

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA**

ISIS ZION VIEIRA

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL
COM AUMENTO NA INTERAÇÃO SOCIAL**

**Marília
2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA**

ISIS ZION VIEIRA

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL
COM AUMENTO NA INTERAÇÃO SOCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências –UNESP- Campus de Marília SP, para obtenção do título de mestre em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Pinato.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Leila M. G. Campos.

Marília

2019

V658e	Vieira, Isis Zion EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL COM AUMENTO NA INTERAÇÃO SOCIAL / Isis Zion Vieira. -- Marília, 2019 64 p. : il., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Filosofia e Ciências, Marília Orientadora: Luciana Pinato Coorientadora: Leila Maria Guissoni Campos 1. Comportamento social. 2. Melatonina. 3. Receptores de Melatonina. 4. Córtex pré-frontal. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Filosofia e Ciências, Marília. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ISIS ZION VIEIRA

EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL COM
AUMENTO NA INTERAÇÃO SOCIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia, Área de Concentração Distúrbios da Comunicação Humana, da Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Marília (SP), para obtenção do título de Mestre em Fonoaudiologia. Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): _____
Prof.^a Dra.^a Luciana Pinato
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Examinador (a): _____
Prof.^a Dr.^a Maria Angélica Spadella
Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA/Marília-SP.

Examinador (a): _____
Prof.^a Dr.^a Natalia Freitas Rossi
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Marília, 25 de Abril de 2019

Dedico esse trabalho a minha família, especialmente à meus pais que me apoiaram e incentivaram durante toda a minha trajetória de estudos, inclusive, nessa importante etapa de desenvolvimento e aprofundamento de conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Primeiramente a minha orientadora Dra. Luciana Pinato, por me acolher em seu grupo de pesquisa e laboratório, por toda a sua dedicação e empenho em me orientar, sempre confiando no meu trabalho, direcionando-me à melhores caminhos e generosamente compartilhando conhecimentos.

A minha co-orientadora Dra. Leila Maria Guissoni Campos por seu auxílio no desenvolvimento desse estudo e suas orientações que contribuíram para o enriquecimento da minha trajetória científica.

Aos membros da banca, Dra. Maria Angélica Spadella e Dra. Natalia Freitas Rossi, por analisarem e colaborarem com a sugestão de melhorias para o aprimoramento desse trabalho.

A meus colaboradores Dr. Silvio Morato e Dr. Rafael Bonuti por sua grande contribuição para a elaboração do projeto, nos auxiliando em diversos momentos.

Ao Dr. Sanseray da Silveira Cruz-Machado pelo auxílio em ensinar a técnica de PCR e ajudar na interpretação de dados que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao técnico do laboratório Ms. Augusto, por me auxiliar em diversos momentos durante o desenvolvimento da pesquisa.

A meus colegas de laboratório, em especial à Ana Luiza Decanini, Caio Sergio Galina Spilla pela colaboração na etapa de coleta de dados, e por estarem sempre dispostos e compartilharem seus conhecimentos. A colega Graziela Ligia Da Silva Santos pela parceria nos estudos e por partilhar conhecimentos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha família por sempre me apoiar nas minhas decisões, inclusive nessa importante empreitada. E em especial a meus pais, Denise e João, por permanecerem sempre presentes e compartilharem comigo os melhores momentos e me darem forças nos momentos difíceis. E por todo o seu esforço e amor durante a minha criação, me propiciando chegar até aqui.

Ao meu companheiro Bruno, por sempre me dar força e palavras de conforto e incentivo durante as longas horas de estudo, por toda a sua amizade e compreensão até o encerramento desse ciclo.

RESUMO

Introdução: Áreas encefálicas como hipocampo, hipotálamo, cerebelo e o córtex pré-frontal participam do controle de habilidades sociais fundamentais para a saúde e o bem-estar. Alterações bioquímicas nestas áreas podem alterar a expressão do comportamento social em quadros patológicos como depressão, esquizofrenia, distúrbios bipolares e em transtornos do neurodesenvolvimento. Esclarecer os mecanismos envolvidos nessas alterações é essencial para o desenvolvimento de ações terapêuticas nestes quadros. Estudos recentes mostraram que a melatonina e seu agonista agomelatina podem estar envolvidos na modulação do comportamento social principalmente por meio dos receptores MT₁ e MT₂. Porém, pouco se sabe sobre variações no conteúdo de melatonina e na expressão destes receptores em diferentes áreas encefálicas, em quadros que apresentam alterações no comportamento social.

Objetivos: Avaliar a concentração plasmática de melatonina, a expressão gênica dos receptores de melatonina MT₁ e MT₂ em diferentes áreas encefálicas, e a localização e quantificação das células imunorreativas para MT₁ e MT₂ no córtex pré-frontal de modelo animal com aumento na interação social.

Métodos: Amostras de sangue e de tecido encefálico foram obtidas de ratos com aumento na interação social (grupo mais social) e ratos com interação social considerada normal para a espécie (grupo controle). Com o intuito de confirmar as diferenças no comportamento de interação social entre os dois grupos, todos os animais passaram por avaliação comportamental. A melatonina plasmática foi quantificada por ELISA; a expressão gênica dos receptores MT₁ e MT₂ no córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e cerebelo foi analisada por PCR em tempo real e a localização dos receptores MT₁ e MT₂ foi analisada por imunohistoquímica.

Resultados: Os testes comportamentais mostraram que o grupo mais social apresentou maior tempo de interação social e menor tempo e frequência de limpar-se em relação ao grupo controle. O grupo mais social apresentou menor concentração plasmática de melatonina que o grupo controle e maior expressão dos RNAm de MT₁ no hipotálamo, hipocampo, pré-frontal e cerebelo, e maior expressão dos RNAm de MT₂ no hipotálamo, hipocampo e cerebelo. O grupo mais social apresentou maior número de células imunorreativas para MT₁ na área total do córtex pré-frontal e nas divisões LO, MO, VO, PrL. Não houve diferença na imunorreatividade para o receptor MT₂ entre os grupos mais social tanto na área total quanto nas divisões do córtex pré-frontal.

Conclusão: Os animais da linhagem mais social apresentaram maior interação social com o co-específico do que o grupo controle, menor conteúdo de melatonina, maior expressão gênica dos receptores de melatonina MT₁ no hipocampo, hipotálamo, córtex pré-frontal e

cerebelo, e do MT₂ no hipocampo, hipotálamo e cerebelo. Além disso a linhagem mais social apresentou maior número de células imunorreativas ao receptor de melatonina MT₁ no córtex pré-frontal.

Palavras-chave: Comportamento social, Melatonina, Receptores de Melatonina, córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Introduction: Encephalic areas such as the hippocampus, hypothalamus, cerebellum, and prefrontal cortex participate in the control of social skills fundamental to health and well-being. Biochemical changes in these areas may alter the expression of social behavior in pathological conditions such as depression, schizophrenia, bipolar disorders and neurodevelopmental disorders. Clarifying the mechanisms involved in these changes is essential for the development of therapeutic actions in these frameworks. Recent studies have shown that melatonin and its agonist agonist may be involved in the modulation of social behavior mainly through the MT1 and MT2 receptors. However, little is known about variations in the content of melatonin and the expression of these receptors in different brain areas, in pictures that present changes in social behavior. **Objectives:** To evaluate the plasma concentration of melatonin, the gene expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in different brain areas, and the localization and quantification of MT1 and MT2 immunoreactive cells in the animal model prefrontal cortex with increased social interaction. **Methods:** Blood and brain tissue samples were obtained from rats with increased social interaction (more social group) and rats with social interaction considered normal for the species (control group). In order to confirm the differences in behavior of social interaction between the two groups, all animals underwent behavioral evaluation. Plasma melatonin was quantified by ELISA; the gene expression of MT1 and MT2 receptors in the prefrontal cortex, hippocampus, hypothalamus and cerebellum was analyzed by real-time PCR and the location of MT1 and MT2 receptors was analyzed by immunohistochemistry. **Results:** Behavioral tests showed that the most social group had an increase in social interaction time and a decrease in the time and frequency of cleansing in relation to the control group. The more social group presented lower plasma concentration of melatonin than the control group and higher expression of MT1 mRNAs in the hypothalamus, hippocampus, prefrontal and cerebellum, and higher expression of MT2 mRNAs in the hypothalamus, hippocampus and cerebellum. The most social group had a higher number of MT1 immunoreactive cells in the LO, MO, VO, PrL and total prefrontal cortex areas, and there was no greater immunoreactivity for the MT2 receptor in the subareas and in the total area of the pre- front. **Conclusion:** The animals of the more social line presented greater social interaction with the co-specific than the control group. These animals had lower melatonin content, greater gene expression of MT1 melatonin receptors in the hippocampus, hypothalamus, prefrontal cortex and cerebellum, and MT2 in the hippocampus, hypothalamus and cerebellum. In addition, a

larger number of MT1 melatonin receptor immunoreactive cells were present in the PrL, MO, VO and LO subdivisions of the prefrontal cortex.

Key words: Social behavior, Melatonin, Melatonin receptors, prefrontal cortex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	FIGURA 1 Esquema da via síntese da melatonina a partir do aminoácido triptofano	19
2	FIGURA 2 Via polissináptica da sinalização fótica para síntese de melatonina	20
3	FIGURA 3 Desenho esquemático do encéfalo de rato	26
4	FIGURA 4 Ilustração de Campo aberto de madeira com gaiola acoplada	29
5	FIGURA 5 Desenho esquemático de corte coronal do encéfalo de rato	34
6	FIGURA 6 Análise comportamental do modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle na exploração do campo aberto.....	36
7	FIGURA 7 Análise comportamental do modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle (controle).....	38
8	FIGURA 8 Dosagem noturna de melatonina plasmática nos grupos mais social (+SOC) e controle.....	39
9	FIGURA 9 Expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT ₁	40
10	FIGURA 10 Expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT ₂	41
11	FIGURA 11 Análise quantitativa do número de células imunorreativas para MT ₁ (MT ₁ -ir) e MT ₂ (MT ₂ -ir) no modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle, no CPF	43
12	FIGURA 12 Análise quantitativa do número de células imunorreativas para MT ₁ (MT ₁ -ir) no modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle	44
13	FIGURA 13 Análise quantitativa do número de células imunorreativas para MT ₂ (MT ₂ -ir) no modelo mais social (+ Soc) em comparação ao grupo controle	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA-NAT	Arilalquilamina-N-Acetil Transferase
ASMT	Acetil-Serotonina O-Metil –Transferase
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico (“cyclic adenosine monophosphate”)
CgL	córtex do cíngulo
CPF	córtex pré-frontal
CPLX1	complexina 1
DLO	córtex orbital dorsolateral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FFC	Faculdade de Filosofia e Ciências
GABA	Ácido γ -aminobutírico (“gamma-aminobutyric acid”)
GFAP	Proteína glial fibrilarácida
GSPTP1	glutathione S-transferase P1
H ₂ O _d	Água destilada
HIOMT	Hidroxi-Indol-O-Metil Transferase
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LO	córtex orbital lateral
MO	córtex orbital medial
MT ₁	Receptor de melatonina tipo 1
MT ₂	Receptor de melatonina tipo 2
NaCl	Cloreto de sódio
NAS	N- Acetilserotonina
NAT	N-acetiltransferase
NREM	Movimento não rápido dos olhos (“non-rapid eye movement”)

NSQ/ SNC Núcleo supraquiasmático/ suprachiasmatic nucleus

PBS Salina tamponada

PN Pós-natal

PrL córtex pré-límbico

PVN Núcleo paraventricular (“paraventricular nucleus”)

REM Movimento rápido dos olhos (“rapid eye movement”)

RNA Ácido ribonucleico

SAL Salina

SNC Sistema nervoso central

TEA Transtorno do espectro do autismo

TRH Tracto retino-hipotalâmico

VO córtex ventro orbital

ZT Zeitbergers

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Comportamento social e sociabilidade	16
2.1.1	Comportamento social em ratos	17
2.2	Melatonina	17
2.3	Via de síntese da melatonina	18
2.4	Receptores MT ₁ e MT ₂	20
2.5	Melatonina e comportamento	20
2.6	Agomelatina	22
2.7	Regiões Encefálicas	23
2.7.1	Córtex Pré-Frontal	23
2.7.2	Hipocampo	24
2.7.3	Hipotálamo	25
2.7.4	Cerebelo	25
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Objetivo Geral	27
4.2	Objetivos Específicos	27
5	MÉTODOS	27
5.1	Animais	27
5.2	Teste Comportamental	28
5.3	Coleta Amostras	30
5.3.1	Perfusão Transcardíaca	30
5.3.2	Decapitação	30
5.4	Análises	31
5.4.1	Imuno-histoquímica	31
5.4.2	Ensaio de PCR Quantitativo (qPCR)	31
5.5	Análise Microscópica	33
5.6	Análise Quantitativa	33
5.7	Análise Estatística	34
6	RESULTADOS	34
6.1	Testes Comportamentais	34

6.2	Dosagem de Melatonina.....	38
6.3	Expressão de RNAm dos receptores MT ₁ e MT ₂	39
6.4	Quantificação e distribuição de células imunorreativas à MT ₁ e MT ₂	41
7	DISCUSSÃO.....	46
8	CONCLUSÃO	52
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Um dos mais complexos comportamentos que o ser humano ou animais em geral podem realizar é o comportamento social, o qual se dá entre co-específicos, e resulta em relações sociais. O comportamento social, tem como base a capacidade dos indivíduos em se comunicar, em perceber o outro, em processar e interpretar pistas sociais, assim como responder com comportamentos apropriados (BARAK, FENG, 2016).

Assim, o comportamento social pode ser caracterizado como interações entre organismos com duração e função determinadas (BLUMSTEIN et al., 2010; TODOROV, 2012) fundamentais para a saúde e o bem-estar destes (BERKMAN, 1984; ALCALÁ-LÓPEZ et al., 2017). Áreas encefálicas como o hipocampo, amígdala, ínsula, cerebelo, córtex pré-frontal, hipotálamo, áreas mesencefálicas e núcleo accumbens participam da expressão das habilidades sociais e, conseqüentemente, do comportamento social (MELIS et al., 2007; DÖLEN et al., 2013; GUNAYDIN et al., 2014; ALCALÁ-LÓPEZ et al., 2017; ADAMASZEK et al., 2016). Alterações morfológicas ou bioquímicas nestas áreas podem levar à distúrbios no comportamento social em várias neuropatologias como a depressão, a esquizofrenia, distúrbios bipolares, transtorno do espectro do autismo (TEA) e Síndrome de Williams (BLUMSTEIN et al., 2010; HAAS et al., 2012; MEDA, PRYWELLER, THORNTON-WELLS, 2012; BUFFINGTON et al., 2016; ONAOLAPO et al., 2017).

Dentre os neurotransmissores e neurohormônios classicamente responsáveis pela modulação do comportamento social estão a dopamina, noradrenalina, GABA, serotonina e ocitocina (KEVERNE, CURLEY, 2004; DONALDSON, YOUNG, 2008; GROPE et al., 2013; PIZZI et al., 2017; TANAKA et al., 2017). Além destes, a melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, também está relacionada a patologias que englobam comportamentos sociais alterados. Em algumas destas patologias, já foi demonstrado como característica bioquímica baixos níveis de melatonina (MELKE et al., 2008; JONSSON et al., 2010). Tal diminuição nos níveis de melatonina pode ser resultado de alterações na expressão de suas enzimas de síntese, a hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (MELKE et al., 2008; JONSSON et al., 2010) e arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) (SORIA et al., 2010).

Como evidências neuroanatômicas do envolvimento da melatonina e seus receptores na modulação de comportamentos sociais, a expressão dos receptores de melatonina, MT₁ e MT₂, já foi descrita em áreas encefálicas relacionadas ao controle comportamental (WEIL et

al., 2006; SHELTON et al., 2012; LACOSTE et al., 2015; WALY, HALLWORTH, 2015; PINATO et al., 2015; BOULOS et al., 2017; PINATO et al., 2017; GUISSONI CAMPOS et al., 2018). Estudos com camundongos transgênicos com deleção para o receptor de melatonina MT₁, demonstraram alterações comportamentais relacionadas com a depressão melancólica em humanos, como diminuição na mobilidade nos testes de natação forçada e na suspensão da cauda e redução no consumo de sacarose, sugerindo envolvimento desse receptor em quadros depressivos e no desempenho neurológico habitual (WEIL et al., 2006; COMAI et al., 2015). A deleção dos receptores MT₁ e MT₂, também induziu comportamentos semelhantes a depressão e ansiedade em camundongos (LIU et al., 2017).

Resultados interessantes também têm sido demonstrados com a administração de melatonina, ou do análogo agomelatina, com efeito potencial na melhora de comportamentos em patologias que expressam alterações no comportamento social. Trabalho do nosso grupo demonstrou que em crianças com TEA, após a administração de melatonina observou-se melhora na qualidade do sono e no comportamento da interação social (ZUCULO et al., 2017). Trabalhos encontrados na literatura também demonstraram que a administração de melatonina, em camundongos, em modelo de Alzheimer pode melhorar comportamentos neuropsicológicos, por meio da modulação da proteína GSPTP1 (glutathione S-transferase P1) associada à ansiedade, e da proteína CPLX1 (complexina 1) associada à depressão. Essas proteínas foram menos expressas no hipocampo dos ratos com Alzheimer, e a melatonina foi capaz de corrigir sua expressão (NIE et al., 2017). Além disso, a melatonina propicia efeitos protetores em modelos de indução de danos em neurônios do hipocampo associados com comportamentos depressivos e ações contra o estresse (RUKSEE et al., 2014; EKTHUWAPRANEE et al., 2015). Tais resultados abrem a perspectiva para o uso da melatonina ou do análogo agomelatina no tratamento das alterações de comportamento social, aliado a várias classes de fármacos usados nessas terapias, como os antidepressivos (FLECK et al., 2009), antipsicóticos (MOREIRA, GUIMARÃES, 2007; BRUIJNZEEL et al., 2014; LAI et al., 2017) e estabilizadores de humor (TOHEN et al., 2005).

