and immunohistochemical alterations in early stages of parkinsonism. **Brain Research Bulletin**, v. 146, p. 213–223, 1 mar. 2019.
- Ledoux, J.E. Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, V. 23, pp. 155 – 184, 2000.
- Ledoux, J. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, 23 fev. 2012.
- Ledoux, J. E.; PINE, D. S. Using neuroscience to help understand fear and anxiety: A two-system framework. **American Journal of Psychiatry**, 1 nov. 2016.
- Lee, B. H.; Hille, B.; Koh, D.-S. Serotonin modulates melatonin synthesis as an autocrine neurotransmitter in the pineal gland. 2021.
- Lezak, K. R.; Missig, G.; Carlezon, W. A. Behavioral methods to study anxiety in rodents. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 181–191, 2017.
- Lira Brandão, M. **As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociência**. 2004.
- Liu, J.; Clough, S. J.; Dubocovich, M. L. Role of the MT1 and MT2 melatonin receptors in mediating depressive- and anxiety-like behaviors in C3H/HeN mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 16, n. 5, p. 546–553, 1 jun. 2017.
- Lüscher, C.; Malenka, R. C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, p. 1–15, jun. 2012.
- Manchester, L. C., *et al.* Melatonin: An ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **Journal of Pineal Research**. Blackwell Publishing Ltd, 1 nov. 2015.

- Månsson, K. N. T., *et al.* Altered neural correlates of affective processing after internet-delivered cognitive behavior therapy for social anxiety disorder. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, v. 214, n. 3, p. 229–237, 30 dez. 2013a.
- Marek, R.; Sun, Y.; Sah, P. Neural circuits for a top-down control of fear and extinction. **Psychopharmacology Springer Verlag**, 1 jan. 2019.
- Martin, E. I., *et al.* **The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology**. **Clinics in Laboratory Medicine**, dez. 2010.
- Martin, S. J.; GRIMWOOD, P. D.; MORRIS, R. G. M. **An Evaluation of the Hypothesis** **Annu. Rev. Neurosci.** 2000.
- Mayrhofer, J. M., *et al.* Distinct Contributions of Whisker Sensory Cortex and Tongue-Jaw Motor Cortex in a Goal-Directed Sensorimotor Transformation. **Neuron**, v. 103, n. 6, p. 1034-1043.e5, 25 set. 2019.
- MCewen, B. S., *et al.* Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**. Anais. jan. 2012.
- Menzel, R. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. **Learning and Memory**, 2001.
- Merlo, E., *et al.* Molecular Mechanisms of Memory Consolidation, Reconsolidation, and Persistence. **Neural Plasticity**. Hindawi Publishing Corporation, 2015.
- Milbrandt, J. **A Nerve Growth Factor-Induced Gene Encodes a Possible Transcriptional Regulatory Factor**. 1987.
- Millan, M. J. Agomelatine for the treatment of generalized anxiety disorder: focus on its distinctive mechanism of action. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 12, p. 204512532211051, jan. 2022.
- Mohammadi, S.; ZAHMATKESH, M. A surgical modification in the technique of rat pinealectomy. **Anatomical Science International**, v. 98, n. 2, p. 164–175, 1 mar. 2023.
- Möhler, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. **Neuropharmacology**. Anais. jan. 2012.

Morato, S. **O PAPEL DA VISÃO NA AVERSÃO AOS ESPAÇOS ABERTOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.** Psicologia USP. 2006.

Mukherjee, S.; Manahan-Vaughan, D. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. **Neuropharmacology**, mar. 2013.

Nakahashi, T.; Fujimura, H.; Altar, C. A.; Li, J.; Kambayashi, J-I.; N.N. N.N et al., vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor, FEBS Lett. 470 (2) (2000) 113–117.

Nasir, M. *et al.* Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. **Frontiers in Psychiatry** S.A., 19 nov. 2020a.

Nasir, M. *et al.* **Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology.** Frontiers in Psychiatry Frontiers Media S.A., 19 nov. 2020b.

Nater, U. M.; Rohleder, N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. **Psychoneuroendocrinology**, maio 2009.

Nguyen, C. *et al.* Nicotine inhibits the VTA-to-amygdala dopamine pathway to promote anxiety. **Neuron**, v. 109, n. 16, p. 2604- 2615.e9, 18 ago. 2021.