A vantagem da utilização da melatonina e seus agonistas em substituição ou em associação aos antidepressivos convencionais, seria a melhora nos sintomas depressivos, na ansiedade e hipocondria e menor ocorrência de efeitos colaterais como a anedonia no começo do tratamento. Outra vantagem seria o menor risco para pacientes com doenças cardiovasculares já que alguns antidepressivos como os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores da monoaminoxidase (iMAO) são considerados cardiotóxicos, pois podem causar taquicardia reflexa devido ao bloqueio de receptores α -1-adrenérgicos e receptores

colinérgicos, e ativação simpática (MORENO, MORENO, SOARES, 1999). Ao contrário dos antidepressivos convencionais a melatonina e a agomelatina não atuam em receptores adrenérgicos e colinérgicos (ÁLAMO, LÓPEZ-MUÑOZ, 2010; BOGOLEPOVA et al., 2012; MEDVEDEV, 2017).

Apesar das fortes evidências de que a melatonina seria um potencial candidato ao tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos, os mecanismos envolvidos nessa ação ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim, ressalta-se a relevância da investigação sobre a participação da melatonina e dos receptores MT₁ e MT₂ nos mecanismos envolvidos na interação social. Tal investigação visa contribuir tanto para o entendimento sobre as possíveis causas de diferentes distúrbios neuropsiquiátricos, como para a possibilidade de terapias.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPORTAMENTO SOCIAL E SOCIABILIDADE

O reconhecimento entre os mesmos de uma espécie torna-se essencial para o desenvolvimento do comportamento em grupo ou interação social (MOREIRA, ABREU, OLIVEIRA, 2006) e tais relações sociais geram significado à vivência humana, podendo ainda traçar a personalidade e existência de um indivíduo (BERGAMIN, PRUDENTE, 1987). O comportamento social resulta de uma série de processos neurais que envolvem estruturas encefálicas específicas como o córtex orbitofrontal, relacionado a tomada de decisão e processamento emocional (BECHARA, DAMÁSIO, DAMÁSIO, 2000); o córtex ventromedial frontal responsável por associar informações prévias a situação atual; o corpo amigdalóide que avalia rapidamente o potencial de ameaça de uma situação (ADOLPHS, 1999); e o hipocampo relacionado as memórias (FERREIRA, 2011; CAMPOS, CRUZ-RIZZOLO, PINATO, 2015), sendo estes dois últimos pertencentes ao sistema límbico, que também engloba o giro do cíngulo, giro para-hipocampal, área septal, hipotálamo, núcleos mamilares, núcleos anteriores do tálamo e os núcleos habenulares (HOLANDA et al., 2013). Além dessas, as áreas corticais pré-frontais, orquestram as reações emocionais, exercendo uma intensa atividade modulatória sobre estruturas límbicas, sendo o principal centro de organização e de planejamento de ações, inclusive emocionais (LEDOUX, 2003). A existência de correlação entre processamentos emocionais e cognitivos, é particularmente evidente em situações complicadas que englobam conflitos, tomada de decisões e interações sociais (CAGNIN, 2008).

Lesões ou disfunções nessas áreas ou circuitos podem levar a patologias ou déficits relacionados ao transtorno de humor (DAVIDSON et al., 2002). Na depressão por exemplo, há relatos de alterações anatômicas e químicas no córtex orbitofrontal bilateral (LAI et al., 2000), diminuição de metabolismo no córtex pré-frontal (SOARES, MANN, 1997), alterações químicas no hipocampo e amígdala (SWEENEY, KMIEC, KUPFER, 2000). No comportamento anti-social também há indicação de redução de metabolismo no córtex pré-frontal (BASSARATH et al., 2001), bem como no hipocampo (SODERSTROM et al., 2002).

2.1.1 COMPORTAMENTO SOCIAL EM RATOS

Em ratos, experimentos de exposição do animal a um co-específico mostraram que o comportamento de levantar e o comportamento de farejar em frente à área da gaiola do co-específico está relacionado com a interação social (BONUTI, 2014; GOES et al., 2013; BONUTI, MORATO, 2017).

O comportamento de limpar-se dos ratos está relacionado a situações de conflito, excitação e estresse causados por situações de novidade (BONUTI, MORATO, 2017).

Assim, esses parâmetros têm sido usados para avaliar a interação social e a ansiedade e o stress em diferentes modelos animais.

2.2 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), identificada desde 1958, é uma indolamina lipofílica sintetizada principalmente pela glândula pineal durante a noite (GOLDMAN, 1999; SIMMONEAUX, 2003; HARDELAND, 2009). Liberada na corrente sanguínea e no líquido imediatamente após sua síntese, a melatonina alcança células e receptores expressos em vários órgãos do corpo (REITER, 1991), onde exerce funções como sincronizadora de ritmos circadianos incluindo o ciclo sono-vigília (HARDERLAND et al., 2012), como antioxidante (TAN et al., 2000; ASGHARI et al., 2016), neuroprotetora (BASSANI et al., 2014; JOSHI et al., 2015; PINATO et al., 2015), anticancerígena (TAMARKIN et al., 1981) e moduladora de comportamentos sociais (WEIL et al., 2006; JONSSON et al., 2014; COMAI et al., 2015; LIU et al., 2017).

A ação fisiológica da melatonina ocorre em grande parte, mas não exclusivamente, por sua interação com receptores acoplados às proteínas G (principalmente inibitórias), conhecidos como MT₁ e MT₂ (DUBOCOVICH, MARKOWSKA, 2005). Tanto a melatonina

como moléculas agonistas podem modular o comportamento social/emocional por meio da ação nestes receptores (MELKE et al., 2008; JONSSON et al., 2010).

Em ambos receptores a ligação com a melatonina leva a modificações no funcionamento de enzimas celulares, tais como a adenilciclase (AC), fosfolipase C (PLC), guanilciclase, e também nos canais de cálcio e potássio (SING, JADHAV, 2014).

A adenilciclase (AC) é uma proteína transmembranar, sendo uma enzima amplificadora capaz de transformar ATP (adenosina trifosfato) em AMPc (adenosina monofosfato cíclico); a AMPc ativa a PKA (proteína quinase A) que modula funções celulares fosforilando outras proteínas no meio intracelular modulando o metabolismo energético, a divisão e diferenciação celular e a modulação de canais iônicos (DE MOURA, VIDAL, 2011). Assim, se a melatonina ou seu análogo se ligam a uma proteína Gi (inibitória), esta é sensibilizada, induzindo a repressão dos efeitos da adenilciclase (AC), reduzindo consequentemente os níveis intracelulares da AMPc e na sequência da PKA (HARDELAND, 2009; SLOMINSKI et al., 2012).

Por outro lado, quando o MT₁ está ligado a proteína Gq, sua ligação com a melatonina ou análogos leva a ativação da fosfolipase C, gerando assim uma série de ações na célula que são responsáveis por regular funções como a atividade da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a propagação sináptica no SNC, a pressão sanguínea e o relaxamento muscular (VIARO, NOBRE, EVORA, 2000).

Os receptores MT₁ e MT₂ já foram descritos no córtex pré-frontal, amígdala, área septal, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo e córtex parietal em diferentes espécies (WEIL et al., 2006; PANDI-PERUMAL et al., 2008; SHELTON et al., 2012; LACOSTE et al., 2015; WALY, HALLWORTH, 2015; CAMPOS, CRUZ-RIZZOLO, PINATO, 2015, BOULOS et al., 2017, GUISSONI CAMPOS et al., 2018).

2.3 VIA DE SÍNTESE DA MELATONINA

A síntese de melatonina ocorre a partir do aminoácido essencial triptofano, captado da circulação para a glândula pineal e hidrolisado pela enzima triptofano-hidroxilase (TPH) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Esse, por sua vez, sofre a ação da enzima 5-HTP descarboxilase, resultando em 5-hidroxitriptamina (serotonina ou 5-HT) (SILVA, 2005; ROBERTS, FITZPATRICK, 2013). Na ausência de luminosidade ocorre a ativação da transcrição do gene da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), responsável por transferir um grupamento acetil para a molécula de 5-HT transformando-a em N-acetilserotonina (NAS).

Na sequência, esta sofre ação da enzima hidroxí-indol-O-metil-transferase (HIOMT) que substitui o hidrogênio do grupamento hidroxila do carbono 5 do grupo indólico por um metil, gerando assim a N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) (SIMONNEAUX, RIBELAYGA, 2003; SILVA, 2005; CARVALHO et al., 2017) (Figura 1).

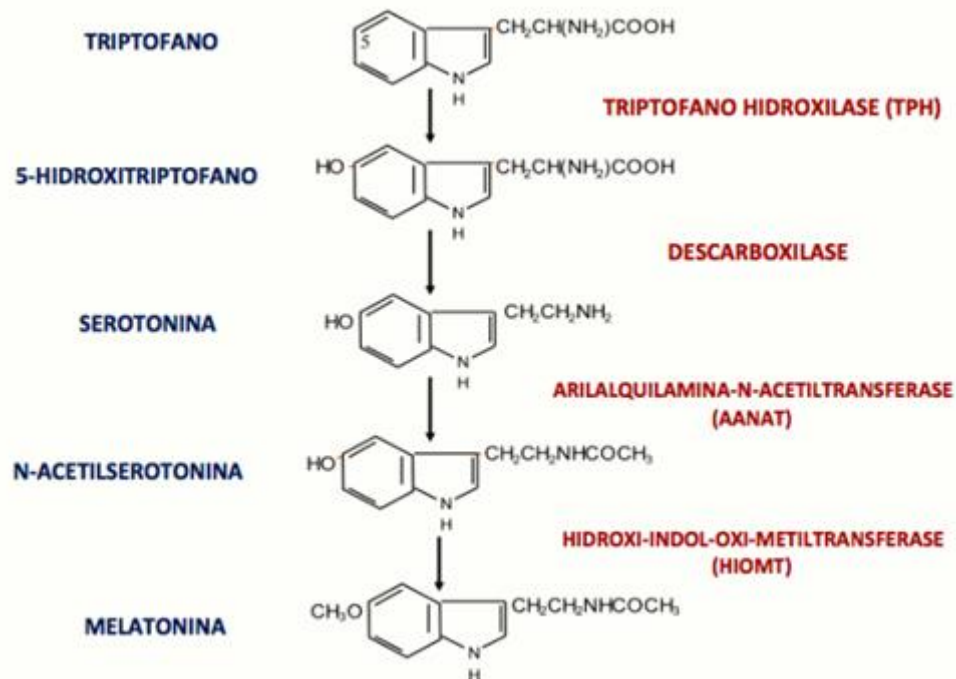


Figura 1. Esquema da via síntese da melatonina a partir do aminoácido triptofano. Em vermelho as enzimas envolvidas em cada etapa de transformação (Imagem adaptada de Ferreira, 2015).

A síntese da AA-NAT e consequentemente de melatonina durante a noite, é desencadeada pela liberação de noradrenalina na glândula pineal nessa fase do ciclo claro-escuro. O controle desta sinalização do ciclo claro-escuro ambiental para a pineal, nos mamíferos, tem início em fotorreceptores presentes em células ganglionares retinianas da onde a informação de ausência de luz, quando captada, é transmitida ao núcleo supraquiasmático (NSQ) no hipotálamo e, por uma via polissináptica, alcança a glândula pineal. Do NSQ, a informação segue para o núcleo paraventricular que se projeta para neurônios pré-ganglionares da coluna intermédio lateral, os quais liberam acetilcolina na sinapse com neurônios pós-ganglionares presentes nos gânglios cervicais superiores. Estes liberam noradrenalina na glândula pineal, a qual é reconhecida pelos pinealócitos que contém

receptores adrenérgicos ($\beta 1$ e $\alpha 1$) e nos quais estimula a expressão gênica da enzima AA-NAT (SIMONNEAUX, RIBELAYGA, 2003) (Figura 2).

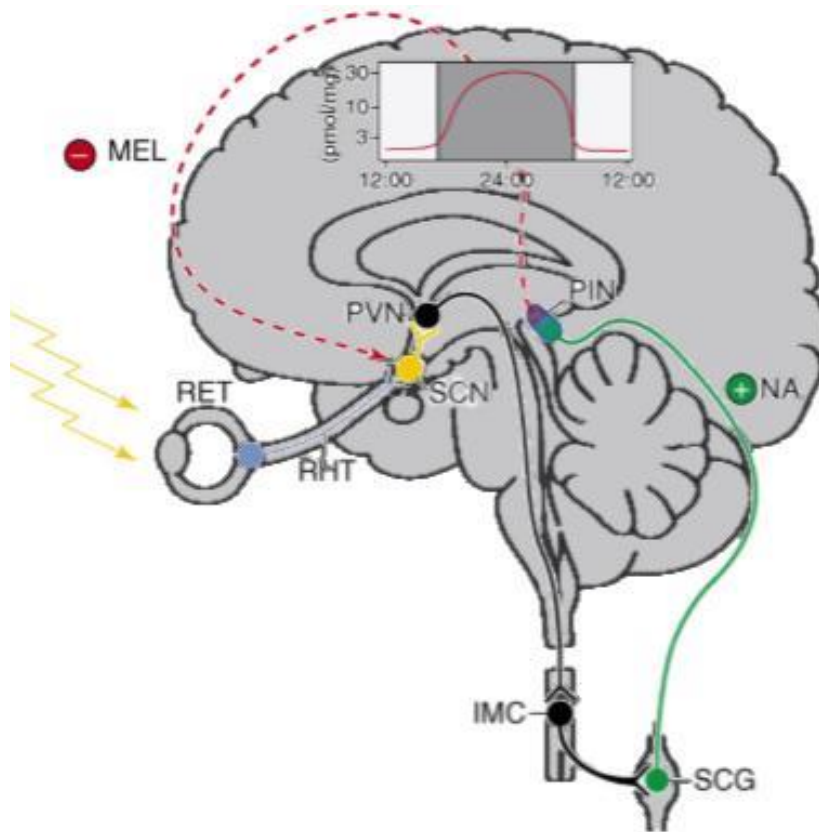


Figura 2 - Via polissináptica da sinalização fótica para síntese de melatonina. Adaptada de Maronde, Stehle (2007). Células ganglionares da retina (RET) captam sinais luminosos do ambiente, o trato retino-hipotalâmico (RHT) transmite essas pistas para o núcleo supraquiasmático (SCN). As informações luminosas provenientes do supraquiasmático são propagadas por meio dos núcleos paraventriculares (PVN) até coluna intermediolateral da medula espinal (IMC), e posteriormente para os gânglios cervicais superiores (SCG) que liberam noradrenalina (NA) na pineal (PIN), propiciando a produção de melatonina na ausência da luz. A melatonina, após liberada atua em diferentes alvos incluindo o NSQ. Siglas: IMC= coluna intermediolateral da medula espinal, MEL= melatonina, NA= noradrenalina, PIN= pineal; PVN= núcleos paraventriculares; RET= retina; RHT= trato retino-hipotalâmico; SCG= gânglios cervicais superiores; SCN= núcleo supraquiasmático.

2.4 RECEPTORES MT_1 e MT_2

Os receptores de melatonina MT_1 e MT_2 , são constituídos por extensas cadeias de aminoácidos, sendo o MT_1 composto por 350 e o MT_2 por 362 aminoácidos, apresentando respectivamente peso molecular de 39 kDa e 40 kDa (RIVERA-BERMUDEZ et al., 2004; JOCKERS et al., 2008). Ambos são expressos por neurônios, mas não por células da glia, em

diferentes regiões encefálicas, onde suas funções ainda não foram totalmente esclarecidas (LACOSTE et al., 2015).

Dentre as funções já conhecidas da melatonina, está a modulação da qualidade do sono, onde o MT₂ atua na modulação da atividade neuronal do sono NREM (OCHOA-SANCHEZ, 2011) e o MT₁ está relacionado no sono REM (CLEMENT et al., 2012; COMAI, OCHOA-SANCHEZ, GOBBI, 2013).

Outra função da melatonina mediada pelos receptores, seria a liberação dos neurohormônios ocitocina e vasopressina. Corroborando com esta função, o receptor MT₂ foi encontrado nos núcleos paraventriculares, pré-ópticos e supra-ópticos (OLCESE, LOZIER, PARADISE, 2013).

A ação da melatonina como moduladora da dor neuropática e inflamatória, também está relacionada a presença destes receptores em áreas cerebrais implicadas no controle da dor (AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009; HAHM et al., 2011; LOPEZ-CANUL et al., 2015).

Quanto aos comportamentos sociais, sua relação com a melatonina e seus receptores, já foi demonstrada pela presença de receptores MT₁ no núcleo dorsal da rafe, envolvido na fisiopatologia de transtornos de humor e depressão (DOMINGUEZ-LOPEZ, HOWELL, GOBBI, 2012; LIU et al., 2017), MT₁ ou MT₂ na área septal, hipocampo e habênula classicamente envolvidas em comportamentos como ansiedade e estresse (YADIN et al., 1993; KARAKAS et al., 2011), além de experimentos com camundongos *knockout* para o receptor MT₁, onde foi observado comportamento depressivo-melancólico (COMAI, OCHOA-SANCHEZ, DOMINGUEZ-LOPEZ, 2015).

2.5 MELATONINA NO COMPORTAMENTO

A melatonina, classicamente relacionada à modulação do sono e do sistema circadiano (HARDERLAND et al., 2012; PINATO et al., 2015), a funções antioxidante e moduladora do sistema imunológico (TAN et al., 2000; JOSHI et al., 2015; ASGHARI et al., 2016) está associada também à modulação de características comportamentais sociais (WEIL et al., 2006; JONSSON et al., 2014; COMAI et al., 2015; LIU et al., 2017).

A deleção do receptor MT₁ em camundongos, resultou em déficits sensório-motores e depressão (WEIL et al., 2006), além de alterações comportamentais e neurobiológicas parecidas com a depressão melancólica humana, sugerindo que este pode estar envolvido na patogênese dessa doença (COMAI et al., 2015). Já a deleção de ambos receptores, MT₁ e MT₂ resultou em deficiência no comportamento de interação social e aumento do comportamento

semelhante à ansiedade, sugerindo que alterações na expressão destes receptores podem ter relação com a fisiopatologia da ansiedade e da depressão (LIU, CLOUGH, DUBOCOVICH, 2017).

Um estudo de revisão, indica que a melatonina auxilia na diminuição do medo condicionado, podendo ser utilizada como tratamento para estresse pós-traumático (HUANG, YANG, LI, 2017). Em modelo animal que mimetiza a doença de Alzheimer, a administração de melatonina diminuiu os quadros de ansiedade e depressão (NIE et al., 2017). Em ovelhas, a melatonina foi capaz de diminuir o impacto do isolamento social, sendo relacionada à efeitos calmantes em circunstâncias sociais estressantes (GUESDON et al., 2013).

Pacientes com Transtorno do Espectro do Autismo, apresentam baixa concentração plasmática de melatonina quando comparada com seus controles, com consequentes problemas de sono e comportamentais (MELKE et al., 2008). Após a administração de melatonina em crianças com TEA, observou-se melhora na qualidade do sono e no comportamento social (ZUCULO et al., 2017).

Sujeitos com depressão apresentam além do humor depressivo, algumas alterações como ansiedade, incapacidade de concentração e distúrbios de sono (SORIA, URRETAVIZCAYNA, 2009). Nestes casos foi constatada diminuição na concentração plasmática de melatonina, assim como alterações no seu padrão de liberação (CLAUSTRAT et al., 1984; SRINIVASAN et al., 2006; VAN REETH, MACCARI, 2007) e o baixo nível salivar de melatonina foi correlacionado com parâmetros de gravidade de sintomas depressivos em pacientes jovens que passavam por tratamento psiquiátrico (SUNDBERG et al., 2016).

Na síndrome de Williams-Beuren, que é caracterizada por alterações na comunicação e em habilidades sociais, foi observado diminuição no desempenho cognitivo, distúrbios de sono e memória, e nível de melatonina plasmática diminuído (SANTORO et al., 2016).

2.6 AGOMELATINA

Existem alguns análogos da melatonina descritos na literatura, muito usados no tratamento da insônia. Dentre estes, a agomelatina, um agonista de melatonina não seletivo para MT₁/MT₂ apresentou também efeitos ansiolíticos e antidepressivos (PANDI-PERUMAL et al., 2013; MONTEIRO, 2014; EMET et al., 2016). Em modelo animal de estresse crônico a agomelatina foi considerada um antidepressivo tão eficiente quanto a imipramina e fluoxetina (PAPP et al., 2003).

Em camundongos, a administração da agomelatina apresentou a reversão de comportamentos de depressão e ansiedade, assim como a melatonina e o antidepressivo tricíclico (desipramina) (BARDEN et al., 2002), sem os efeitos colaterais gerados pela grande parte dos antidepressivos, como perturbações intestinais, problemas sexuais e transtornos de sono (ÁLAMO, LÓPEZ-MUÑOZ, 2010; HOWLAND, 2011; BOTHOREL et al., 2014).

De maneira geral, a agomelatina se mostra eficiente em todos os modelos utilizados para depressão, estes englobam testes para ansiedade, ritmos circadianos e estresse; já a melatonina apresenta efeitos positivos em modelos de ansiedade e nos que envolvem antagonistas de 5-HT_{2C} (ÁLAMO, LÓPEZ-MUÑOZ, 2010).

2.7 REGIÕES ENCEFÁLICAS

2.7.1 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

O córtex pré-frontal é considerado uma área de associação terciária que ocupa cerca de ¼ da superfície total do córtex cerebral, é a porção mais anterior do lobo frontal. Se conecta com todas as demais regiões de associação do córtex e do sistema límbico, por meio dos fascículos de associação (MACHADO, HARTEL, 2006). Esta área encefálica está envolvida em funções comportamentais como adequação perante diferentes situações sociais, controle do comportamento emocional (em conjunto com o hipotálamo e o sistema límbico), memória recente e manutenção da atenção (SZCZEPANSKI, KNIGHT, 2014). O córtex pré-frontal ainda pode ser dissociado em três regiões, a orbital (inferior ou ventral), medial (cingulada) e a lateral (dorsolateral), as quais desempenham funções de acordo com as conexões que mantém (FUSTER, 2001).

A porção orbital do córtex pré-frontal realiza conexões com o sistema límbico o que a correlaciona com o comportamento emocional (PETRIDES, PANDYA, 2007). Lesões nesta área podem gerar irritabilidade, impulsividade e hiperatividade (FUSTER, 2001; JODAR-VICENT, 2004).

A região medial do córtex pré-frontal está relacionada com o sistema límbico no processamento de informações sensoriais (JUNQUÉ et al., 2001) e com comportamentos motivados (MEGA et al., 1994). Pacientes com lesões envolvendo esta região mostraram alterações no controle emocional, cognitivo e comportamental (SCHENEIDER, KOENIGS, 2017).

A área dorsolateral mantém conexões com regiões subcorticais e corticais, com envolvimento em funções cognitivas e executivas tais como adaptação ao ambiente, organização comportamental e antecipação de consequências (FUSTER, 2000). Esta porção se desenvolve mais tardiamente e apresenta alterações na esquizofrenia e no autismo (THORPE, FABRE-THORPE, 2001; GHASHGHAEI, BARBAS, 2002).

Com base nessas informações, pode-se dizer que o córtex pré-frontal desempenha funções fundamentais para a adequação social dos indivíduos, tanto em humanos como demais animais garantido a coexistência com outros indivíduos. Assim, essa região é responsável pela adaptação à ambientes e situações inesperadas, garantindo o convívio e existência entre indivíduos (SEMENDEFERI, DAMASIO, 2000; FUSTER, 2001). O córtex pré-frontal é uma das áreas do encéfalo que amadurece mais tardiamente (FUSTER, 2002) e tende a apresentar arborização dendrítica mais complexa do que em regiões que se desenvolvem precocemente (TRAVIS et al., 2005) sendo por isso muito vulnerável a apresentar alterações em diversos distúrbios e patologias (GHIKA, 2008; DUMONTHEIL et al., 2008). A psicopatia, por exemplo, que apresenta características como a falta de empatia e comportamento antissocial impulsivo vem sendo correlacionada a disfunções no córtex pré-frontal. Aumento de volume nas sub-áreas pré-frontais: orbitofrontal, medial e dorsolateral estão relacionadas às características antissocial e a impulsividade desta patologia (KORPONAY et al., 2017).

2.7.2 HIPOCAMPO

O hipocampo é uma estrutura cortical par, localizada na porção medial do lobo temporal, situada acima do giro para-hipocampal e abaixo do corno inferior dos ventrículos laterais. É uma área cortical de associação límbica composta por circuitos internos complexos e dividida em duas regiões essenciais, o corno de Amon e o giro denteado (MACHADO, HARTEL, 2006). A sub-região denominada corno de Ammon apresenta quatro divisões em seres humanos (em ratos apenas três), a CA1, CA2, CA3 e CA4. O giro denteado (GD) é composto por três diferentes camadas, a camada molecular, a camada granulosa constituída por neurônios granulares e a camada polimórfica (CAMPOS, CRUZ-RIZZOLO, PINATO, 2015; SPILLA, 2018). Outra região do hipocampo, o subículo, conecta-se à CA1 e é responsável por enviar axônios ao córtex entorrinal, ao fórnice, ao corpo amigdalóide e às áreas de associação no lobo temporal (LENT, 2003; ESPERIDIÃO-ANTÔNIO et al., 2008).

As funções hipocampais estão relacionadas à memória, regulação de comportamentos emocionais, comportamentos motivados, memória espacial, memória associativa olfativa-espacial e à tomada de decisões (ESPERIDIÃO-ANTÔNIO et al., 2008; BARRETO, 2016).

2.7.3 HIPOTÁLAMO

O hipotálamo é uma estrutura diencefálica composta por núcleos classicamente relacionado ao controle do sistema nervoso autônomo e da homeostasia e consequentemente de funções viscerais. Está envolvido em funções a geração e regulação de ritmos circadianos incluindo o ciclo sono-vigília (BAILEY, SILVER, 2014), regulação do sistema endócrino (CLARKE, 2014) e modulação da ingesta alimentar (CARMO-SILVA, CAVADAS, 2017).

Algumas áreas do hipotálamo relacionam-se ainda com o sistema límbico participando juntamente com a amígdala do controle de raiva, medo, agressividade e punição (ESPERIDIÃO-ANTÔNIO et al., 2008).

2.7.4 CEREBELO

O cerebelo apesar de conhecido classicamente por suas funções de aprendizagem de habilidades motoras, articulação verbal, equilíbrio, funções autonômicas, coordenação de movimentos e manutenção da postura, também apresenta relação com funções cognitivas, emocionais e comportamentais, visto que estabelece conexões com as áreas cerebrais pré-frontais e regiões límbicas (BUGALHO et al., 2006, ADAMASZEK et al., 2016).

Problemas de irrigação no cerebelo levam a variações comportamentais como irritabilidade, impulsividade e falta de inibição (extroversão), além de dificuldade cognitiva visual-espacial (BUGALHO et al., 2004). Da mesma forma, tumores na fossa posterior (onde o cerebelo repousa), demonstraram comportamentos muito semelhantes aos observados no TEA, apresentando movimentos repetitivos, evitaram contatos físicos e visuais com outros indivíduos, com perda de empatia e linguagem reduzida (RIVA, GIORGI, 2000).

Lesões englobando o lobo posterior do cerebelo e do vermis, resultam ainda em dificuldade com planejamento, raciocínio abstrato, memória, em expressar emoções e sentimentos provavelmente devido a falhas na comunicação cerebelar com as áreas límbicas, temporal superior e pré-frontal (SCHMAHMANN, SHERMAN, 1998).

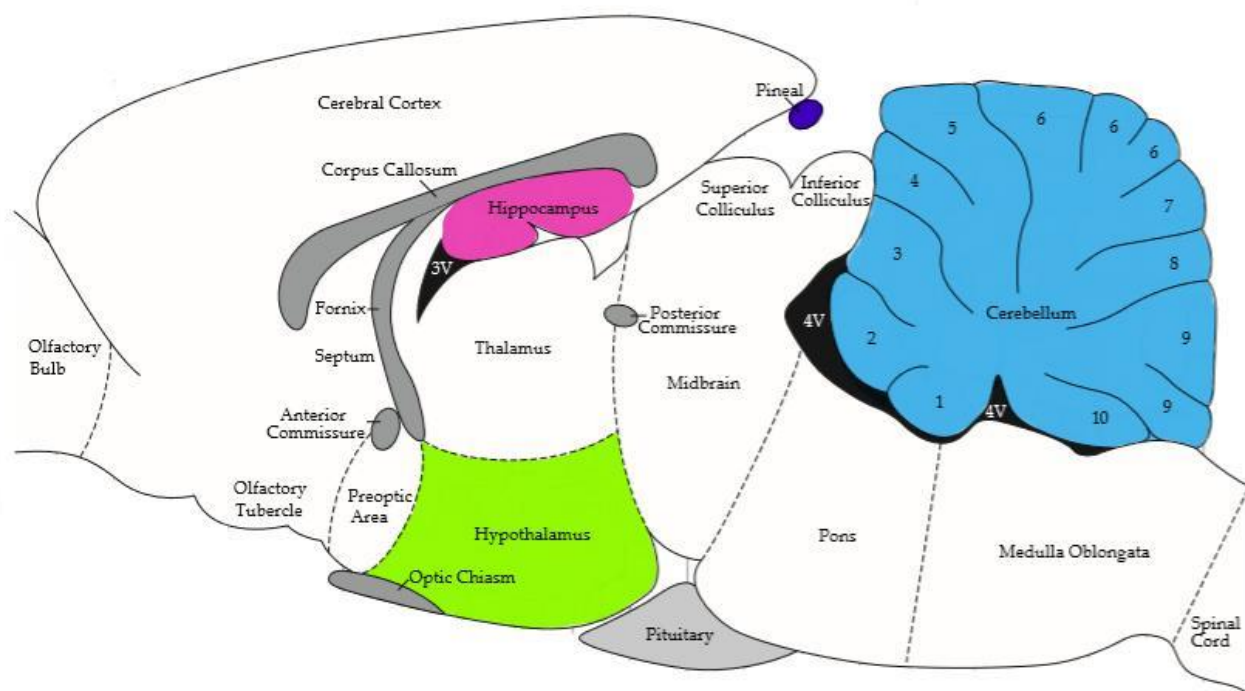


Figura 3 – Desenho esquemático do encéfalo de rato em corte sagital, evidenciando as áreas encefálicas nas quais foram avaliadas a expressão gênica e a distribuição de células imunorreativas. Adaptada de Paxinos e Watson (2004).

3. JUSTIFICATIVA

Os comportamentos sociais e emocionais estão intrinsecamente ligados à vida dos humanos e a outros animais, afetando sua convivência e rotina. O desequilíbrio de genes, neurohormônios, neurotransmissores e proteínas podem afetar esses comportamentos, acarretando em distúrbios neuropsiquiátricos que afetam a população, seja em maior ou menor grau. Dentre as moléculas envolvidas na biologia dos problemas neuropsiquiátricos, a melatonina e seus receptores têm se mostrado atuantes nos mecanismos envolvidos nestas patologias e como possíveis alvos em seus tratamentos. Assim, ressalta-se a relevância da investigação sobre a participação da melatonina e de seus receptores MT₁ e MT₂ nos mecanismos envolvidos na interação social. Tal investigação pode contribuir tanto para o entendimento sobre as bases de diversos distúrbios que apresentam alterações comportamentais de interação social, como para a possibilidade de terapias.

A hipótese do presente estudo foi de que o modelo animal com diferença na interação

social, apresentaria alteração na concentração plasmática de melatonina, assim como na expressão gênica de receptores MT₁ e MT₂ em diferentes áreas encefálicas envolvidas no comportamento social, e na quantidade e localização de células imunorreativas aos receptores MT₁ e MT₂ no córtex pré-frontal.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração plasmática de melatonina, a expressão gênica dos receptores MT₁ e MT₂ em diferentes áreas encefálicas, e a localização e quantificação de células imunorreativas aos receptores MT₁ e MT₂ no córtex pré-frontal de modelo animal com maior interação social, em comparação a animais com interação social considerada normal para a espécie.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros comportamentais para comprovar a maior interação social em animais da linhagem com comportamento mais social em relação aos controles.
- Avaliar a concentração plasmática de melatonina.
- Avaliar a expressão gênica dos receptores de melatonina (MT₁ e MT₂) no córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo e hipotálamo.
- Avaliar a distribuição das células imunorreativas aos receptores MT₁ e MT₂ nas divisões do córtex pré-frontal.

5. MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos do modelo animal que apresenta comportamento com maior interação social, desenvolvido por meio de seleção comportamental em diversas gerações de animais no laboratório de psicobiologia da USP – Ribeirão Preto, resultando em uma linhagem de animais muito sociáveis (+SOC). As caracterizações comportamentais foram realizadas pela equipe do prof. Dr. Silvio Morato coordenador do referido laboratório em todos os animais utilizados neste estudo para

confirmar a característica +SOC. Os animais do grupo controle também passaram pelos mesmos testes comportamentais e foram cedidos pelo mesmo biotério que os animais do grupo +SOC. Foram utilizados para a pesquisa os animais do modelo mais social da 13ª geração, sendo 12 animais experimentais (+SOC) (6 para perfusão e 6 para decapitação) e 12 animais controles (6 para perfusão e 6 para decapitação). O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética local, registrado sob o protocolo nº 890/2017.

Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições com temperatura controlada em aproximadamente 22°C, ciclo claro/escuro (12/12 horas), água e ração *ad libitum*.

Divisão dos grupos:

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar adultos (60 dias), divididos em dois grupos:

- Grupo mais social (+SOC): ratos da linhagem com comportamento mais social (N=12).
- Grupo controle (CONT.): ratos controles com comportamento típico/normal (N=12).

Para a decapitação: foram utilizados seis animais do grupo mais social e seis animais do grupo controle. O sangue foi extraído para a dosagem de melatonina pelo método de ELISA, e as regiões encefálicas foram dissecadas em condições estéreis e imediatamente congeladas a -80°C para posterior extração de RNA para realização da técnica de PCR em tempo real.

Para a perfusão: foram utilizados seis animais do grupo mais social e seis animais do grupo controle. O cérebro foi retirado após a perfusão, para ser utilizado na imunohistoquímica em solução (*free-floating*).