Niswender, C. M.; Conn, P. J. Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 10 fev. 2010.

Nooshinfar, E.; Akbarzadeh, B. A. Effects of increasing durations of immobilization stress on plasma corticosterone level, learning and memory and hippocampal BDNF gene expression in rats. **Neurosci Lett**, 2011.

Nuss, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 165–175, 14 jan. 2015.

Nura, W.; Lingawi, V. L. R.; Frederick, W.; Nathan, M. H. Acquisition and extinction of second-order context conditioned fear: Role of the amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory**. Volume 183, September 2021, 107485.

Obayashi, K. *et al.* Nocturnal urinary melatonin excretion is associated with non-dipper pattern in elderly hypertensives. **Hypertension Research**, v. 36, n. 8, p. 736–740, ago. 2013.

Ochoa-Sanchez, R. *et al.* Anxiolytic effects of the melatonin MT2 receptor partial agonist UCM765: Comparison with melatonin and diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 318–325, 3 dez. 2012.

Oishi, A.; Cecon, E.; Jockers, R. Melatonin Receptor Signaling: Impact of Receptor Oligomerization on Receptor Function. Em: International Review of Cell and Molecular Biology. **Elsevier Inc.**, 2018. v. 338p. 59–77.

Ogłodek, E. A.; Just, M. J.; Szromek, A. R.; Araszkiewicz, A. Melatonin and neurotrophins NT-3, BDNF, NGF in patients with varying levels of depression severity, *Pharmacol. Rep.: PR* 68 (5) (2016) 945–951.

Ortega-de San Luis, C.; Ryan, T. J. Understanding the physical basis of memory: Molecular mechanisms of the engram. **Journal of Biological Chemistry American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.**, 1 maio 2022.

Ostrin, L. A. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clinical and Experimental Optometry* Blackwell Publishing Ltd, 1 mar. 2019.

Packard, M. G.; Gadberry, T.; Goodman, J. Neural systems and the emotion-memory link. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 185, 1 nov. 2021.

Padilla-Coreano, N. *et al.* Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 857–866, 17 fev. 2016.

Pandi-Perumal, S. R. *et al.* Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, jul. 2008.

Parsons, M. P.; Raymond, L. A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. **Neuron Cell Press**, 16 abr. 2014.

Parsons, R. G. Behavioral and neural mechanisms by which prior experience impacts subsequent learning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 154, p. 22–29, 1 out. 2018.

Pastuzyn, E. D. *et al.* The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular RNA Transfer. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 275–288.e18, 11 jan. 2018.

Patel, T.; Kurdi, M. S. A comparative study between oral melatonin and oral midazolam on preoperative anxiety, cognitive, and psychomotor functions. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 37–43, 1 jan. 2015.

Pavel, J., *et al.* **Peripherally administered angiotensin II AT1 receptor antagonists are anti-stress compounds in vivo.** Annals of the New York Academy of Sciences. **Anais.** Blackwell Publishing Inc., 2008.

Perusini, J. N.; Fanselow, M. S. **Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety.** **Learning and Memory** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 set. 2015.

PI, G., *et al.* Posterior basolateral amygdala to ventral hippocampal CA1 drives approach behaviour to exert an anxiolytic effect. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

Plath, N., *et al.* Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and memories. **Neuron**, v. 52, n. 3, p. 437–444, 9 nov. 2006.

Posadzki, P. P., *et al.* Melatonin and health: An umbrella review of health outcomes and biological mechanisms of action. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, 5 fev. 2018.

Pourhamzeh, M., *et al.* The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology Springer**, 1 ago. 2022.

Prager, E. M., *et al.* The basolateral amygdala γ -aminobutyric acidergic system in health and disease. **Journal of Neuroscience Research Inc.**, 1 jun. 2016.

Kandel, E.R. **Princípios de Neurociências** Porto Alegre Ed. MC HILL 5a. Edição. 2014

PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 - 5ª Edição.** 2013.

Qi, G., *et al.* NAc-VTA circuit underlies emotional stress-induced anxiety-like behavior in the three-chamber vicarious social defeat stress mouse model. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

Ralf Jockers, C., *et al.* Themed Section: Recent Developments in Research of Melatonin and its Potential Therapeutic Applications Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. 2017.

Ramírez-Amaya, V., *et al.* Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 1761–1768, 16 fev. 2005.

Reagan, L.P.; Reznikov, L. R.; Evans, A. N.; Gabriel, C.; Mocaer, E.; Fadel, J. R. The antidepressant agomelatine inhibits stress-mediated changes in amino acid efflux in the rat hippocampus and amygdala, *Brain Res.* 1466 (2012) 91–98.

Reiner, A.; Levitz, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron Cell Press**, 27 jun. 2018.

Repova, K., *et al.* **Melatonin as a Potential Approach to Anxiety Treatment. International Journal of Molecular Sciences** MDPI, 1 dez. 2022a.

Reis *et al.*, Analysis of positive reinforcement training for habituation of *Sapajus apella* in experimental apparatus. *Rev Pan Amaz Saude* 2021;12 num esp:e202100156.

Reyes-Resina, I., *et al.* Expression of Melatonin and Dopamine D3 Receptor Heteromers in Eye Ciliary Body Epithelial Cells and Negative Correlation with Ocular Hypertension. **Cells**, v. 9, n. 1, 8 jan. 2020.

Rice, M. E.; Patel, J. C. Somatodendritic dopamine release: Recent mechanistic insights. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1672, p. 1–14, 5 jul. 2015.

Roesler, R., *et al.* Amygdala-hippocampal interactions in synaptic plasticity and memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 184, 1 out. 2021.

Rosenstein, R. E.; Cardinali, D. P. Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. **Brain Research**. 1986.

Rudnitskaya, E. A., *et al.* Melatonin Attenuates Memory Impairment, Amyloid- β Accumulation, and Neurodegeneration in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 47, n. 1, p. 103–116, 2015.

Rzepka-Migut, B.; Paprocka, J. Melatonin-measurement methods and the factormodifying the results. A systematic review of thliterature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**MDPI AG, 2 mar. 2020.

Sah, P.; Sun, Y.; Gooch, H. Fear conditioning and the basolateral amygdala. **Research Ltd**, 2020.

Salussolia, C. L., *et al.* Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 31, p. 11295–11304, 3 ago. 2011.

Sánchez, A.; Calpena, A. C.; Clares, B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, 27 jul. 2015.

Sanders, M. J.; Wiltgen, B. J.; Fanselow, M. S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **European Journal of Pharmacology Elsevier**, 28 fev. 2003.

Santos, J. R., *et al.* Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 15 set. 2013.

Seibenhener, M. L.; Wooten, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, 6 fev. 2015.

SeverinI, C. Neurotrophic Factors in Health and Disease. **Cells MDPI**, 1 jan. 2023.

Simone, H.; Kapczinski, F. Serum brain derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2010.

Summers, M. J.; Ward, D, D.; APOE and BDNF Val66Met polymorphisms combine to influence episodic memory function in older adults. *Behav Brain Res*, 2014.

Shahoha, M., *et al.* cAMP-Dependent Synaptic Plasticity at the Hippocampal Mossy Fiber Terminal. **Frontiers in Synaptic Neuroscience Frontiers Media S.A.**, 4 abr. 2022.

- Shanazz, K., *et al.* Light-Dark Open Field (LDOF): A novel task for sensitive assessment of anxiety. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 363, 1 nov. 2021.
- Shim, H. G.; Lee, Y. S.; Kim, S. J. The emerging concept of intrinsic plasticity: Activity-dependent modulation of intrinsic excitability in cerebellar Purkinje cells and motor learning. **Experimental Neurobiology**, Korean Society for Neurodegenerative Disease, 1 jun. 2018.
- Shin, S. Y., *et al.* Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. **Neuroscience**, v. 316, p. 221–231, 1 mar. 2016.
- Simko, F., *et al.* Experimental models of melatonin-deficient hypertension. **Frontiers in Bioscience**. 2013.
- Small, W. Notes on the psychic development of the white rat. *American Journal of Psychology*, V.11, pp. 80 – 100, 1899.
- Smith, J. S.; Lefkowitz, R. J.; Rajagopal, S. Biased signalling: From simple switches to allosteric microprocessors. **Nature Reviews Drug Discovery**, 28 mar. 2018.
- Squire, L. R.; Zola-Morgan, A. J. O. Conscious and unconscious memory systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, 2015.
- Stefanits, H., *et al.* GABAA receptor subunits in the human amygdala and hippocampus: Immunohistochemical distribution of 7 subunits. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 2, p. 324–348, 1 fev. 2018.
- Steimer, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues dialogues. **Clin Neurosci**. 2011.
- Strange, B. A., *et al.* Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience** Nature Publishing Group, 11 out. 2014.
- Sudhakaran, I. P.; Ramaswami, M. Long-term memory consolidation: The role of RNA-binding proteins with prion-like domains. **RNA Biology**, v. 14, n. 5, p. 568–586, 4 maio 2017.
- Suofu, Y., *et al.* Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 38, p. 7997–8006, 19 set. 2017.