5.2 TESTE COMPORTAMENTAL

O teste comportamental realizado foi o de sociabilidade utilizando-se campo aberto de madeira (120cm x 120cm x 40cm) com uma gaiola (34cm x 22cm x 26cm) acoplada em uma das paredes da estrutura. O teste foi realizado utilizando dois animais, onde um era depositado na gaiola e o outro no campo aberto. O experimento foi gravado durante 10 minutos para cada animal inserido no campo aberto; posteriormente foi efetuada a fase de análise do teste, onde

por meio da tela do monitor de vídeo; o chão do campo aberto foi delimitado em 36 quadrados de 20cm, apresentando a seguinte segmentação: 16 quadrados centrais sem parede alguma; 15 quadrados com uma parede vizinha (caracterizado como Periferia); 4 quadrados com duas paredes nos cantos (definido como Cantos); e 1 quadrado alinhado defronte a gaiola. Foi utilizado o software X-PloRat para fazer o registro das imagens. Com essa divisão foi possível registrar em cada espaço a repetição e duração de diferentes comportamentos, como por exemplo: entradas e tempo despendido nos diversos quadrados do campo aberto, tempo e frequência farejando, o ato de limpar-se e levantar-se (BONUTI e MORATO, 2017). Neste teste, ao acoplar a gaiola externa contendo um co-específico (o segundo rato), avaliou-se o tempo em que o rato levou explorando todas as áreas, sendo que os animais do grupo +SOC destinam grande parte do tempo a área defronte à gaiola. O aumento de tempo gasto na área da gaiola, sugere que o animal está mais motivado a interagir com o co-específico (BONUTTI e MORATO, 2017) (Figura 4).

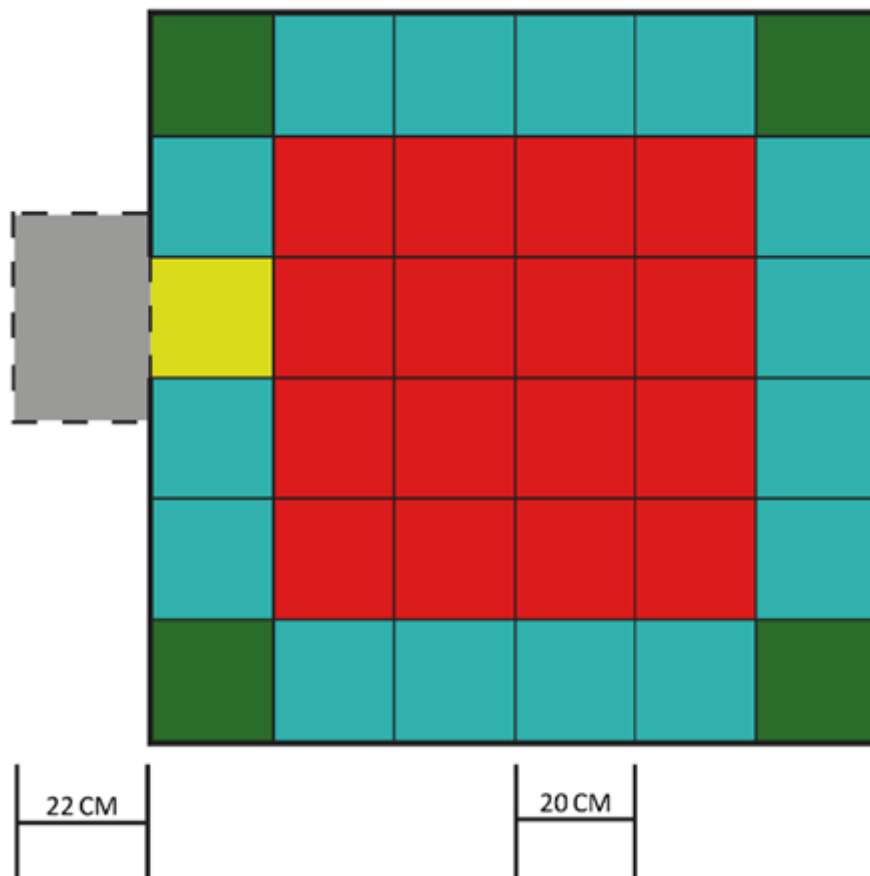


Figura 4. Ilustração de Campo aberto de madeira com gaiola acoplada. Em cinza, gaiola acoplada. Em amarelo, área defronte à gaiola. Em verde, áreas de canto (ângulos). Em azul, parede vizinha (periferia). Em vermelho, área central. Adaptada de Bonuti, 2014.

5.3 COLETA DAS AMOSTRAS

5.3.1 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Seis animais de cada grupo foram perfundidos no horário determinado como ZT 17 que representa a 17^o hora após o acender das luzes no biotério (considerado o ZT 0). Assim, em um ciclo 12/12 horas de claro e escuro, as luzes do biotério apagam no ZT 12. Após a injeção de 1mL do anestésico Rompum (solução com Acepromazina 1,8mL, Ketamina 4,5mL, Xylazina 4,5mL e H₂O 7,2mL) sob luz de baixa intensidade foi constatada a anestesia pelo teste de reflexo de repulsão à dor, observado pela contração da pata traseira do animal, quando pressionada. A partir deste momento os animais foram vendados para impedir que a luz do ambiente alcançasse a retina dos mesmos.

Para a perfusão, a região torácica do animal foi exposta propiciando o acesso ao coração, a artéria aorta descendente foi clampeada e uma pequena fissura foi feita na parede do ventrículo esquerdo, permitindo a inserção da cânula (conectada a bomba de perfusão). Em seguida, a aurícula direita foi cortada, permitindo a disseminação das soluções utilizadas para o processo de perfusão; inicialmente a solução salina 0,9% (300mL) e, em seguida, paraformaldeído 4% (400mL).

Após este processo, cada encéfalo foi retirado da calota craniana dos animais e depositado em uma solução de pós-fixação (25mL de paraformaldeído 4% e 5g de sacarose) durante 12 horas, seguido de solução crioprotetora contendo 25mL de tampão PBS pH 7,4 e 5g de sacarose, até a etapa do congelamento e secção em cortes coronais de 40µm de espessura em criostato (Leica CM1850). Os cortes foram armazenados em 6 séries diferentes em solução anti-congelamento, e estocados a -20°C até o momento da imuno-histoquímica para identificar as células imunorreativas ao MT₁ e MT₂.

5.3.2 DECAPITAÇÃO

Seis animais de cada grupo foram decapitados, sem a utilização de anestésico, em guilhotina específica para este fim na fase de escuro (ZT 17) sob luz de baixa intensidade para coleta de sangue e das áreas encefálicas. O sangue foi centrifugado, o sobrenadante foi congelado em -80°C até o momento da dosagem da melatonina por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio imunoenzimático), seguindo o protocolo do fabricante (IBL, Hamburg, Germany). Os resultados obtidos nesta dosagem foram expressas em pg/mL.

Os encéfalos foram retirados e as diferentes áreas encefálicas (córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo e hipotálamo), foram dissecadas em condição estéril e imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração do RNA.

A quantificação da expressão gênica do RNAm dos receptores de melatonina foi realizada por PCR em tempo real quantitativo com iQ[™] SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA).

5.4 ANÁLISES

5.4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes coronais ($40\mu\text{m}$) do encéfalo de cada animal ($N = 6$ por grupo) foram utilizados para a análise das células imunorreativas aos receptores de melatonina (MT_1 e MT_2) pelo método de imuno-histoquímica. Para isso, os cortes foram lavados com tampão PBS 0,1 M pH 7,4 e em seguida foram incubados por 60 minutos em solução tampão PBS-TX (PBS + Triton-X-100-Amresco, Solon, EUA) contendo 2% de soro normal (NDS). Na sequência, foram acrescentados os anticorpos primários anti- MT_1 ou anti- MT_2 (1:200) desenvolvidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), por 48 horas à 18°C em agitação moderada. Posteriormente, os cortes foram novamente lavados em tampão PBS 0,1 M pH 7,4, e incubados em PBS-TX com anticorpo secundário fluorescente (CY3) anti-cabra (Jackson Immuno Research), por 90 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M pH 7,4, e corados por 5 minutos com 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Chemical, cod. D9542 Sigma, St. Louis MO, USA) para auxiliar na detecção da citoarquitetura das áreas encefálicas. Por fim, realizou-se a montagem dos cortes em lâminas e cobriu-se com glicerol e lamínula para análise em microscópio de fluorescência. Para controle da especificidade dos anticorpos, foram utilizados peptídeos bloqueadores imunogênicos MEL-1A-R (N-20) P (Santa Cruz Biotech., TX, USA) e MEL-1B-R (G-20) P (Santa Cruz Biotech., TX, USA).

5.4.2 ENSAIO DE PCR QUANTITATIVO

A expressão do RNAm dos receptores de melatonina (MT_1 e MT_2) nas áreas encefálicas (córtex pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e cerebelo), foi analisada por PCR em tempo real quantitativo com iQ[™] SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA). Seguindo

o protocolo do fabricante.

A utilização do método de PCR em tempo real permite que seja realizada a amplificação, detecção e quantificação de fragmentos genômicos, tanto de DNA quanto de RNA, por meio de marcadores fluorescentes e análise da fluorescência emitida por este (POLONI, 2009 apud NIESTERS, 2002). A PCR em tempo real demanda uma plataforma de instrumentação que inclui um termociclador vinculado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e obtenção da emissão, utiliza também um computador para a captação de resultados que realiza a última análise da reação por meio de um software (NOVAIS, PIRES-ALVES, 2004).

As regiões encefálicas previamente extraídas e congeladas em -80°C , foram descongeladas no momento do procedimento de extração de RNA (ácido ribonucleico). Na sequência foi adicionado $100\mu\text{L}$ de Trizol para facilitar a maceração da amostra, por meio de um pistilo elétrico. Quando a amostra e o Trizol se dissolveram, acrescentou-se $900\mu\text{L}$ de Trizol (para completar um 1mL). Em seguida, foi inserido $200\mu\text{L}$ de clorofórmio e a amostra foi vortexada. Após, a amostra passou pelo processo de centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C , na sequência ocorreu uma separação de 3 fases: 1ª fase: aquosa/transparente, contém o RNA; 2ª fase: branca, contém DNA; 3ª fase: rosa, contém proteínas. Neste protocolo foi utilizada a fase do RNA. Para isso, foi selecionada a fase aquosa, pipetando-se aproximadamente $500\mu\text{L}$ desta fase em um novo eppendorf e adicionado $500\mu\text{L}$ de Isopropanol. Posteriormente a amostra ficou 10 minutos em temperatura ambiente e logo depois foi centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm, neste momento o RNA forma um “pellet” no fundo do eppendorf. Então o sobrenadante foi removido sem descartar o pellet, este foi ressuspensão em $500\mu\text{L}$ de etanol 75%, e a amostra foi levada à centrífuga por 5 minutos a 7500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante, os eppendorfs secaram naturalmente, sobre um papel toalha, dentro da capela de fluxo laminar até no máximo 10 minutos. O pellet foi ressuspensão em $50\mu\text{L}$ de água DEPC, e em seguida foi levado para a placa de leitura no aparelho Biotek, modelo EPOCH. Onde utilizou-se o software GEN-1 para realizar a quantificação de RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Para fazer as fitas complementares, ou seja o processo de conversão do RNA em fitas de DNA (ácido desoxirribonucleico) seguiu-se o protocolo do fabricante (Super Script VILO - 11755-500). Foram utilizados os seguintes primers:

Primers	Sequência (Forward/Reverse)
MT ₁	(F) 5'-CCTCCTGTCTGCCCTTTAATC-3' (R) 5'-CACCCAGAGATGAGAGTCTGC-3'
MT ₂	(F) 5'-AATTGCTGTGGTGTCCTTTTG-3' (R) 5'-TCAGGCGTAGCTTTCTCTCAG'-3'
GAPDH	(F) 5'-TTCTTGTGCAGTGCCAGCC-3' (R) 5'-GTAACCAGGCGTCCGATACG-3'

Os ensaios foram efetuados em StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) passando pelas fases (Holding Stage) 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C, 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60° e 15 segundos a 95°C, com aumento gradual de 0,3°C (Melt Curve Stage).

5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise dos cortes encefálicos, foi realizada em microscopia de campo fluorescente pelo microscópio Olympus BX50. A identificação das regiões encefálicas foi realizada observando o atlas The Rat Brain Atlas (PAXINOS, WATSON, 2004).

5.6 ANÁLISE QUANTITATIVA

Para análise de imagens digitais foi utilizado o software de processamento Image J (McMaster Biophotonics Facility, Canadá), para contagem do número de células imunorreativas para os receptores MT₁ e MT₂ nas divisões (CgL: córtex do cíngulo, PrL: córtex pré-límbico, MO: córtex orbital medial, VO: córtex ventro orbital, LO: córtex orbital lateral, DLO: córtex orbital dorsolateral) do córtex pré-frontal, em cada grupo (Figura 5). Foram contadas todas as células bem marcadas pela imunofluorescência em cada área, em primeiro plano de foco, no aumento de 20x. Foram tiradas duas fotos de cada área, por corte, (cada lâmina apresentando cinco cortes) de uma série inteira e aleatória do córtex pré-frontal.

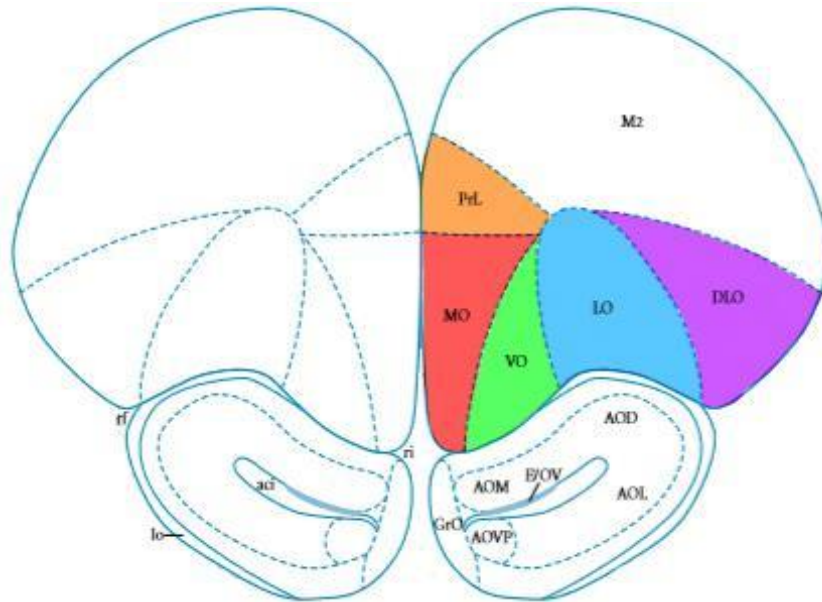


Figura 5 – Desenho esquemático de corte coronal do encéfalo de rato (Wistar) na região do córtex pré-frontal mostrando as divisões PrL, MO, VO, LO, DLO. Adaptada de Paxinos, Watson (2004).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes comportamentais, na dosagem de melatonina, na quantificação do RNAm e na quantificação da imunorreatividade aos receptores MT₁ e MT₂ foram evidenciados como média $\pm$ erro padrão da média (epm) de cada grupo. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi 5% ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1. TESTES COMPORTAMENTAIS

No parâmetro exploração em frente a gaiola (frequência), o grupo mais social apresentou menor frequência ($9,7 \pm 0,5$) do que o grupo controle ($14,6 \pm 1,7$) ($P = 0,014$) (Figura 6A). Porém, quando o parâmetro exploração em frente a gaiola (tempo em segundos) foi comparado, observou-se que o grupo mais social apresentou maior tempo de permanência na área da gaiola ($428,1 \pm 8,7$) do que o grupo controle ($195,5 \pm 30,6$) ($P < 0,0001$) (Figura 6B).

No parâmetro exploração na área central (frequência) o grupo mais social mostrou

menor frequência ($14,7 \pm 2,5$) do que o grupo controle ($66,3 \pm 7,7$) ($P < 0,0001$) (Figura 6C). Quando comparado o tempo de exploração na área central, o grupo mais social gastou menos tempo ($14,9 \pm 2,4$) do que o grupo controle ($61,6 \pm 11,6$) ($P < 0,0001$) (Figura 6D).

Na avaliação do parâmetro de exploração em parede (frequência) o grupo mais social demonstrou menor frequência ($53,2 \pm 4,6$) do que o grupo controle ($117,8 \pm 8,4$) ($P < 0,0001$) (Figura 6E). Quando comparado exploração em parede (tempo em segundos), o grupo mais social utilizou menos tempo ($79,6 \pm 5,1$) do que o grupo controle ($189,7 \pm 20,9$) ($P < 0,0001$) (Figura 6F).

Na análise do parâmetro de exploração nos ângulos (frequência) o grupo mais social demonstrou menor frequência ($14,5 \pm 1,2$) do que o grupo controle ($26,7 \pm 1,8$) ($P < 0,0001$) (Figura 6G). Quando comparado o tempo de exploração em parede, o grupo mais social utilizou menos tempo ($77,3 \pm 6,3$) do que o grupo controle ($153,2 \pm 16,5$) ($P = 0,0003$) (Figura 6H).

Na avaliação total da exploração do ambiente (frequência) foi possível notar que o grupo mais social apresentou menor frequência ($93,1 \pm 8,2$) de exploração na área total do campo aberto do que o grupo controle ($225,5 \pm 17,0$) ($P < 0,0001$) (Figura 6I).

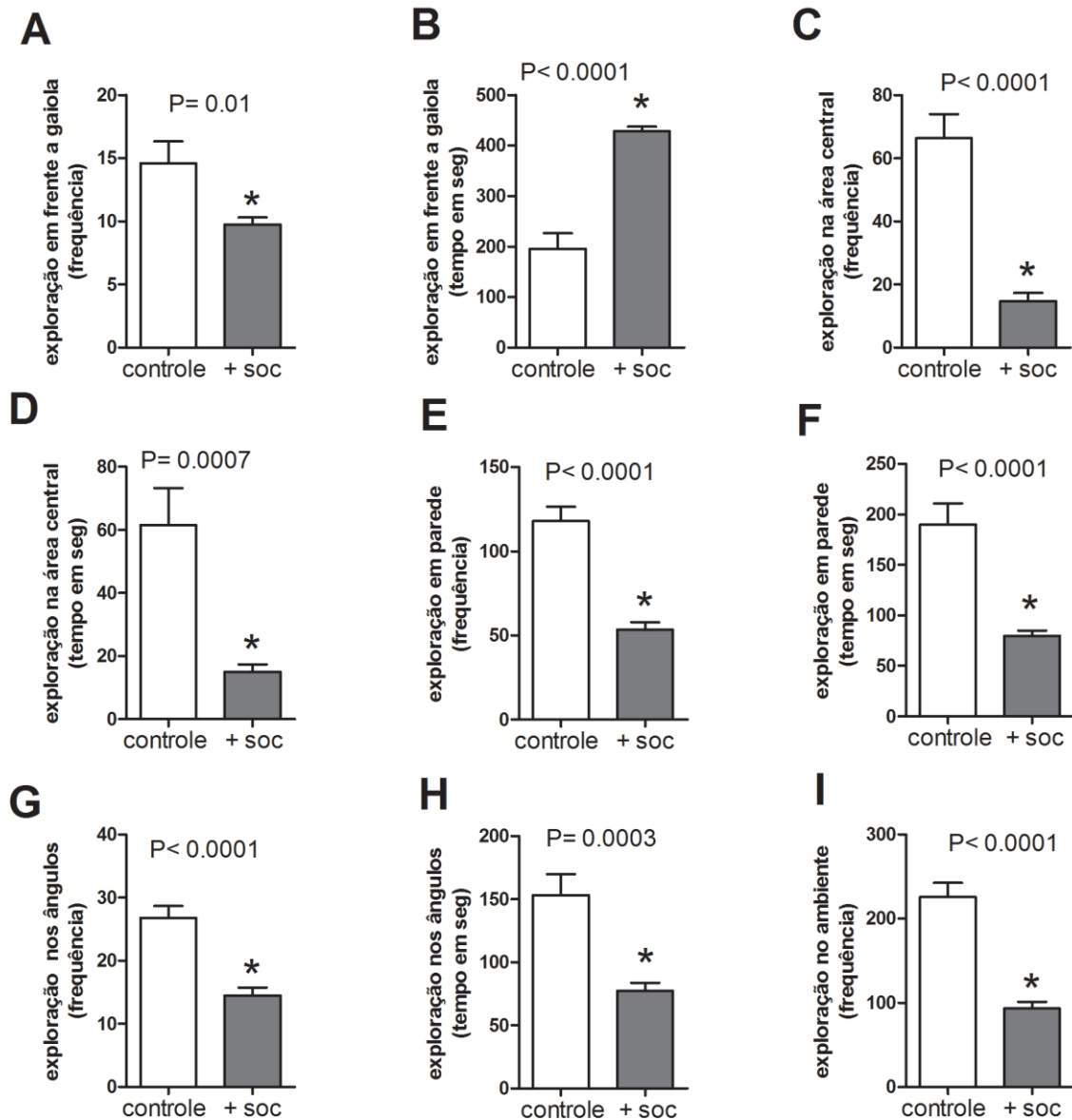


Figura 6. Análise comportamental do modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle na exploração do campo aberto. Em A, comparação na frequência de exploração em frente a gaiola mostrando que o grupo + soc apresentou menor frequência neste comportamento. Em B, comparação no tempo (segundos) de exploração em frente a gaiola mostrando que o grupo + soc apresentou maior tempo neste comportamento. Em C, comparação na frequência de exploração na área central, mostrando que o grupo + soc apresentou menor frequência neste comportamento. Em D, comparação no tempo (segundos) exploração na área central mostrando que o grupo + soc apresentou menor tempo neste comportamento. Em E, comparação na frequência de exploração em parede mostrando que o grupo + soc apresentou menor frequência neste comportamento. Em F, comparação no tempo (segundos) de exploração em parede mostrando que o grupo + soc apresentou menor tempo neste comportamento. Em G, comparação na frequência de exploração nos ângulos mostrando que o grupo + soc apresentou menor frequência neste comportamento. Em H, comparação no tempo (segundos) de exploração nos ângulos mostrando que o grupo + soc apresentou menor tempo neste comportamento. Em I, comparação na frequência de exploração no ambiente mostrando que o grupo + soc apresentou menor frequência neste comportamento. (N=12 por grupo). *Estatisticamente significativo P < 0,05.

Foram avaliados também os parâmetros levantar, farejar e limpar do animal colocado em campo aberto com gaiola acoplada contendo o co-específico. No quesito levantar (frequência), não foi observada diferença entre o grupo mais social ($33,4 \pm 2,8$) e o controle ($45,0 \pm 4,8$) ($P= 0,055$) (Figura 7A). Da mesma forma no comportamento de levantar (tempo em segundos) não houve diferença entre o grupo mais social ($47,2 \pm 6,8$) e o controle ($60,0 \pm 7,9$) ($P= 0,24$) (Figura 7B).

No parâmetro farejar (frequência) não houve diferença entre o grupo mais social ($89,7 \pm 4,6$) e o controle ($76,2 \pm 5,9$) ($P= 0,09$) (Figura 7C). Porém, no quesito farejar (tempo) o grupo mais social passou mais tempo farejando ($98,9 \pm 13,8$) e do que o grupo controle ($61,1 \pm 6,9$) ($P= 0,02$) (Figura 7D).

No parâmetro limpar (frequência), o grupo mais social apresentou menor frequência ($1,6 \pm 0,4$) nesse comportamento do que o grupo controle ($5,9 \pm 1,5$) ($P= 0,016$) (Figura 7E). No quesito limpar (tempo), o grupo mais social despendeu menos tempo ($4,7 \pm 1,5$) com auto-limpeza do que o grupo controle ($49,4 \pm 9,8$) ($P= 0,0003$) (Figura 7F).

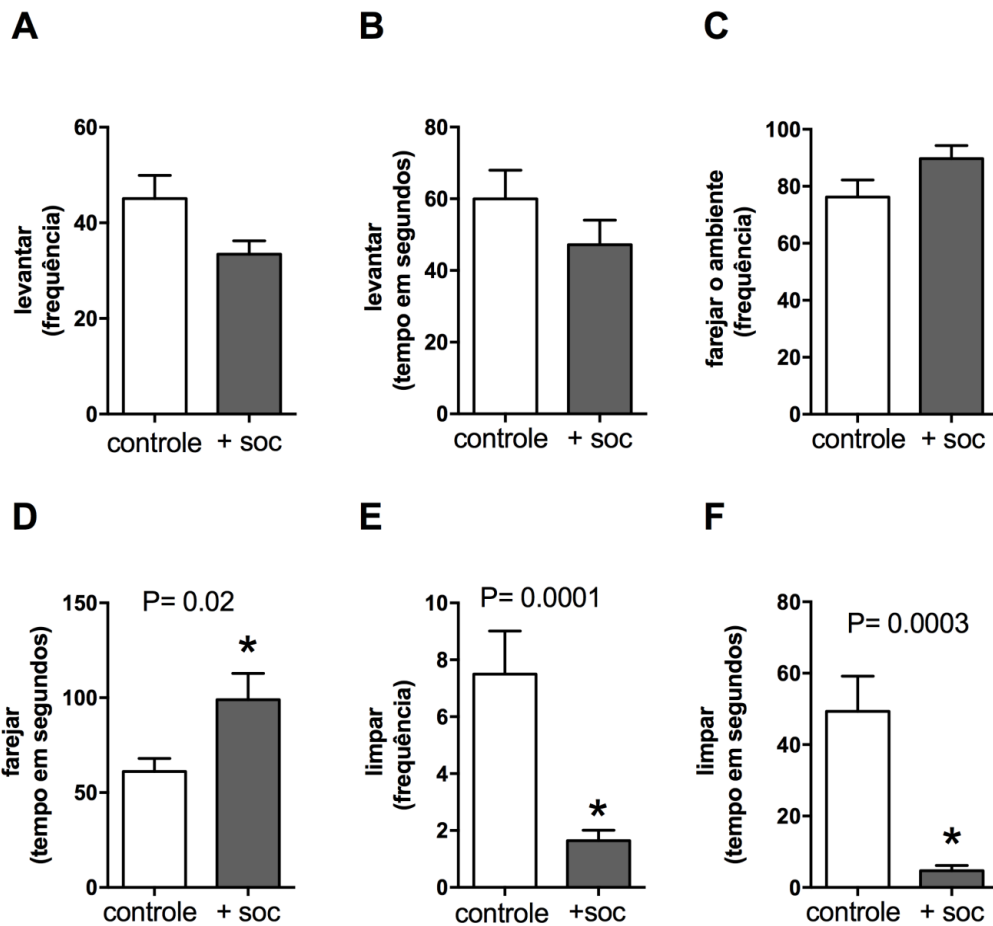


Figura 7. Análise comportamental do modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle (controle). Em A, comparação na frequência de levantar dos animais mostrando que não houve diferença entre os grupos. Em B, comparação no tempo (em segundos) do levantar mostrando que não houve diferença entre os grupos. Em C, comparação na frequência de farejar mostrando que não houve diferença entre os grupos. Em D, comparação no tempo (em segundos) de farejar mostrando que o grupo + soc apresentou maior tempo neste comportamento. Em E, comparação na frequência de limpar mostrando que o grupo + soc apresentou menor frequência neste comportamento. Em F, comparação no tempo (em segundos) de limpar mostrando que o grupo + soc apresentou menor tempo neste comportamento. (N=12 para cada grupo) * Estatisticamente significativa $P < 0,05$.

6.2. DOSAGEM DE MELATONINA

Na análise de dosagem de melatonina plasmática (pg/mL), observou-se que o grupo mais social apresentou menor concentração plasmática de melatonina noturna ($19,2 \pm 0,4$) do que o grupo controle ($23,7 \pm 2,7$) ($P = 0,04$) (Figura 8).

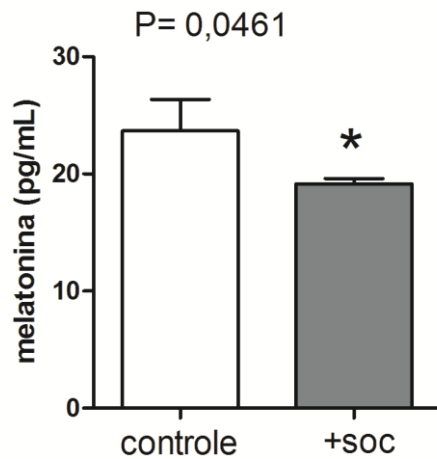


Figura 8. Dosagem noturna de melatonina plasmática nos grupos mais social (+SOC) e controle. Na dosagem de melatonina, o grupo mais social apresentou menor concentração plasmática do que o grupo controle (N=6 por grupo). *Estatisticamente significante $P < 0,05$.

6.3. EXPRESSÃO DE RNAM DOS RECEPTORES MT_1 E MT_2

Na análise da expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT_1 , no hipotálamo, o grupo mais social ($1,8 \pm 0,30$) mostrou maior expressão de RNAm de MT_1 em relação ao grupo controle ($1,01 \pm 0,08$) ($P = 0,0381$) (Figura 9A). No hipocampo o grupo mais social ($3,23 \pm 1,24$) apresentou maior expressão de RNAm de MT_1 do que o grupo controle ($1,08 \pm 0,15$) ($P = 0,0043$) (Figura 9B). No córtex pré-frontal o grupo mais social ($2,07 \pm 0,70$) apresentou maior expressão de RNAm de MT_1 do que o grupo controle ($1,30 \pm 0,41$) ($P = 0,0173$) (Figura 9C). No cerebelo o grupo mais social ($4,22 \pm 0,95$) demonstrou maior expressão de RNA mensageiro de MT_1 do que o grupo controle ($1,14 \pm 0,27$) ($P = 0,0159$) (Figura 9D).

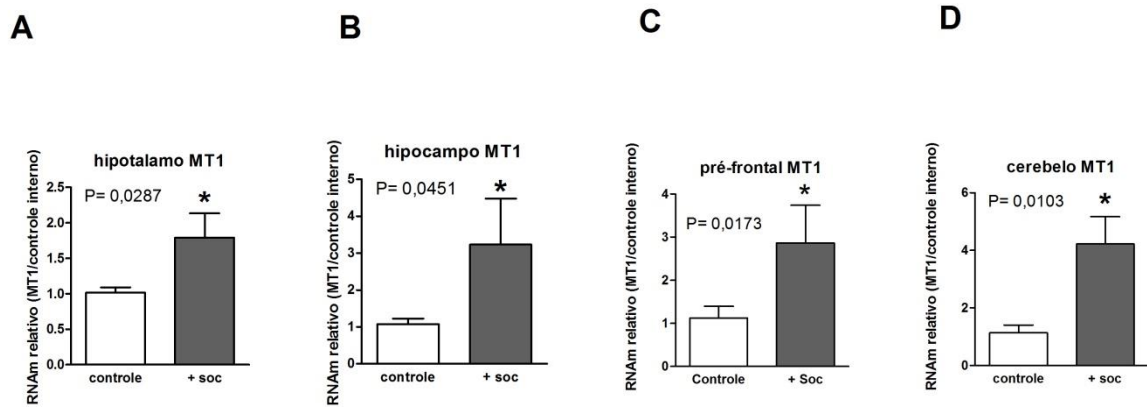


Figura 9. Expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT₁. Em A, no hipotálamo o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₁ em relação ao grupo controle. Em B, no hipocampo o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₁ do que o grupo controle. Em C, no córtex pré-frontal, o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₁ do que o grupo controle. Em D, o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₁ do que o grupo controle. (N=6, controle do hipotálamo, N=4, + soc; N=6, controle e N=5, +soc do hipocampo; N=5, controle e N=6,+soc do pré-frontal; N=5, controle e N=4, +soc do cerebelo). *Estatisticamente significativa P < 0,05.

Na análise da expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT₂ no hipotálamo, o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₂ ($2,08 \pm 0,378$) em relação ao grupo controle ($1,01 \pm 0,06$) (P= 0,0139) (Figura 10A). No hipocampo o grupo mais social apresentou maior expressão de RNAm de MT₂ ($5,73 \pm 2,51$) do que o grupo controle ($1,07 \pm 0,15$) (P= 0,0260) (Figura 10B). No córtex pré-frontal o grupo mais social não apresentou diferença na expressão de RNAm de MT₂ ($1,61 \pm 0,45$) quando comparado ao grupo controle ($1,16 \pm 0,3$) (P= 0,4264) (Figura 10C). No cerebelo o grupo mais social demonstrou maior expressão de RNA mensageiro de MT₂ ($4,46 \pm 1,39$) do que o grupo controle ($1,14 \pm 0,27$) (P= 0,0159) (Figura 10D).

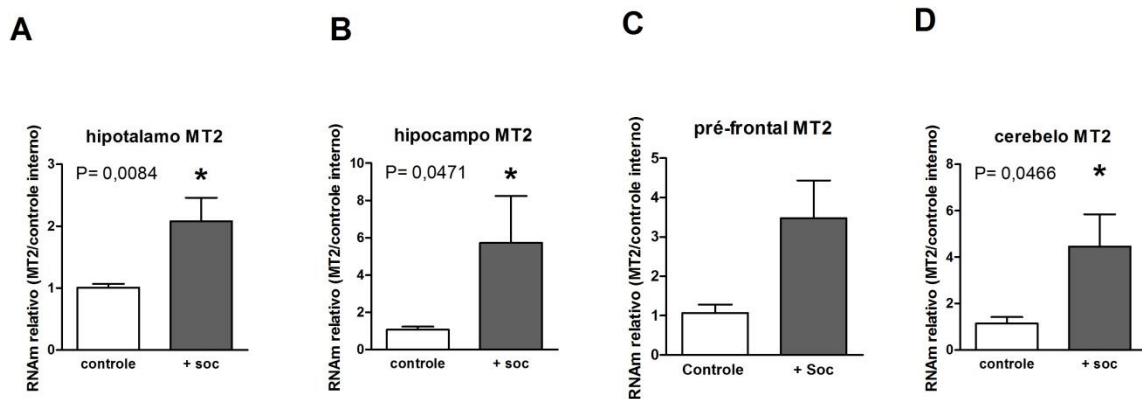


Figura 10. Expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT₂. Em A, no hipotálamo o grupo mais social apresentou maior expressão de RNAm de MT₂ em relação ao grupo controle. Em B, no hipocampo o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₂ do que o grupo controle. Em C, no córtex pré-frontal não houve diferença entre os grupos na expressão de RNAm de MT₂. Em D, o grupo mais social mostrou maior expressão de RNAm de MT₂ do que o grupo controle. (N=6, controle do hipotálamo, N=4, + soc do hipotálamo; N=6 em ambos os grupos do hipocampo; N=5, controle pré-frontal, N=6, + soc do córtex pré-frontal; N=5 em ambos os grupos do cerebelo). *Estatisticamente significante P < 0,05.

6.4. QUANTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS AO MT₁ E MT₂

No córtex pré-frontal (CPF) o grupo mais social apresentou maior número de células MT₁-ir ($949,5 \pm 157,4$) do que o grupo controle ($525 \pm 69,8$) (P=0,0411) (Figura 11). Na análise quantitativa de células imunorreativas para MT₂ (MT₂-ir), não houve diferença entre os grupos mais social ($788,7 \pm 97,9$) e controle ($683,3 \pm 89,8$) (P= 0,3095) (Figura 11).

No córtex do cíngulo (CgL) não houve diferença entre o grupo mais social ($56,8 \pm 3,7$) e o controle ($47,0 \pm 5,7$) (P= 0,1432) no número de células MT₁-ir (Figura 12A), assim como no número de células MT₂-ir entre o grupo mais social ($62,4 \pm 6,3$) e o controle ($46,6 \pm 5,3$) (P= 0,1199) (Figura 13A).

No córtex pré-límbico (PrL) foi encontrado maior número de células MT₁-ir no grupo mais social ($165,4 \pm 14,8$) do que o grupo controle ($92,3 \pm 11,5$) (P= 0,0135) (Figura 12B). Nesta mesma área, não houve diferença no número de células MT₂-ir entre o grupo mais social ($178,4 \pm 31,4$) e o controle ($120,8 \pm 16,6$) (P= 0,3290) (Figura 13B).

No córtex orbital medial (MO), o grupo mais social apresentou maior número de células MT₁-ir ($197,4 \pm 28,5$) do que no controle ($96,3 \pm 6,6$) ($P= 0,0173$) (Figura 12C). Não houve diferença no número de células MT₂-ir entre o grupo mais social ($155,5 \pm 29,1$) e o controle ($119,3 \pm 8,6$) ($P= 0,4545$) (Figura 13C).

No córtex ventro orbital (VO), o grupo mais social apresentou maior número de células MT₁-ir ($209,0 \pm 27,0$) do que o grupo controle ($100,2 \pm 8,9$) ($P= 0,0043$) (Figura 12D). Nesta mesma área não houve diferença no número de células MT₂-ir entre o grupo mais social ($153,8 \pm 18,8$) e o controle ($123,5 \pm 8,7$) ($P= 0,4286$) (Figura 13D).

No córtex orbital lateral (LO) o grupo mais social apresentou maior número de células MT₁-ir ($276,6 \pm 17,5$) do que o grupo controle ($122,3 \pm 13,2$) ($P= 0,0043$) (Figura 12E). Já o receptor MT₂, não mostrou diferença de expressão entre o grupo mais social ($174,6 \pm 30,8$) e o controle ($156,2 \pm 23,3$) ($P=0,7922$) nesta área (Figura 13E).

Na análise quantitativa de células imunorreativas para MT₁ (MT₁-ir) não houve diferença entre o número de células no córtex orbital dorsolateral (DLO) no grupo mais social (+ soc) ($139,4 \pm 42,0$) quando comparado ao controle ($77,3 \pm 14,6$) ($P=0,2002$) (Figura 12F). Na análise quantitativa de células imunorreativas para MT₂ (MT₂-ir), não houve diferença entre os grupos mais social ($124,4 \pm 27,9$) e controle ($106,5 \pm 12,4$) ($P= 0,9307$) no DLO (Figura 13F).

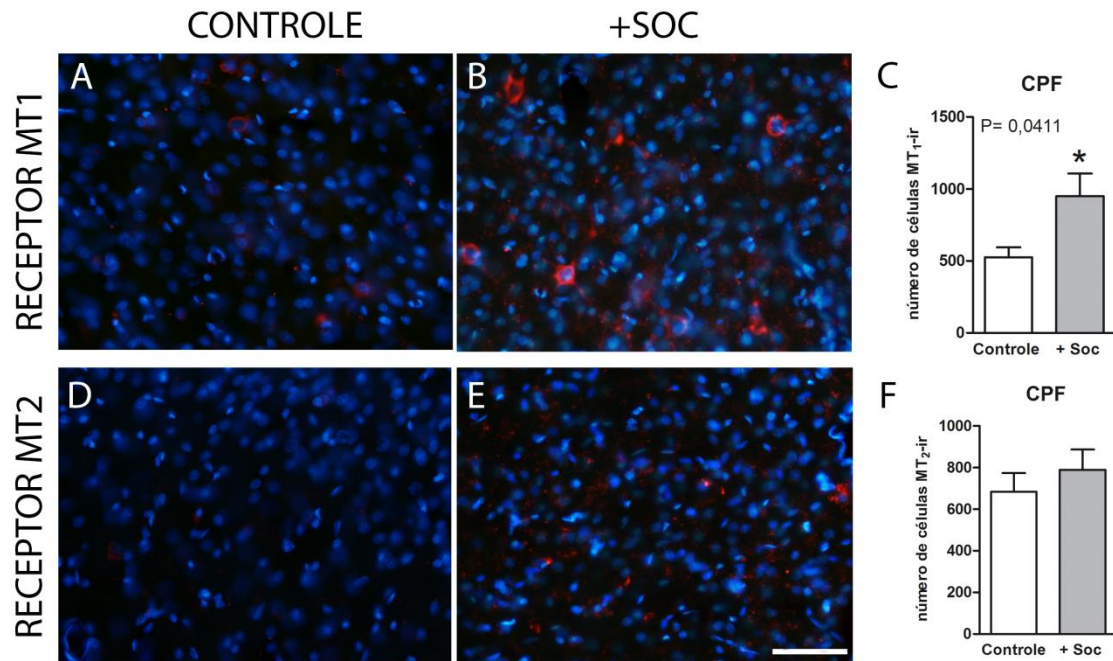


Figura 11. Análise quantitativa do número de células imunorreativas para MT₁ (MT₁-ir) e MT₂ (MT₂-ir) no modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle, no CPF. Em A, imagem representativa de células MT₁-ir na área CPF no grupo controle. Em B, imagem representativa de células MT₁-ir na área CPF no grupo +Soc. Em C, no CPF, comparação do número de células MT₁-ir, com maior quantidade de células no grupo + soc. Em D, imagem representativa de células MT₂-ir na área CPF no grupo controle. Em E, imagem representativa de células MT₂-ir na área CPF no grupo +Soc. Em F, comparação do número de células MT₂-ir no CPF, sem diferença entre os grupos. (N=6 por grupo). * Estatisticamente significante $P < 0,05$. CPF: córtex pré-frontal. *Estatisticamente significante $P < 0,05$.

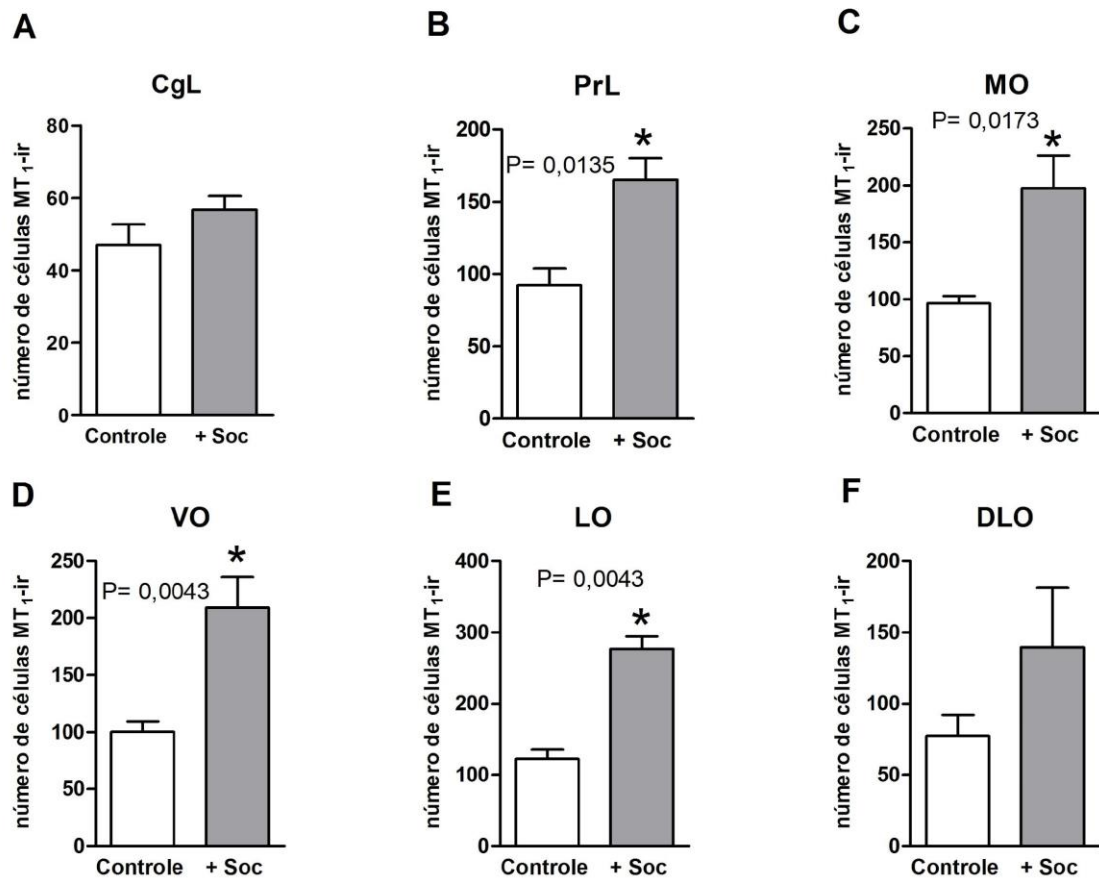


Figura 12. Análise quantitativa do número de células imunorreativas para MT₁ (MT₁-ir) no modelo mais social (+ soc) em comparação ao grupo controle. Em A, comparação do número de células MT₁-ir na área CgL sem diferença entre os grupos. Em B, na região PrL, o grupo + soc apresentou maior quantidade de células MT₁-ir. Em C, na área MO, houve maior quantidade de células MT₁-ir no grupo + soc. Em D, na área VO, comparação do número de células MT₁-ir com maior quantidade de células no grupo + soc. Em E, na área VO, o grupo + soc apresentou maior quantidade de células MT₁-ir. Em F, comparação do número de células MT₁-ir na área DLO sem diferença entre os grupos. (N=6 por grupo). * Estatisticamente significativa P < 0,05. CgL: córtex do cíngulo, PrL: córtex pré-límbico, MO: córtex orbital medial, VO: córtex ventro orbital, LO: córtex orbital lateral, DLO: córtex orbital dorsolateral. *Estatisticamente significativa P < 0,05.

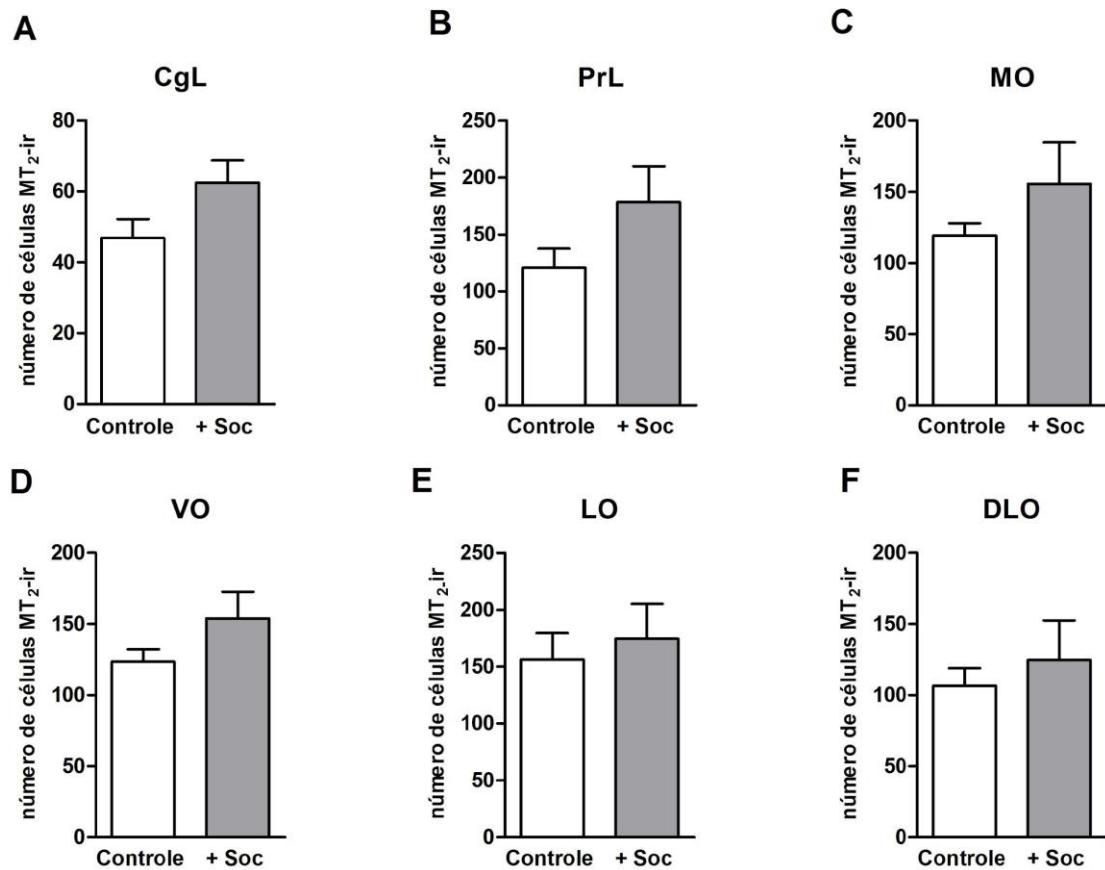


Figura 13. Análise quantitativa do número de células imunorreativas para MT₂ (MT₂-ir) no modelo mais social (+ Soc) em comparação ao grupo controle. Em A, comparação do número de células MT₂-ir na área CgL sem diferença entre os grupos. Em B, na região PrL, não houve significância estatística entre os grupos do número de células MT₂-ir. Em C, na área MO, comparação do número de células MT₂-ir, sem diferença entre os grupos. Em D, na área VO, comparação do número de células MT₂-ir, sem diferença entre os grupos. Em E, na área VO, não houve significância estatística entre os grupos. Em F, comparação do número de células MT₂-ir na área DLO sem diferença entre os grupos. (N=6 por grupo). * Estatisticamente significativo P < 0,05. CgL: córtex do cíngulo, PrL: córtex pré-límbico, MO: córtex orbital medial, VO: córtex ventro orbital, LO: córtex orbital lateral, DLO: córtex orbital dorsolateral. *Estatisticamente significativo P < 0,05.

7. DISCUSSÃO

O comportamento social é um comportamento básico mediado por áreas encefálicas que compreendem o “cérebro social”, dentre elas estão áreas do córtex pré-frontal cujos circuitos neuronais são cruciais para a sobrevivência de humanos e de animais. Algumas desordens neuropsiquiátricas apresentam graves alterações no comportamento social como o TEA, o qual é caracterizado por uma hipossociabilidade e a Síndrome de Williams (SW) na qual os sujeitos exibem hipersociabilidade.

Devido a gravidade dos casos, são necessários investigações que contribuam para o entendimento das bases envolvidas nas anormalidades no comportamento social. Este estudo buscou verificar se haveriam diferenças no conteúdo de melatonina, na expressão e na imunorreatividade dos receptores (MT₁ e MT₂) em um modelo animal com maior interação social.

Para isso, inicialmente foram realizados testes comportamentais onde foram analisados os parâmetros de exploração (entradas) do animal no campo aberto e área da gaiola, e os parâmetros de levantar, farejar e limpar, sendo avaliado a frequência que o animal executava e o tempo gasto nesses comportamentos. O teste do campo aberto acoplado à gaiola contendo o co-específico, visa analisar o comportamento do rato exposto a situação social, ou seja, avalia o comportamento do rato inserido no campo aberto, permitindo investigar comportamentos relacionados à sociabilidade, tomando como base o tempo gasto nas diferentes áreas do aparato (BONUTI, 2014).

O comportamento de exploração (entradas), foi avaliado em diferentes áreas do campo aberto acoplado à gaiola do co-específico. Na frequência de exploração no espaço defronte a gaiola, o grupo mais social apresentou menor frequência por ter gasto mais tempo interagindo com o co-específico na área em frente a gaiola do que o controle. A permanência por mais tempo nesta área do campo, demonstra a motivação dos animais em manter/realizar interação com o co-específico (BONUTI, 2014).

Consequentemente, tanto na área central, área de parede e área de ângulos (cantos), o grupo mais social apresentou menor frequência desempenhada no comportamento de exploração, como também o tempo gasto nessas áreas foi inferior ao do grupo controle (BONUTI, 2014). O grupo mais social passou mais tempo farejando o ambiente total, do que os animais controle. O comportamento de farejar no espaço defronte à gaiola neste teste, pode relacionar-se ao interesse pela interação com o co-específico da gaiola; e em outras áreas do campo, indica apenas exploração do ambiente (BONUTI, MORATO, 2017).

Em contrapartida, o modelo mais social apresentou menor frequência e menor tempo de auto-limpeza do que o grupo controle. De acordo com a literatura, o comportamento de limpar-se dos ratos pode estar associado às situações de excitação, conflito, e estresse causados por situações de novidade (BONUTI, MORATO, 2017). No labirinto em cruz elevado, a auto-limpeza representa a ansiedade expressa pelos animais (MÜNCHEN, 2013).

Estudos anteriores mostraram que modelos animais de SW, exibem aumento na interação social, com agressividade reduzida o que apresenta correlação com a alta sociabilidade, a falta de ansiedade social e a desinibição vista na SW. Quanto as causas do comportamento hiperssocial, não se sabe como a desregulação da transcrição resultante da deleção do gene GTF2I leva ao fenótipo hiperssocial na SW, mas é possível que tal deleção leve a prejuízos no desenvolvimento de circuitos neurais essenciais para o comportamento social (OSBORNE, 2010).

Ainda deve-se ressaltar a relação entre a habilidade de comunicação e a interação social. Em crianças com desenvolvimento típico, o aumento na habilidade de comunicação verbal com outros resulta em um comportamento social mais complexo, incluindo interações com outras crianças (BLACK, FREEMAN, MONTGOMERY, 1975).

Existem teorias que englobam aspectos fisiológicos, funcionais e sistêmicos no campo do comportamento social. Dentre as variações neurofuncionais estariam disfunções corticais resultantes de problemas no desenvolvimento. Nos primeiros estágios de desenvolvimento, genes determinam e regulam a formação do cérebro: suas células, sinapses e circuitos neurais (YIRMIYA; CHARMAN, 2010).

Depois de confirmada a característica mais social do grupo +SOC, foi realizada a dosagem plasmática noturna de melatonina, na qual o grupo mais social apresentou menor concentração quando comparado ao controle, indicando alterações na via de síntese da melatonina e, conseqüentemente, na regulação dos ritmos circadianos desse modelo animal. Devido à diminuída quantidade de melatonina, esses animais podem apresentar envelhecimento precoce pela falta da ação antioxidante, podem ter maior probabilidade de desenvolver câncer, e de apresentar imunidade baixa e problemas metabólicos (REITER, TAN, GALANO, 2014).

Ainda considerando a queda na concentração plasmática de melatonina e os dados da literatura que correlacionam a expressão gênica dos receptores de melatonina com quadros de alteração sócio-comportamental, foi realizada, no presente estudo, a análise da expressão do RNAm dos receptores de melatonina (MT₁ e MT₂) em diferentes áreas encefálicas.

Os resultados mostraram que o hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e cerebelo do grupo +soc apresentaram maior expressão gênica para MT₁, porém, para MT₂ houve maior expressão gênica apenas no hipotálamo, hipocampo, e cerebelo. Já o córtex pré-frontal apesar de não mostrar significância estatística nos resultados da expressão do RNAm para MT₂, apresentou uma tendência de aumento na expressão para esse receptor no grupo +soc. Embora não seja possível comparar tais achados a outros estudos, por ser este o primeiro estudo a avaliar possíveis alterações na expressão gênica destes receptores nesse modelo animal, os resultados do presente estudo mostram a presença de ambos receptores nessas áreas encefálicas, corroborando dados da literatura, que mostraram expressão de RNAm do MT₁ e MT₂ no hipotálamo de ratos e em humanos (WEAVER et al., 1993; SALLINEN et al., 2005), no hipocampo de humanos (REPPERT et al., 1995; SAVASKAN et al., 2005), no cerebelo de peixes e em humanos (AL-GHOUL et al., 1998; HERRERA-PÉREZ et al., 2010), e no córtex pré-frontal em humanos (UZ et al., 2005).

Os receptores de melatonina no córtex cerebral também podem estar envolvidos com a função cognitiva (O'NEAL-MOFFITT et al. 2014); com o retardamento da degradação de neurônios; diminuição da proteína beta-amilóide no córtex frontal e hipocampo no Alzheimer; na neurogênese no hipocampo com consequente modulação da memória (NG et al., 2017).

No hipotálamo, os receptores de melatonina estão associados a regulação dos ritmos circadianos incluindo modulação de temperatura e o ciclo vigília/sono por meio do núcleo supra-quiasmático (NSQ) onde o receptor MT₁ está relacionado à redução do sono REM, e o MT₂ induz o início do sono (OCHOA-SANCHEZ et al., 2011; COMAI e GOBBI, 2014). Ambos parecem estar associados aos distúrbios de sono encontrado na fisiopatologia da doença de Parkinson (NG et al., 2017).

No hipocampo, as funções dos receptores de melatonina ainda não foram totalmente esclarecidas, no entanto, estudos apontam que ambos os receptores e a administração crônica de melatonina propicia a modulação da neurogênese nessa área cortical (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2009; LIU et al., 2013; WONGCHITRAT et al., 2016). Os receptores também podem estar envolvidos no processo de aprendizagem e formação de memória (NG et al., 2017). Em pacientes com Alzheimer por exemplo, o receptor MT₂ mostrou-se diminuído e o MT₁ aumentado, mas esses dados não são claros sobre a relação com a causa dessa doença (SAVASKAN et al., 2005).

A função dos receptores de melatonina no cerebelo ainda não são claras, no entanto,

nessa região a melatonina participa da regulação de enzimas antioxidantes, modulação na adaptação sensorial do cerebelo e neuroproteção (PINATO et al., 2015; NG et al., 2017). Durante a neuroinflamação induzida em ratos, o cerebelo foi capaz de produzir melatonina, propiciando maior neuroproteção para essa área (PINATO et al., 2015).

O aumento na expressão gênica dos receptores de melatonina no modelo + soc nas áreas analisadas pode estar relacionado com o quadro de maior sociabilidade (WEIL et al., 2006; COMAI et al., 2015; LIU et al., 2017) e ainda pode estar relacionado com um efeito compensatório pelo déficit no conteúdo plasmático de melatonina (PINATO et al., 2017).

A investigação sobre a expressão por imuno-histoquímica destes receptores permite o estudo do padrão de distribuição dos receptores *in situ* em cada área encefálica. Esta distribuição foi avaliada no córtex pré-frontal e suas divisões. Os resultados mostraram que o grupo + soc apresentou maior número de células MT₁-ir em quase todas as áreas (LO, MO, VO, PrL e CPF total), exceto nas áreas DLO e CgL, onde não houve diferença entre os grupos. Porém, na análise para o receptor MT₂, observou-se que não houve diferença para nenhuma das áreas entre os grupos.

Essa diferença de expressão dos receptores MT₁ e MT₂ nas mesmas áreas, pode indicar diferenças nas funções desempenhada por cada um. Embora não seja possível comparar tais achados a outros estudos por ser este o primeiro estudo a avaliar possíveis alterações na marcação imuno-histoquímica destes receptores nesse modelo animal, os resultados do presente estudo mostraram a distribuição destes receptores no córtex pré-frontal, estando de acordo com os dados da literatura, onde foi detectada a presença dos receptores MT₁ e MT₂ no córtex pré-frontal de ratos com maior número de receptores MT₁ do que MT₂ (LACOSTE et al., 2015; NG et al., 2017), e em humanos onde também foi detectada a presença do receptor MT₁ no córtex pré-frontal (UZ et al., 2005).

De maneira geral, o receptor de melatonina MT₁ está envolvido com a modulação da fase REM do sono (CLEMENT et al., 2012; COMAI, OCHOA-SANCHEZ, GOBBI, 2013). Em camundongos com deleção para o receptor MT₁, notou-se a presença de comportamento depressivo-melancólico (COMAI, OCHOA-SANCHEZ, DOMINGUEZ-LOPEZ, 2015). A ativação do receptor MT₁, por meio da administração de melatonina ou agonistas dessa molécula, aparenta atenuar sinais e variações neuroquímicas presentes nos quadros de depressão (LIU et al., 2016). Em camundongos modelo doença de Huntington (doença degenerativa das células nervosas), foi observado que por meio do receptor MT₁, a melatonina

é capaz de inibir as vias de apoptose celular mitocondriais (WANG et al., 2011).

Em relação ao receptor MT₂, alguns estudos demonstram que a melatonina apresenta características analgésicas, relacionadas com a função do receptor MT₂. Uma pesquisa em ratos mostrou que os agonistas seletivos parciais de MT₂ manifestam atributos analgésicos, devido à presença destes receptores em neurônios glutamatérgicos localizados na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral; sendo assim, capazes de regular as vias descendentes antinociceptivas do tronco encefálico (LOPEZ-CANUL et al., 2015). Além disso, o receptor MT₂ vem sendo atribuído a função ansiolítica da melatonina, e à modulação do sono, principalmente o NREM (EMET et al., 2016). Ligantes seletivos de MT₂ apresentam maior capacidade hipnótica do que os fármacos não seletivos para MT₁ e MT₂ (COMAI e GOBBI, 2014). Este receptor é capaz de inibir as funcionalidades no hipocampo relacionadas ao receptor GABA-A (DUBOCOVICH et al., 2003).

Embora o substrato neurofisiológico para as anormalidades comportamentais sociais sejam desconhecidas, estudos em humanos e em modelos animais especulam teorias como o desequilíbrio na excitação e inibição da atividade neuronal que poderiam resultar em hiper ou hipoativação de regiões cerebrais específicas levando à disfunção (PEÇA et al., 2011).

Disfunções no lobo frontal como as regiões que tem função na regulação e supressão de ações que são socialmente inapropriadas estão provavelmente relacionadas ao padrão de hiperssociabilidade na SW; isso de daria principalmente pela falta de inibição destas ações (MEYER-LINDENBERG et al., 2005; MOBBS et al., 2007; PORTER; COLTHEART; LANGDON, 2007; LITTLE et al., 2013).

Na área pré-límbica (PrL), no presente estudo, foi observado maior número de receptores MT₁ no grupo mais social do que no grupo controle. Estudos dos últimos anos demonstraram que a subdivisão do córtex pré-frontal, a área pré-límbica, é capaz de modular neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da Rafe (envolvido com a regulação da ansiedade), dessa forma, encontra-se implicada na modulação de comportamentos parecidos com a ansiedade em ratos (YAMASHITA et al., 2018). Além disso, em ratos, receptores de serotonina 5-HT₆ encontrados na PrL estão relacionados com a regulação de comportamentos semelhantes com a ansiedade (ZHANG, 2018). Uma pesquisa mostrou, por meio de ratos, que a atividade (circuito) entre neurônios laterais da amígdala e neurônios da PrL, está relacionada com o medo em geral; onde a amígdala é responsável por evidenciar ameaças existentes, e a comunicação entre amígdala e PrL propicia a agilidade de ação/resposta de defesa (KIM et al., 2018).

Na área córtex orbital medial, foi observada maior quantidade de células MT₁-ir no grupo mais social do que no controle. A sub-região córtex orbital medial (MO) em ratos, por sua vez, apresenta mais projeções para áreas límbicas, esse fato pode indicar que essa região esteja empregada em funções como o comportamento direcionado por objetivos e tomada de decisões.

Na sub-região córtex ventro orbital, também foi encontrada maior número de células imunorreativas para MT₁ no grupo mais social. O córtex ventro orbital (VO), também envia projeções para áreas corticais e subcorticais límbicas, apontando sua atuação em aspectos cognitivos e emocionais (HOOVER, VERTES, 2011).

Nesse estudo, na área orbital lateral (LO), foi evidenciada a maior quantidade de células MT₁-ir no grupo mais social do que no controle. Estudos com eletrofisiologia demonstraram que neurônios da subdivisão LO estão relacionados à características temporais de recompensa (ROESCH; TAYLOR; SCHOENBAUM, 2006), e à funções espaciais de recompensa (FEIERSTEIN et al., 2006).

Considerando-se os dados obtidos nessa pesquisa, conclui-se que o receptor MT₁ está presente em grande parte do córtex pré-frontal, aparentemente participando da modulação do comportamento social já que as subdivisões do córtex pré-frontal desempenham diferentes funções que se complementam, propiciando a manifestação do comportamento social dos indivíduos. O receptor MT₂ também foi encontrado nessas áreas do córtex pré-frontal, apesar de não ter demonstrado significância estatística entre os grupos. Ambos receptores, podem estar assim envolvidos na modulação da interação social, no modelo animal mais social.

8. CONCLUSÃO

Os animais da linhagem mais social apresentaram maior interação social com o co-específico do que o grupo controle, menor conteúdo de melatonina, maior expressão gênica dos receptores de melatonina MT₁ no hipocampo, hipotálamo, córtex pré-frontal e cerebelo, e do MT₂ no hipocampo, hipotálamo e cerebelo. Além disso a linhagem mais social apresentou maior número de células imunorreativas ao receptor de melatonina MT₁ nas subdivisões PrL, MO, VO e LO do córtex pré-frontal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMASZEK, M. et al. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. **The Cerebellum**, v.16, n. 2, p. 552-576, 2016.
- ADOLPHS, R. Social cognition and the human brain. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 3, p. 469-479, 1999.
- ÁLAMO, C; LÓPEZ-MUÑOZ, F. Depresión y ritmos circadianos: relación farmacológica. El papel de la agomelatina. **Revista de psiquiatría y salud mental**, p. 2–11, 2010.
- ALCALÁ-LÓPEZ, D. et al. Computing the Social Brain Connectome Across Systems and States. **Cerebral Cortex**, p. 1-26, 2017.
- AL-GHOUL, W. M. et al. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. **NeuroReport**. v.9, n. 18, p. 4063-4068, 1998.
- AMBRIZ-TUTUTI, M. et al. Melatonin: a hormone that modulates pain. **Life Sci.**, v.84, p. 489–498, 2009.
- ASGHARI, M. H. et al. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. **Expert Opin Drug MetabToxicol.**, v.13, n. 5, p. 545-54, 2016.
- BAILEY, M; SILVER, R. Sex differences in circadian timing systems: Implications for disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 111-139, 2014.
- BARAK, B; FENG, G. Neurobiology of social behavior abnormalities in autism and Williams syndrome. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 5, p.647-655, 2016.
- BARDEN, N. et al. Antidepressant action of S 20098 (agomelatine) in a transgenic mouse model. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 5, n. 1, p. 64, 2002.
- BASSANI, T.B. et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Res.**, v.17, n.1593, p. 95-105, 2014.
- BASSARATH, L. - Neuroimaging studies of antisocial behaviour. **Can J Psychiatry**, v.46, n 8, p. 728-32, 2001.
- BECHARA, A; DAMASIO, H; DAMASIO, A. R. Emotion, Decision Making and the Orbitofrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, v.10, n. 3, p. 295-307, 2000.
- BLACK, M; FREEMAN, B. J.; MONTGOMERY, J. Systematic observation of play behavior in autistic children. **Journal of Autism And Childhood Schizophrenia**, v. 5, n. 4, p.363-371, 1975.
- BOGOLEPOVA, A. N. et al. Experience in the use of valdoxan in the treatment of post-stroke depression. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 42, n. 6, p. 556-560, 2012.

BONUTI, R. C; MORATO, S. Proximity as a predictor of social behavior in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 293, p. 37–44, 2017.

BONUTI, R. C. Um estudo do comportamento social de duplas de ratos (*Rattus norvegicus*). 128 p. Dissertação – Ribeirão Preto, 2014.

BOTHOREL, et al. Like Melatonin, agomelatine (S20098) increases the amplitude of oscillations of two clock outputs: melatonin and temperature rhythms. *Chronobiology International: The Journal of Biological and Medical Rhythm Research*. v. 31, i. 3, 2014.

BOULOS, L; DARCO, E; KIEFFER, B. L. Translating the Habenula - From Rodents to Humans. **Biological Psychiatry**, v.81, p. 296–305, 2017.

BRUIJNZEEL, D. et al. Antipsychotic treatment of schizophrenia: An update. **Asian Journal of Psychiatry**, v.11, p. 3–7, 2014.

BUGALHO, P; CARMO, I; VIANA-BAPTISTA, M. Acidente Vascular do Cerebelo: o compromisso das funções mentais superiores pode ser determinante de mau prognóstico. **Sinapse (abst.)**; v.4, i. 88, 2004.

BUGALHO, P; CORREA, B; BAPTISTA, M.V. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais bases científicas e modelos de estudo. **ActaMed**. n.19, p. 257-268, 2006.

CAGNIN, S. Algumas contribuições das neurociências para o estudo da relação entre o afeto e a cognição. **Estudos e pesquisas em psicologia**, v.8, n. 2, p. 473-504, 2008.

CAMPOS, L. M. G; CRUZ-RIZZOLO R. J; PINATO, L. The primate seahorse rhythm. **Brain Research**, v.1613, p. 81 - 91, 2015.

CARMO-SILVA, S; CAVADAS, C. Hypothalamic Dysfunction in Obesity and Metabolic Disorders. **Advances In Neurobiology**, p.73-116, 2017.

CARVALHO, M. S. et al. Metabolismo do triptofano em transtornos mentais: um enfoque na esquizofrenia. **Vitalle - Revista de Ciências da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 44-56, 2017.

CLAUSTRAT, B. et al. A chronobiological study of melatonin and cortisol secretion in depressed subjects: Plasma melatonin a biological marker in major depression. **Biol Psychiatry**. 19:1215-28, 1984.

CLARKE, I. J. Hypothalamus as an Endocrine Organ. **Comprehensive Physiology**, p. 217-253, 2014.

CLEMENT, O. et al. The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. **J Neurosci**; v.32, p. 16763–16774, 2012.

COMAI, S., GOBBI, G. CCNP award paper: unveiling the role of melatonin MT(2) receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. **J Psychiatry Neurosci**, v.39, n. 1, p. 6–21, 2014.

COMAI, S; OCHOA-SANCHEZ, R, G. Sleep-wake characterization of double MT(1)/MT(2) receptor knockout mice and comparison with MT(1) and MT(2) receptor knockout mice. **Behav Brain Res.**, v.243, p. 231–238, 2013.

COMAI, S. et al. Melancholic-Like Behaviors and Circadian Neurobiological Abnormalities in Melatonin MT1 Receptor Knockout Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.18, n. 3, p. 1–10, 2015.

DAVIDSON, R. J. et al. Neural and behavioral substrates of mood and mood regulation. **Biol. Psychiatry**, v.52, p. 478-502, 2002.

DE MOURA, P. R; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

DOMINGUEZ-LOPEZ, S; HOWELL, R; GOBBI, G. Characterization of serotonin neurotransmission in knockout mice: implications for major depression. **Rev. Neurosci.**, v.23, p. 429–443, 2012.

DONALDSON, Z. R; YOUNG, L. J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. **Science.**, v. 322, n. 5903, p. 900-904, 2008.

DUBOCOVICH, M, L; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.

DUBOCOVICH, M.L. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Front Biosci.**, n. 8, p. 1093-1108, 2003.

EMET, M. et al. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. **The Eurasian Journal Of Medicine**, v. 48, n. 2, p.135-141, 2016.

ESPERIDIÃO-ANTÔNIO, V. et al. Neurobiologia das emoções. **Rev. Psiq. Clín.**, v.35, n.2, p. 55-65, 2008.

EKTHUWAPRANEE, K; SOTTHIBUNDHU, A; GOVITRAPONG, P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of proliferation of adult rat hippocampal progenitor cells in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 58, p. 418–428, 2015.

FERREIRA, A. F. B. **Neuroplasticidade induzida pelo exercício: efeitos sobre o hipocampo e regiões motoras do encéfalo de ratos**. 44f. Tese (Doutorado Fisiologia Humana do Instituto de Ciencias Biomédicas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FERREIRA, R. F. D. **Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados - implicações no comportamento alimentar e peso corporal**. 2015. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

FLECK, M. P. et al. Revisão das diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (Versão integral). **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, p. 7-17, 2009.

FUSTER, J. Prefrontal neurons in networks of executive memory. **Brain Research Bulletin**, v.52, n.5, p. 331-336, 2000.

FUSTER, J. The Prefrontal Cortex - an update: Time is of the essence. **Neuron.**, v.30, p. 319-333, 2001.

FUSTER, J.M. Frontal lobe and cognitive development. **J. Neurocytol.**, v.31, p. 373–385, 2002.

GHASHGHAIE, H. T; BARBAS, H. Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. **Neuroscience**, v.115, n. 4, p. 1261-1279, 2002.

GHIKA, J. Paleoneurology: Neurodegenerative diseases are age-related diseases of specific brain regions recently developed by homo sapiens. **Medical Hypotheses**, v. 71, n. 5, p.788-801, 2008.

GOES, T. C. et al. Comportamento de ratos Wistar no Paradigma da Exploração Livre. **Scientia Plena**, v. 9, n. 12, p. 1-7, 2013.

GOLDMAN, B. D. The circadian timing system and reproduction in mammals. **Steroids**, v.64, n. 9, p.679-685, 1999.

GUESDON, V. et al. Rapid effects of melatonin on hormonal and behavioral stressful responses in ewes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 8, p.1426-1434, 2013.

GUISSONI CAMPOS, Leila M. et al. Circadian Clock Proteins and Melatonin Receptors in Neurons and Glia of the *Sapajus apella* Cerebellum. **Frontiers In Physiology**, v. 9, p.1-10, 2018.

GUNAYDIN, L. A; DEISSEROTH, K. Dopaminergic Dynamics Contributing to Social Behavior. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, v. 79, p. 221-227, 2014.

HAAS, B. W. et al. Preliminary evidence of abnormal white matter related to the fusiform gyrus in Williams syndrome: a diffusion tensor imaging tractography study. **Genes, Brain And Behavior**, v. 11, n. 1, p.62-68, 2012.

HAHM, E.T; et al. GABAergic synaptic response and its opioidergic modulation in periaqueductal gray neurons of rats with neuropathic pain. **BMC Neurosci.**, p. 12-41, 2011.

HARDELAND, R. Melatonin: Signaling mechanisms of a pleiotropic agent. **Biofactors**, v.35, n. 2, p.183-192, 2009.

HARDELAND, R. Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. **Aging Dis.**, v.3, n.2, p. 194-225, 2012.

HERRERA-PÉREZ, Patricia et al. Melatonin receptors in the brain of the European sea bass: An in situ hybridization and autoradiographic study. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 518, n. 17, p.3495-3511, 2010.

HOLANDA, V. N. et al. As bases biológicas do medo: Uma revisão sistemática da literatura. **Rev. Interfaces**, v. 1, n.3, 2013.

HOOVER, W. B.; VERTES, R P. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 519, n. 18, p.3766-3801, 2011.

HOWLAND, R. H. A Benefit-Risk assessment of agomelatine in the treatment of major depression. **Adis data information B V**, v. 34, n. 9, p. 710–731, 2011.

HUANG, F.; YANG, Z.; LI, C.-q.. The Melatonergic System in Anxiety Disorders and the Role of Melatonin in Conditional Fear. **Anxiety**, p.281-294, 2017.

JOCKERS, R et al. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?. **British Journal Of Pharmacology**, v. 154, n. 6, p.1182-1195, 2008.

JODAR-VICENTE, M.. Funciones cognitivas del lóbulo frontal. **Revista de Neurologia**, v.39, p.178-182, 2004.

JONSSON, L. et al. Association between ASMT and autistic-like traits in children from a Swedish nationwide cohort. **Psychiatr Genet.**, v.24, n.1, p. 21-7, 2014.

JOSHI, N. et al. Promising Role of Melatonin as Neuroprotectant in Neurodegenerative Pathology. **Mol Neurobiol.**, v.52, n.1, p. 330- 340, 2015.

JUNQUÉ, C. & BARROSO, J. Neuropsicología. Madrid: Editorial Síntesis, 2001.

KARAKAS, A. et al. The effects of the intraamygdalar melatonin injections on the anxiety like behavior and the spatial memory performance in male Wistar rats. **Behav Brain Res.**, v.222, p. 141–150, 2011.

KEVERNE, E. B; CURLEY, J. P. Vasopressin, oxytocin and social behaviour. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, p. 777–783, 2004.

KIM, E. J. et al. Dynamic coding of predatory information between the prelimbic cortex and lateral amygdala in foraging rats. **Science Advances**, v. 4, n. 4, p.1-10, 2018.

KORPONAY, C. et al. Impulsive-antisocial psychopathic traits linked to increased volume and functional connectivity within prefrontal cortex. **Social Cognitive And Affective Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 1169-1178, 2017.

LACOSTE, B. et al. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. **J. Pineal Res.**, v. 58, p. 397–417, 2015.

LAI, T.J. et al. Reduction of orbital frontal cortex volume in geriatric depression. **Biol. Psychiatry**, v.48, p. 971-975, 2000.

LAI, J. et al. Convulsive syncope related to a small dose of quetiapine in an adolescent with bipolar disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 13, p. 1905-1908, 2017.

LEDOUX, J. E. The emotional brain, fear and the amygdale. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.23, p. 727-738, 2003.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. São Paulo: Artmed, 2003.

LITTLE K, et al. Heterogeneity of social approach behaviour in Williams syndrome: The role of response inhibition. **Res. Dev. Disabil.**; v. 34, p.959–67, 2013.

LIU, J. et al. Melatonin increases reactive aggression in humans. **Psychopharmacology**, v.234, n. 19, p. 2971-2978, 2017.

LIU, J. et al. Melatonin potentiates running wheel-induced neurogenesis in the dentate gyrus of adult C3H/HeN mice hippocampus. **J Pineal Res.**, v. 54, n.2, p. 222–231, 2013.

LOPEZ-CANUL, M. et al. Selective melatonin MT2 receptor ligands relieve neuropathic pain through modulation of brainstem descending antinociceptive pathways. **Pain**, v.156, p. 305–317, 2015.

MACHADO, Angelo B.M.; HAERTEL, Lúcia Machado. **Neuroanatomia funcional**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

MARONDE, E; STEHLE, J. H. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.18, p. 142–149, 2007.

MEDA, S. A; PRYWELLER, J. R; THORNTON-WELLS, T A. Correction: Regional Brain Differences in Cortical Thickness, Surface Area and Subcortical Volume in Individuals with Williams Syndrome. **Plos One**, v. 7, n.5, p. 1-9, 2012.

MEDVEDEV, V.E. Agomelatine in the treatment of mild-to-moderate depression in patients with cardiovascular disease: results of the national multicenter observational study PULSE. **Neuropsychiatr Dis Treat.**, v.13, p. 1141-1151, 2017.

MEGA, M. S; CUMMINGS, J. L. Frontal subcortical circuits and neuropsychiatric disorders. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v.6, p.358-370, 1994.

MEYER-LINDENBERG, A. et al. Neural correlates of genetically abnormal social cognition in Williams syndrome. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 8, p.991-993, 2005.

MOBBS, D. et al. Frontostriatal dysfunction during response inhibition in Williams syndrome. **Biol. Psychiatry**. v. 62, p. 256–261 , 2007.

MONTEIRO, L. M. M. **Os recetores da melatonina como novos alvos de fármacos antidepressivos**.2014. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

MOREIRA, F.A; GUIMARÃES, F.S. Mecanismos de ação dos antipsicóticos: hipóteses dopaminérgicas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 40, n.1, p. 63-71, 2007.

MOREIRA, J. O; DE ABREU, A. K. C; DE OLIVEIRA, M. C. Moralidade e sociabilidade em Frankl: Um norte para superação da violência. **Psicologia em Estudo**. v. 11, n. 3, p. 627-635, 2006

MORENO, R. A; MORENO, D. H; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n.1, p.24-40, 1999.

MÜNCHEN, P. A. **Utilidade da auto-limpeza para avaliação da ansiedade em ratos repetidamente expostos a sessões prolongadas de labirinto em cruz elevado**. Paulo Alexandre München. – Londrina, 2013.

NG, K. Y. et al. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. **Brain Structure And Function**, v. 222, n. 7, p. 2921-2939, 2017.

NIE, L. et al. Melatonin ameliorates anxiety and depression-like behaviors and modulates proteomic changes in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. **Biofactors**, v. 43, n. 4, p. 593-611, 2017.

NOVAIS, C. M; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. Revista **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, v.33, 2004.

O'NEAL-MOFFITT, G. et al. Genetic deletion of MT1/MT2 melatonin receptors enhances murine cognitive and motor performance. **Neuroscience**, v. 277, p. 506-521, 2014.

OCHOA-SANCHEZ, R. et al. Promotion of non-rapid eye movement sleep and activation of reticular thalamic neurons by a novel MT2 melatonin receptor ligand. **J Neurosci.**, v.31, p. 18439–18452, 2011.

OLCESE, J; LOZIER, S; PARADISE, C. Melatonin and the circadian timing of human parturition. **Reprod Sci.**, v.20, p.168–174, 2013.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes. **Neurotoxicity Research**, v. 23, n. 3, p.267-300, 2012.

PANDI-PERUMAL, S. et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress In Neurobiology**, v. 85, n. 3, p.335-353, 2008.

PAPP, M. et al. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p. 694-703, 2003.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: The New Coronal Set**. 5. ed. USA: Elsevier, 2004. 209 p.

PEÇA, J. et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. **Nature**, v. 472, n. 7344, p.437-442, 2011.

PETRIDES, M; PANDYA, D. N. Efferent Association Pathways from the Rostral Prefrontal Cortex in the Macaque Monkey. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p. 11573–11586, 2007.

PINATO, L. et al. Day/night expression of MT 1 and MT 2 receptors in hypothalamic nuclei of the primate *Sapajus apella*. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, v.81, p.10-17, 2017.

PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct.**, v.220, n.2, p.827- 40, 2015.

POLONI, T. R. R. S. **Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real.** Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2009.

PORTER, A.; COLTHEART, M.; LANGDON, R. The neuropsychological basis of hypersociability in Williams and Down syndrome. **Neuropsychologia**, v. 45, n. 12, p.2839-2849, 2007.

RAMIREZ-RODRIGUEZ, G. et al. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. **J Pineal Res.**, v. 50, n.1, p. 29–37, 2011.

REITER, R. J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. **Endocrine Reviews**, v.12, n. 2, p.151-180, 1991.

REITER, R. J; TAN, D. X; GALANO, A. Melatonin: Exceeding Expectations. **Physiology**, v. 29, n. 5, p.325-333, 2014.

REPPERT, S. M. et al. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 92, p. 8734–8738, 1995.

RIVA, D; GIORGI, C. The cerebellum contributes to higher function during development: evidence from a series of children surgically treated for posterior fossa tumors. **Brain**, v.123, p. 1051-1061, 2000.

RIVERA-BERMÚDEZ, M. A. et al. Immortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express functional melatonin receptors. **Brain Research**, v.1002, n. 1-2, p. 21-27, 2004.

ROBERTS, K. M; FITZPATRICK, P. F. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. **Life**, v.65, n. 4, p. 350-357, 2013.

RUKSEE, N. et al. Melatonin pretreatment prevented the effect of dexamethasone negative alterations on behavior and hippocampal neurogenesis in the mouse brain. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 143, p. 72–80, 2014.

SALLINEN, P. et al. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. **Life Sciences**, v. 76, n. 10, p.1123-1134, 2005.

SANTORO, S. D. et al. Correlations between behavior, memory, sleep-wake and melatonin in Williams-Beuren syndrome. **Physiology & Behavior**, v. 159, p. 14-19, 2016.

SAVASKAN, E. et al. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. **Journal Of Pineal Research**, v. 38, n. 1, p.10-16, 2005.

SCHMAHMANN, J.D; SHERMAN, J. C. The cerebellar cognitive affective syndrome. **Brain: a journal of neurology**, v.121, p. 561–579, 1998.

SEMENDEFERI, K; DAMASIO, H. The brain and its main anatomical subdivisions in living hominoids using magnetic resonance imaging. **Journal of Human Evolution**, v. 38, n. 2, p.317-332, 2000.

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

SIMONNEAUX, V; RIBELAYGA, C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. **Pharmacol Rev.**, v. 55, n. 2, p. 325–395, 2003.

SLOMINSKI, R. M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n.2, p. 152–166, 2012.

SOARES, J; MANN, J. J. The anatomy of mood disorders - Review of structural neuroimaging studies. **Biol Psychiatry**, v.41, p. 86-106, 1997.

SODERSTROM, H. et al. - Reduced frontotemporal perfusion in psychopathic personality. **Psychiatry Res.**, v.1, p. 1481-94, 2002.

SORIA, V; URRETAVIZCAYA, M. Circadian rhythms and depression. **Actas Esp Psiquiatr.**, v. 37, p. 222-232, 2009.

SORIA, V. et al. Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. **Journal Of Pineal Research**, p. 35-43, 2010.

SPILLA, C. S. G. **Memória espacial e neuroquímica do hipocampo em modelo animal de autismo** / Caio Sergio Galina Spilla. – Marília, 2018.

SRINIVASAN, V. et al. Melatonin in mood disorders. **World J Biol Psychiatry**. v.7, p. 138-51, 2006.

SUNDBERG, I. et al. Salivary Melatonin in Relation to Depressive Symptom Severity in Young Adults. **Plos One**, v.11, n. 4, p. 1-10, 2016.

SWEENEY, J.A; KMIEC, J. A; KUPFER, D. J. Neuropsychologic impairments in bipolar and unipolar mood disorders on the CANTAB neurocognitive battery. **Biol Psychiatry**, v.48, p.674-685, 2000.

SZCZEPANSKI, S. M; KNIGHT, R. T. Insights into Human Behavior from Lesions to the Prefrontal Cortex. **Neuron**, v. 83, n. 5, p.1002-1018, 2014.

TAN, D. X. et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. **Free Radic Biol Med.**, v.29, p. 1177–1185, 2000.

THORPE, S. J; FABRE-THORPE, M. NEUROSCIENCE: Seeking Categories in the Brain. **Science**, v.291, n. 5502, p. 260-263, 2001.

TODOROV, J. C. Sobre uma definição de comportamento. **Revista Perspectivas**, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2012.

TOHEN, M. et al. Olanzapine versus Lithium in the Maintenance Treatment of Bipolar (Versão integral). **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, p. 7-17, 2005.

TRAVIS, K; FORD, K; JACOBS, B. Regional Dendritic Variation in Neonatal Human Cortex: A Quantitative Golgi Study. **Developmental Neuroscience**, v.27, n. 5, p. 277-287, 2005.

VAN REETH, O; MACCARI, S. Biology of circadian rhythms: possible links to the pathophysiology of human depression. **Medicographia.**, v.29, p. 17-21, 2007.

VIARO, F; NOBRE, F; EVORA, P. R. B. Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. **Arq. Bras. Cardiol.**, 74(4), 365–379, 2000.

WALY, N. E., HALLWORTH, R. Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. **Journal of Circadian Rhythms**, v.13, n. 1, p.1-7, 2015.

WEAVER, D. R. et al. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 76, n. 2, p.295-301, 1993.

WEIL, Z. M. et al. Melatonin receptor (MT1) knockout mice display depression-like with bipolar disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.13, p. 1905-1908, 2006.

WONGCHITRAT, P. et al. Melatonin attenuates the high-fat diet and streptozotocin-induced reduction in rat hippocampal neurogenesis. **Neurochem Int.**, v.100, p. 97–109, 2016.

YADIN, E; THOMAS, E; GRISHKAT, H. L. et al. The role of the lateral septum in anxiolysis. **Physiol Behav.**, v.53, p. 1077–1083, 1993.

YAMASHITA, P. S. et al. Serotonin actions within the prelimbic cortex induce anxiolysis mediated by serotonin 1a receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 1, p.3-11, 2018.

YIRMIYA, N; CHARMAN, T. The prodrome of autism: early behavioral and biological signs, regression, peri- and post-natal development and genetics. **Journal Of Child Psychology And Psychiatry**, v. 51, n. 4, p.432-458, 2010.

ZHANG, Y. Serotonin₆ Receptors in the Prelimbic Cortex are Involved in the Regulation of Anxiety- Like Behaviors in the Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model. **The Chinese Journal Of Physiology**, v. 61, n. 4, p.201-209, 2018.

ZHONG, X. et al. Anterior cingulate cortex involved in social food-foraging decision-making strategies of rats. **Brain And Behavior**, v. 7, n. 10, p.1-9, 2017.

ZUCULO, G. M. et al. Melatonin and circadian rhythms in autism: Case report. **Chronobiology International**, v. 34, n. 4, p. 527-530, 2017.

10. ANEXOS



FLS.	23
PROC. Nº	890/17
RUBRICA	<i>[assinatura]</i>

CERTIFICADO 001/2017

Certificamos que a proposta intitulada “ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GABA EM ESTRUTURAS LÍMBICAS DE MODELO ANIMAL COM ALTERAÇÕES NA INTERAÇÃO SOCIAL”, registrada sob o protocolo nº 890/2017, sob a responsabilidade de Luciana Pinato, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FFC – UNESP do Campus de Marília, em reunião de 30/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 12/2017 a 04/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato/ Wistar
Nº de animais	40
Peso/Idade	300g/60 dias
Sexo	F/M
Origem	Laboratório de Biopsicobiologia da USP/Ribeirão Preto

Marília, 01 de dezembro de 2017.

[Assinatura]
Prof. Dr. Edson Luís Maistro
 Vice-Presidente da CEUA-FFC da UNESP-
 Câmpus de Marília