Swanson, C. J., *et al.* Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, fev. 2005.

Tafet, G. E.; Nemeroff, C. B. Pharmacological Treatment of Anxiety Disorders: The Role of the HPA Axis. **Frontiers in Psychiatry Frontiers Media S.A.**, 15 maio 2020.

Terasawa, Y., *et al.* Anterior insular cortex mediates bodily sensibility and social anxiety. **Social Cognitive and Affective Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 259–266, mar. 2013.

Tyler, W. J.; Alonso, M.; Bramham, C. R.; Pozzo-Miller, L. D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem.* 2002; 9:224-37.

Thomovsky, S. A., *et al.* Serum Melatonin Values in Normal Dogs and Dogs with Seizures. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 55, n. 2, p. 78–82, 1 mar. 2019.

Thomson, D. M., *et al.* Mice lacking melatonin MT2 receptors exhibit attentional deficits, anxiety and enhanced social interaction. **Journal of Psychopharmacology**, v. 35, n. 10, p. 1265–1276, 1 out. 2021.

Thum, A. S.; Gerber, B. Connectomics and function of a memory network: the mushroom body of larval *Drosophila*. **Current Opinion in Neurobiology Elsevier Ltd**, 1 fev. 2019.

Tong, Q., *et al.* D1 receptor-expressing neurons in ventral tegmental area alleviate mouse anxiety-like behaviors via glutamatergic projection to lateral septum. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 625–638, 1 fev. 2023.

Tonon, A. C., *et al.* Melatonin and Depression: A Translational Perspective From Animal Models to Clinical Studies. **Frontiers in Psychiatry Frontiers Media S.A.**, 8 abr. 2021.

Tordjman, S., *et al.* Send Orders for Reprints to reprints Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, v. 15, p. 434–443, 2017.

Torres, E. R. S., *et al.* Alpha-synuclein pathology, microgliosis, and parvalbumin neuron loss in the amygdala associated with enhanced fear in the Thy1-aSyn model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 158, 1 out. 2021.

Tovote, P.; Fadok, J. P.; Lüthi, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, 26 jun. 2015a.

- Tripathi, S. J., *et al.* Prevention of chronic immobilization stress-induced enhanced expression of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex by inactivation of basolateral amygdala. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 95, p. 134–145, 1 jan. 2019.
- Tu, G., *et al.* Dopamine D1 and D2 Receptors Differentially Regulate Rac1 and Cdc42 Signaling in the Nucleus Accumbens to Modulate Behavioral and Structural Plasticity After Repeated Methamphetamine Treatment. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 11, p. 820–835, 1 dez. 2019.
- Tuomi, T., *et al.* Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1067–1077, 14 jun. 2016.
- Tzoneva, R., *et al.* The Role of Melatonin on Behavioral Changes and Concomitant Oxidative Stress in icvA β 1-42 Rat Model with Pinealectomy. **Int. J. Mol. Sci.** 2021.
- Ulrich-Lai, Y. M.; Herman, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, jun. 2009.
- Valdés-Tovar, M., *et al.* Circadian modulation of neuroplasticity by melatonin: a target in the treatment of depression. **British Journal of Pharmacology**. 175 3200–3208. 2018.
- Van Mierlo, T. J., *et al.* Depressive symptoms in Parkinson's disease are related to decreased hippocampus and amygdala volume. **Movement Disorders**, v. 30, n. 2, p. 245–252, 1 fev. 2015.
- Van Veen, J. F., *et al.* Elevated alpha-amylase but not cortisol in generalized social anxiety disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 10, p. 1313–1321, nov. 2008.
- Vainer, A. M.; Rocha, V. S.; Juvenale, M. Melatonin and the immune system: a two-way relationship regulator. **Brazilian Journal of Health Review**. 2021.
- Vorhees, C. V.; Williams, M. T. Assessing spatial learning and memory in rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 310–332, 1 jan. 2014.
- Vriend, C., *et al.* A smaller amygdala is associated with anxiety in Parkinson's disease: A combined FreeSurfer - VBM study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 87, n. 5, p. 493–500, 1 maio 2016.
- Wang, H.; Ward, N.; Boswell, M.; Katz, D. M. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells, *Eur. J. Neurosci.* 23 (6) (2006) 1665–1670.

- Wang, X., *et al.* Melatonin Alleviates Acute Sleep Deprivation-Induced Memory Loss in Mice by Suppressing Hippocampal Ferroptosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 16 jul. 2021.
- Yang, T., *et al.* Synaptic Plasticity, a Prominent Contributor to the Anxiety in Fragile X Syndrome. **Neural Plasticity Hindawi Limited**, 2016.
- Yin, X., *et al.* Lateralization of short-term memory in the frontal cortex. **Cell Reports**, v. 40, n. 7, 16 ago. 2022.
- Zaidi, S., *et al.* Protective effect of propranolol and nadolol on social defeat-induced behavioral impairments in rats. **Neuroscience Letters**, v. 725, 23 abr. 2020.
- Zou, Y.; Zhang, Y.; Tu, M.; Ye Y.; Li M.; Li, M.; Ran, R.; Zou, Z. Brain-derived neurotrophic factor levels across psychiatric disorders: A systemic review and network meta-analysis. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry** 131 (2024) 110954.
- Zhai, L. Q., *et al.* Temporal changes in Egr-1 and c-fos expression in rat models of myocardial ischemia. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 2, p. 1411–1420, 2021.
- Zhang, L., *et al.* Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: Role of oxidative stress, BDNF and CaMKII. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 72–81, 1 nov. 2013.
- Zhang, L., *et al.* Melatonin prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: role of oxidative stress and balance between GABAergic and glutamatergic transmission. **Am J Transl Res**. 2017.
- Zhang, S., *et al.* Protective effect of melatonin on soluble A β 1-42-induced memory impairment, astrogliosis, and synaptic dysfunction via the Musashi1/Notch1/Hes1 signaling pathway in the rat hippocampus. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 8, n. 1, 15 set. 2016.
- Zhao, D., *et al.* Melatonin synthesis and function: Evolutionary history in animals and plants. **Frontiers in Endocrinology** S.A. 2019.
- Żmudzka, E., *et al.* Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life Sciences Elsevier Inc.**, 1 out. 2018.

APÊNDICE I



PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

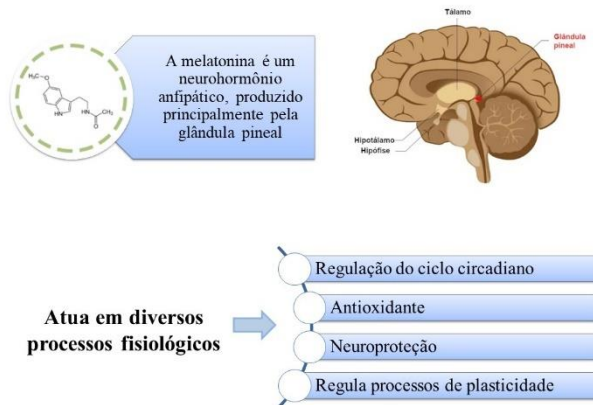


Título do trabalho:

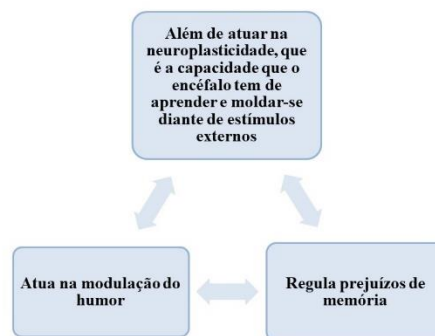
EFEITOS DA PINEALECTOMIA NA
PLASTICIDADE NEURONAL: IMPACTO NO
COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO E NA
MEMÓRIA DE RATOS

Discente: Ana Cléia Alves da Luz
Orientador (a): Prof.ª Dra. Katty Anne
Amador de Lucena Medeiros

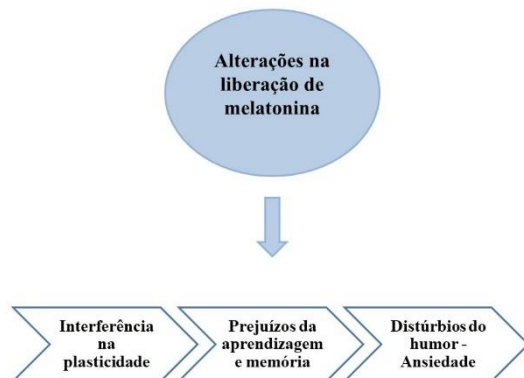
Introdução



Introdução



Introdução



Objetivos



Objetivo geral

- Investigar as alterações de plasticidade induzidas pela pinealectomia e como essas alterações podem interferir no comportamento tipo ansioso e na memória de ratos

Objetivos específicos

- Demonstrar os efeitos da pinealectomia no comportamento tipo ansioso em ratos;
- Analisar as alterações de memória em ratos submetidos a remoção da glândula pineal;
- Avaliar as alterações de plasticidade no hipocampo, amígdala e córtex entorrinal de ratos pinealectomizados;

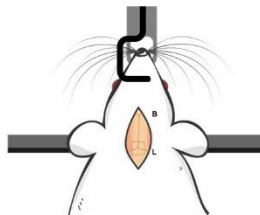
Material e Métodos

Nosso estudo foi desenvolvido com aprovação do comitê de ética em pesquisa animal da UFS (Nº 3490280722)

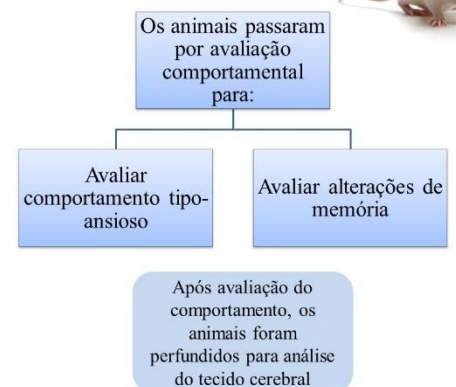
Foram utilizados 54 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* machos



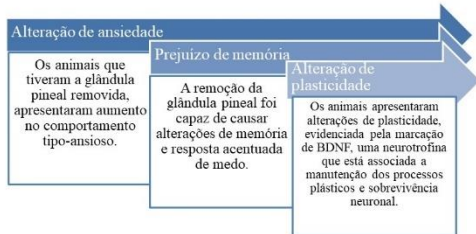
Os animais foram submetidos a cirurgia de pinealectomia (remoção da glândula pineal), com 45 dias de nascimento



Material e Métodos



Resultados



Podemos concluir que a diminuição do hormônio melatonina, através da remoção da glândula pineal, foi capaz de causar aumento do comportamento tipo-ansioso, alteração de memória aversiva, assim como foi observado alterações de plasticidade cerebral.

<http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis>

ANEXO I



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA MEMÓRIA E DA ANSIEDADE DE RATOS ADULTOS INDUZIDAS PELA SUPRESSÃO DE MELATONINA NA JUVENTUDE", protocolada sob o CEUA nº 3490280722 (ID 000570), sob a responsabilidade de **Katty Anne Amador de Lucena Medeiros** e equipe; *José Ronaldo dos Santos; Ana Cleia Alves Da Luz* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 13/09/2022.

We certify that the proposal "STUDY OF CHANGES IN MEMORY AND ANXIETY IN ADULT RATS INDUCED BY MELATONIN SUPPRESSION IN YOUTH", utilizing 54 Heterogenics rats (54 males), protocol number CEUA 3490280722 (ID 000570), under the responsibility of **Katty Anne Amador de Lucena Medeiros** and team; *José Ronaldo dos Santos; Ana Cleia Alves Da Luz* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 09/13/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2022](#) a [08/2024](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Biotério da Universidade Federal de Sergipe](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 5 semanas](#)

N: [54](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [50 a 200 g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE), localizado na Universidade Federal de Sergipe, Campus Itabaiana.

São Cristóvão, 12 de novembro de 2022

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe