

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ADRIANI PAGANINI DAMIANI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS,
GENOTÓXICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA
POR DIFERENTES TEMPOS ATÉ O ENVELHECIMENTO**

**CRICIÚMA
2018**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ADRIANI PAGANINI DAMIANI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS,
GENOTÓXICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA
POR DIFERENTES TEMPOS ATÉ O ENVELHECIMENTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Moraes de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

**CRICIÚMA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

D158a Damiani, Adriani Paganini.

Avaliação de parâmetros comportamentais, genotóxicos e de estresse oxidativo em camundongos suplementados com melatonina por diferentes tempos até o envelhecimento / Adriani Paganini Damiani. – 2018.

123 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientação: Ricardo Aurino de Pinho.

1. Envelhecimento. 2. Melatonina – Uso terapêutico. 3. Melatonina – Efeitos fisiológico. 4. Estresse oxidativo. 5. Dano ao DNA. 6. Antioxidantes. I. Título.

CDD 22. ed. 615.36



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

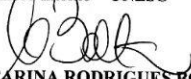
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Adriani Paganini Damiani** sob o título “**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, GENOTÓXICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS SWISS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA POR DIFERENTES TEMPOS ATÉ O ENVELHECIMENTO**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 27 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. **PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA**
Membro Interno – UNESC


Prof.ª Dra. **JOSIANE BUDNI**
Membro Interno – UNESC


Prof.ª Dra. **CARINA RODRIGUES BOECK**
Membro Externo – UNIFRA


Prof. Dr. **SHARBEL WEIDNER MALUF**
Membro Externo – UFSC


Prof.ª Dra. **Vanessa Moraes de Andrade**
Orientadora


Prof.ª Dra. **Maria Inês da Rosa**
Coordenadora do PPGCS

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo a Resolução N.07/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em colaboração com o Laboratório de Neurociências e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, do PPGCS da UNESC.

*Este trabalho é dedicado àqueles que
incondicionalmente estiveram presentes ao meu
lado a longo desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço imensamente aos meus pais Irio e Ivoneide que são meu alicerce, pelos ensinamentos da vida, pelo amor incondicional, apoio e por sempre me motivarem, compreendendo as minhas faltas e momentos de afastamento. Obrigada por viverem este sonho comigo, esta conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos Fernando e Sabrina, pelo amor, carinho e apoio que foram fundamentais nesta jornada.

Ao Sandro, meu eterno namorado, com quem eu sei que passarei por muitos e muitos momentos de felicidade como este e que é a pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins, que muitas vezes me viu chorando e mesmo sem entender os motivos tentava me tranquilizar dizendo que “tudo daria certo”.

A minha orientadora e amiga Vanessa, pessoa que Deus colocou em minha vida a mais de 10 anos, com quem tive o prazer de conviver desde minha graduação. Não tenho palavras para te agradecer. Obrigada pela sua amizade, confiança no meu trabalho, pelo respeito, por me ensinar, pela compreensão e pelos sábios conselhos sempre que necessários. Você é uma pessoa que levarei sempre comigo.

Ao professor Ricardo Pinho que, indiferente dos acontecimentos será sempre meu “coorientador”, muito obrigada por ter vivenciado conosco o desenvolvimento deste projeto, pela ajuda, ensinamentos e contribuições e principalmente por sempre estar à disposição respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo mesmo quando parecia que tudo tinha acabado.

A Giulia e a Thaniely que me ajudaram incansavelmente neste trabalho, gurias não tenho palavras para agradecer a parceria nestes 2 anos de tratamento aos animais, sem vocês tudo teria sido muito difícil. Obrigada por tomarem este trabalho como se fosse de vocês. Vocês são sensacionais e torço muito pelo sucesso de vocês.

As amigas que o doutorado me proporcionou Samira, Tamires e Thais Vilela, obrigada pela amizade e por todos os momentos compartilhados ao longo destes anos. Agradeço principalmente a Thais pelas palavras de apoio quando precisei, pela ajuda incansável no desenvolvimento final deste trabalho, por ter abdicado de alguns dias das férias para me ajudar e por me escutar sempre.

A Paula, Flávia e ao Ricardo Andrez, pessoas maravilhosas que tive o prazer de conviver durante estes 4 anos. Obrigada pelas conversas, risadas, conselhos e ajuda, vou levar vocês sempre comigo.

As meninas da pós Luiza, Maiara, Marina e Nathi, obrigada pelo companheirismo e apoio nestes anos. Em especial agradeço a Luiza, pela ajuda nos testes deste trabalho e pelos muitos anos de convivência, desejo muito sucesso na sua vida profissional e pessoal. À Marina e a Nathi que foram peças fundamentais nesta minha jornada, principalmente neste último ano, ouviram meus desabafos e meus choros e me incentivaram e me deram apoio quando precisei e principalmente me acalmavam quando eu acreditava que nada daria certo, sentirei falta de vocês, mas tenho certeza que continuaremos amigas.

As minhas eternas amigas Gisele, Ionara e Mari, que mesmo a distância sempre estiveram presentes, vocês são a prova que uma amizade verdadeira continua a crescer mesmo a longa distância.

A todos os integrantes do GPGTOX e a todos que já fizeram parte desta família, obrigada pela ajuda e companheirismo durante este trabalho e todos os outros que realizamos no laboratório. Ter a capacidade de trabalhar bem em equipe mostra humildade, tolerância, inteligência emocional e companheirismo, pois, ninguém é nada sozinho e se queremos fazer algo grande, importante e que nos traga orgulho, precisamos fazer em equipe, alcançar o sucesso com um esforço coletivo é muito mais prazeroso. Obrigada de coração.

Aos todos os amigos e colegas do grupo do professor Ricardo Andrez, obrigada por cada segundo dispensado comigo, por cada sorriso, por cada bom dia e principalmente pelo conhecimento compartilhado. Torço para que cada um de vocês alcancem cada vez mais sucesso em suas vidas profissionais, e claro, também em suas vidas pessoais. A todos deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Aos alunos e professores do “Lafibe” pelo acolhimento durante a realização do western blot, em especial a Thais Fernandes que me acompanhou desde o início da realização desta técnica.

Aos alunos do laboratório de neurociências, em especial a professora Josiane Budni e a Francielle Mina pelos ensinamentos nos testes comportamentais.

Ao pessoal do centro de Experimentação da Unesc, principalmente o Heron e o Deivid pela ajuda e companheirismo no decorrer deste trabalho e tantos outros.

Aos animais que involuntariamente cederam à vida em prol do conhecimento Científico.

A Unesc pela oportunidade de realizar minha graduação, mestrado e doutorado.

Ao curso de Biomedicina, em especial a professora Vanessa por me proporcionar de realizar a pratica docente na disciplina de Biologia Molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o meu doutorado.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Aos professores do Programa de Ciências da Saúde da UNESC, pelos ensinamentos ao longo destes anos.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despídos de orgulho." (Dalai Lama)

RESUMO

O processo de envelhecimento é um fenômeno multifatorial associado a diminuição das funções fisiológicas e celulares e propensão aumentada para várias doenças degenerativas. Evidências apontam forte relação entre o aumento de estresse oxidativo e o envelhecimento, e, portanto, o uso de antioxidantes pode contribuir para minimizar esse quadro. Estudos usando melatonina, um potente antioxidante natural, vêm ganhando destaque, uma vez que sua produção diminui com o avanço da idade. Nesse contexto o objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros comportamentais, genotóxicos e de estresse oxidativo em camundongos suplementados com melatonina por diferentes tempos até o envelhecimento. Duzentos e quarenta camundongos swiss machos de 3 meses foram divididos em 8 grupos; controle e grupos que iniciaram o consumo de melatonina aos: 3, 6, 12 e 18 meses de vida, e permaneceram consumindo até completarem 21 meses de vida. Os grupos controle iniciaram o consumo de melatonina aos 3 e 12 meses até a morte natural. Os animais receberam água e/ou melatonina (2mg/L) durante os diferentes tempos de suplementação (livre acesso). Após 21 meses, os animais que não receberam a suplementação até a morte natural foram submetidos aos testes comportamentais, seguido da eutanásia para a dissecação das estruturas para posteriores análises genotóxicas e bioquímicas. No teste de campo aberto, todos os animais apresentaram atividade exploratória na sessão treino. Na sessão teste, os animais que receberam melatonina desde os 6 e 12 meses, apresentaram diminuição no número de cruzamentos em relação à sessão treino, porém, em relação aos levantamentos, os grupos que receberam melatonina desde os 3 e 12 meses apresentaram diminuição, em relação à sessão treino. No teste de suspensão pela cauda, a melatonina apresentou efeito antidepressivo, reduzindo a imobilidade dos animais. Em relação a instabilidade genômica, a melatonina, na dose testada independentemente da idade de início, foi efetiva em auxiliar na redução de danos ocasionados pelo envelhecimento, apresentando atividade antigenotóxica e antimutagênica. Além disso, o grupo que recebeu melatonina por 18 meses apresentou elevados níveis das enzimas responsáveis pelo sistema de reparo no DNA (APE1 e OGG1), e das responsáveis pelo sistema oxidativo (HO-1 e NQO1); redução dos níveis de 4-HNE e NLRP3, geradas através da oxidação de lipídeos e inflamação respectivamente. Em conclusão, os resultados do presente estudo revelam que a melatonina apresenta um eficiente mecanismo antioxidante auxiliando na modulação de alterações

comportamentais, genéticas e fisiológicas decorrentes do envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento; Melatonina; Danos no DNA; Estresse oxidativo; Antioxidante.

ABSTRACT

Aging process is a multifactorial phenomenon associated with decreased physiological and cellular functions, and increased propensity for various degenerative diseases. Evidence indicates a strong relationship between increased oxidative stress and aging, and therefore, the use of antioxidants may contribute to minimize this condition. Studies using melatonin, a potent natural antioxidant, have been gaining prominence as their production declines with advancing age. In this context the aim of objective of the present study was to evaluate the behavioral, genotoxic and oxidative stress parameters of mice supplemented with melatonin for different times until aging. Two hundred and forty albinos swiss male mice with 3 months were divided in 8 groups: control, and groups that started melatonin consumption at 3, 6, 12 and 18 months of life, and continued to consume until they were 21 months old. The control groups started consuming melatonin at 3 and 12 months and received this hormone until natural death. The animals received water or melatonin (2mg / L) in the water bottle (free access) during the different times of supplementation. After 21 months, animals that were not destined to remain receiving supplementation until natural death were subjected to behavioral tests. After the tests were submitted to euthanasia for the dissection of the structures for later genotoxic and biochemical analyzes. In the open field test, demonstrated that all animals presented exploratory activity in the session training. In the session test, animals that received water or melatonin since the 6 and 12 months, presented decreased crossing in relation to session training, but, in relation the rearing, the group that received melatonin since the 3 and 12 months, presented decrease, in relation the session training. In the tail suspension behavioral test, melatonin presented antidepressant effect, reducing the immobility of the animals. In relation to genomic instability, the melatonin at the dose tested independently of the age of start was effective in helping to reduce the damages caused by aging, presenting antigentoxic and antimutagenic activity. In addition, the group that received melatonin for 18 months had high levels of the enzymes responsible for the DNA repair system (APE1 and OGG1), and those responsible for the oxidative system (HO-1 and NQO1); reduction of the levels of 4-HNE and NLRP3,

generated through oxidation of lipids and inflammation respectively. In conclusion, the results of the present study reveal that melatonin presents an efficient antioxidant mechanism aiding in the modulation of behavioral, genetic and physiological alterations due to aging

Keywords: Aging; Melatonin; DNA damage; Oxidative stress; Antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Pirâmide da estrutura etária no Brasil.....	32
Figura 2 Danos no DNA, mecanismos de reparação e consequências .	37
Figura 3 Via de Reparo por Excisão de Bases (BER).....	39
Figura 4: A: Fórmula estrutural da melatonina; B: Representação de sua produção, situado na parte anterior do hipotálamo	42
Figura 5: Biossíntese da melatonina.....	43
Figura 6: Esquema do desenho experimental:.....	50
Figura 7: Habituação ao campo aberto.....	53
Figura 8: Posição do animal durante a realização do teste comportamental de suspensão pela cauda.....	54
Figura 9: Curva de sobrevivência dos animais que iniciaram o consumo de melatonina em duas diferentes idades (3 e 12 meses)	62
Figura 10: Efeitos do envelhecimento e da suplementação com melatonina (2mg/L) em diferentes idades na habituação ao campo aberto.....	64
Figura 11: Efeitos do envelhecimento e da suplementação com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida, no parâmetro de imobilidade em camundongos machos velhos submetidos ao teste de suspensão pela cauda.....	65
Figura 12: Índice de danos no DNA em células de tecidos cerebrais de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida.....	67
Figura 13: Frequência de danos no DNA em células de tecidos cerebrais de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida	68
Figura 14: Índice de danos no DNA em células de tecidos periféricos de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida	70
Figura 15: Frequência de danos no DNA em células de tecidos periféricos de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida	71
Figura 16: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos basais no DNA medidos pelo parâmetro de índice de danos.	73

Figura 17: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos basais no DNA medidos pelo parâmetro de frequência de danos.	74
Figura 18: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos oxidativos no DNA medidos pelo parâmetro de índice de danos.	75
Figura 19: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos oxidativos no DNA medidos pelo parâmetro de frequência de danos.	76
Figura 20: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus o número de micronúcleos em EPC (eritrócitos policromáticos) ou ENC (eritrócitos normocromáticos).	78
Figura 21: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de OGG1 e APE 1 no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento.	79
Figura 22: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de HO-1 e NQO-1 no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento	80
Figura 23: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de 4-HNE no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento.	81
Figura 24: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de NLRP3 no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ingestão de água ou melatonina (2mg/L) em mL, por camundongo, medida duas vezes por semana, durante 18, 15, 9 e 3 meses de tratamento, até os animais completarem 21 meses de vida	59
Tabela 2: Ingestão líquido em mL pelos grupos que iniciaram o consumo de melatonina (2mg /L) aos 3 e 12 meses, medida 2 vezes por semana até a ocorrência da morte natural dos animais.	60
Tabela 3: Peso dos animais que receberam água ou melatonina (2mg/L) mensurado a cada 3 meses, durante 18, 15, 9 e 3 meses, até os animais completarem 21 meses de vida.....	60
Tabela 4: Peso dos animais que iniciaram o consumo de água ou melatonina (2mg/L) aos 3 e 12 meses, até a ocorrência de morte natural.....	61
Tabela 5: Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos swiss machos velhos, suplementados ou não com melatonina por diferentes períodos de tempo.....	77
Tabela 6: Índice e frequência de danos de animais jovens avaliados em diferentes tecidos em diferentes estudos.	87

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- 4-HNE** - 4- hidroxinonenal (do inglês 4-hydroxynonenal)
5'dRP - 5' desoxirribose-fosfato
5-HTP - 5-hidroxitriptofano
AA-NAT - enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (do inglês Aralkylamine N-acetyltransferase)
APE 1 - endonuclease apurínica 1 (do inglês Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1)
ARE - elemento de resposta antioxidante (do inglês antioxidant response element)
ATM - Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR - Ataxia-telangiectasia Rad3-relacionada
BER - - reparação por excisão de bases, (do inglês base excision repair)
BPA- Bisfenol A
CAT - Catalase
CEA - Centro de Experimentação Animal
ChK - Checkpoint quinase
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2 - Ciclo-oxigenase
DA - Doença de Alzheimer
DDR - Resposta a dano no DNA (do inglês, DNA damage response),
DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)
DNAmt - DNA mitocondrial
EC – Ensaio cometa
ENC – Eritrócitos normocromáticos
ENCMn – Eritrócitos normocromáticos micronucleados
EO – Estresse oxidativo
EPC – Eritrócitos policromáticos
EPCMn – Eritrócitos policromáticos micronucleados
ERN - Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécies reativas de oxigênio)
FD – Frequência de danos
FPG – Formamidopirimidina DNA-glicosilase
GCLC - glutamato-cisteína ligase
GPx – Glutationa peroxidase (do inglês glutathione peroxidase)
GSH – Glutationa reduzida (do inglês reduced glutathione)
GST - Glutationa S-transferase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HIIT - Treino intervalado de alta intensidade (do inglês high-intensity interval training)

HIOMT - Hidroxi-indol- O-metiltransferase

HNEJ - Reparo de quebras duplas reparação não homóloga

HO-1 - Heme oxigenase 1 (do inglês Heme oxygenase-1)

HR - Reparo de quebras duplas com recombinação homóloga

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ID – Índice de Danos

LABIM – Laboratório de Biologia Celular e Molecular

LAFIBE – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício

LPS - Lipopolissacarídeo

Mel – Melatonina

MMC - Mitomicina-C

MMR- Reparo de erros de emparelhamento entre bases (do inglês mismatch repair)

MN – Micronúcleos

NAS - N-acetilserotonina

NER - Reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês nucleotide excision repair)

NEUROLAB - Laboratório de Neurociências

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês factor nuclear kappa B)

NLRP3 - NLR receptor do tipo NOD - NLR family, pyrin domain containing 3

NO - Óxido nítrico (do inglês nitric oxide)

NOQ1 - NAD(P) quinona oxidoreductase-1 (do inglês NADPH dehydrogenase quinone 1)

NOS - Óxido nítrico sintase

Nrf2 - Fator nuclear eritróide-2

NSQ - Núcleo supraquiasmático

NTH1 - Do inglês endonuclease III homologue 1

O $_2^{\cdot -}$ - Radical superóxido

OGG1 - DNA glicosilase de 8-oxoguanina (do inglês 8-oxoguanine DNA glycosylase)

OH - Hidroxila

OMS - Organização mundial da saúde

Pol β - DNA polimerase β

pRb - Proteína do retinoblastoma

Prx1 – Peroxiredoxina

RL- Radicais livres

SCGE - Eletroforese em gel de célula única (do inglês single cell gel electrophoresis)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SNC - Sistema nervoso central

SOD: Superóxido desmutase

Srx - Sulfiredoxina

TPH1 - Triptofano hidroxilase 1

Trx1 - Tioredoxina redutase

UDG: Uracil-DNA glicosilase

UNASAU - Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

UV: radiação ultravioleta (do inglês ultraviolet radiation)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 ENVELHECIMENTO	31
1.2 ENVELHECIMENTO EM NÍVEL CELULAR	33
1.3 ENVELHECIMENTO E REPARO DO DNA	36
1.4 MELATONINA	41
1.5 ENVELHECIMENTO E MELATONINA	45
1.6 JUSTIFICATIVA	46
2 OBJETIVOS	48
2.1 OBJETIVO GERAL:	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 ANIMAIS	49
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	49
3.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DA MELATONINA	51
3.4 CONSUMO DE LÍQUIDO E PESO DOS ANIMAIS	51
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	51
3.5.1 Teste comportamental de atividade exploratória: Habituação ao campo aberto	51
3. 5. 2 Teste comportamental preditivo para ação antidepressiva: suspensão pela cauda	53
3.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	54
3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	54
3.7.1 Ensaio cometa alcalino	54
3.7.1.2 Ensaio Cometa com tratamento enzimático (FPG)	56
3.7.2 Teste de Micronúcleos (MN)	56

3.8 NÍVEIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING.....	56
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4 RESULTADOS	59
4.1 CONSUMO DE LÍQUIDO E PESO DOS ANIMAIS.....	59
4.2 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA	62
4.3 EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA	63
4.3.1 Habituação ao campo aberto	63
4.3.2 Teste de Suspensão pela cauda	64
4.4 EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE DANOS NO DNA DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA	65
4.4.1 Ensaio cometa alcalino e oxidativo.	65
4.4.2 Teste de Micronúcleos	77
4.5 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE APE1 E OGG1 EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA.....	79
4.6 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE MARCADORES OXIDATIVOS EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA.....	80
4.7 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE 4- HNE E NLRP3 EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA.....	81
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÃO	96

REFERÊNCIAS

97

ANEXO A

122

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo biológico inevitável, comprometendo progressivamente aspectos físicos, cognitivos e fisiológicos, afetando a maioria dos organismos vivos (López-otín et al., 2013; Xi et al., 2013). Biologicamente, o envelhecimento é um processo de senescência celular de tecidos adultos, que resulta na diminuição da capacidade de resposta ao estresse, aumento do desequilíbrio homeostático e eleva os riscos de doenças degenerativas e câncer, tornando o indivíduo mais vulnerável às doenças e eventualmente levando à morte (Harman, 1981; Rakyan et al., 2010). Tais alterações decorrem de processos dependentes de fatores como estilo de vida, condições sócio-econômicas e doenças crônicas. Dessa forma, o envelhecimento decorre de mudanças bioquímicas, moleculares, teciduais e orgânicas do indivíduo (Rutten et al., 2007).

Nos últimos anos, houve um aumento da população idosa mundial, e acredita-se que essa população aumente cada vez mais em proporções exponenciais. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2012) sugerem que, até o ano de 2025, a população mundial contará com quase 2 bilhões de pessoas com idade de sessenta anos ou mais. Enquanto que no Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de 2016 (IBGE), o contingente de idosos passou de 3 milhões, em 1960, para 7 milhões, em 1975, e 20 milhões em 2008 – um aumento de quase 700% em menos de 50 anos. O censo de 2010 revelou que o Brasil tinha 20,6 milhões de idosos, número este, que representava 10,78% da população brasileira sendo composta por pessoas acima de 60 anos (Brasil, 2010). Uma publicação lançada em 2016 pelo mesmo órgão, mostra que, em 2030, os idosos chegarão a 41,5 milhões (18% da população) e as crianças (até 14 anos) serão apenas 39,2 milhões, ou seja, 17,6% da população (IBGE, 2016). A projeção deste número para 2050, mostra que a população idosa vai triplicar no Brasil, passando de 20,6 milhões (10,70% do total), em 2010, para 66,5 milhões de pessoas (29,3%), configurando um aumento em torno de 200% da população com idade igual ou superior a 60 anos. Esta projeção reflete a inversão da pirâmide da estrutura etária longo de 1950, 2015 e 2050 (figura 1) (ONU, 2015; IBGE, 2016; Simões, 2016).

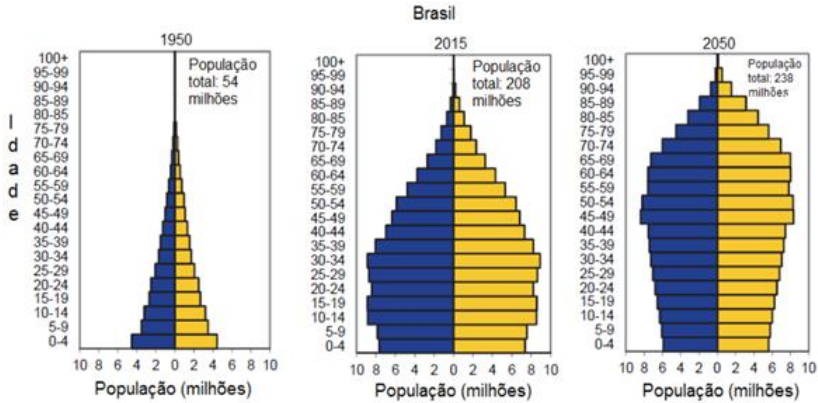


Figura 1: Pirâmide da estrutura etária no Brasil. A Pirâmide reflete a estrutura por faixa etária da população brasileira ao longo dos anos de 1950, 2015 e 2050. Amarelo ♀; Azul ♂; (ONU, 2015).

A explicação para esse aumento no número de idosos é a melhora na qualidade de vida que resultou numa expectativa de vida aumentada dos brasileiros. Acredita-se que passará de 75 anos em 2013 para 81 anos em 2060 - com as mulheres vivendo, em média, 84,4 anos, e os homens 78,03 anos. Além disso, a queda na taxa de fecundidade dos últimos 50 anos, que passou de 6,2 filhos nos anos 1960 para aproximadamente 1,77 em 2013 também é outro fator responsável por essa inversão na pirâmide etária (Portal Brasil, 2016).

O aumento na população de idosos, leva a um concomitante aumento de doenças degenerativas decorrentes do declínio progressivo das funções motoras e das capacidades cognitivas que ocorrem nesta fase da vida (Costa et al., 2008). O declínio do estado cognitivo, de fato, pode ser observado por déficits de memória e capacidade para o uso estratégico da informação adquirida (Van Geldorp et al., 2015). A memória está envolvida no processo de codificação e armazenamento de informações, persistência e evocação das informações (Bonini et al., 2007). A respeito da repercussão da idade sobre o desempenho cognitivo, o tipo de memória mais afetado no envelhecimento é a memória de curto prazo, caracterizada por discreto prejuízo das funções executivas envolvendo um comprometimento leve, porém significativo da memória de trabalho, desta forma, os idosos apresentam maior dificuldade de codificar novas informações (Park et al., 2000). Além disso, em roedores, déficits no desempenho de tarefas que envolvem memória espacial e operacional são induzidos pelo envelhecimento (Segovia et al., 2009).

Na maioria dos casos, com os esquecimentos constantes ocasionados pelo déficit de memória decorrente do envelhecimento, grande parte dos idosos sente-se impotente, angustiada, levando-os à fragilidade emocional e tornando-os incapazes de realizar tarefas simples de atividades da vida diária e a sentimentos depressivos. Para Laird et al. (2018), sintomas depressivos são altamente prevalentes em fases avançadas da vida, representando um grande impacto negativo tanto na morbidade quanto na mortalidade dos idosos. Aproximadamente 15% dos idosos apresentam sintomas depressivos que muitas vezes não são identificados como doença e sim como parte normal do envelhecimento, levando ao tratamento tardio.

Contudo, apesar do aumento no número de pessoas afetadas por essas alterações, não existem intervenções clínicas que reduzam as chances de doenças se manifestarem ou que minimizem as enfermidades associadas à idade, levando assim a um aumento na busca de estratégias que podem melhorar a qualidade de vida dessa população (Dröge e Schipper, 2007; Froy e Miskin, 2007; Rao, 2007; Shamma, 2011).

1.2 ENVELHECIMENTO EM NÍVEL CELULAR

O envelhecimento é muitas vezes definido como um fenômeno natural e multifatorial caracterizado por processos degenerativos e conseqüentemente redução das funções fisiológicas. As alterações e danos durante o processo relacionado com a idade sustentam e, em última instância comprometem, a função celular e tecidual (Ji et al., 2017).

Todas as biomoléculas (proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos) estão sujeitas a danos causados por indiscriminadas reações espontâneas de hidrólise (principalmente) e por numerosos agentes reativos endógenos e exógenos aos quais estamos expostos constantemente ao longo da vida (Garinis et al., 2008; Aunan et al., 2017). As reações enzimáticas têm uma taxa de erro, e os produtos que decorrem dos processos de oxirredução como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (Harman, 1956; Kirkwood, 2005) promovem efeitos nocivos sobre essas biomoléculas (Hoeijmakers, 2009). Além disso, a exposição a componentes ambientais, tais como raio-X, radiação ultravioleta (UV) e numerosos produtos químicos, danificam estruturas celulares (Hughes e Reynolds 2005; Wilson et al., 2008; Vermeij et al., 2014).

Diversas evidências científicas publicadas nas últimas duas décadas têm demonstrado uma relação positiva entre o aumento do estresse oxidativo *in vivo* e o envelhecimento (Ávila et al., 2014). O estresse

oxidativo ocorre como consequência do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e as defesas antioxidantes, levando a um aumento na geração de ERO (Betteridge, 2000). ERO e ERN causam cerca de 10^4 a 10^5 lesões por célula de mamíferos por dia (Lindahl, 1993; Gates, 2009; Swenberg et al., 2011). Por vezes, essas lesões, além de ocorrerem em lipídeos e proteínas, geram alterações no DNA que podem estar envolvidas no declínio das funções dos órgãos com o passar da idade (Vijg e Suh, 2013). Desta forma, por ser o DNA um alvo susceptível às ERO, manter a integridade do genoma é um importante mecanismo de proteção para um envelhecimento saudável (Hoeijmakers, 2009). Entretanto, estudos subsequentes demonstraram que ERO em baixas concentrações são necessárias para a manutenção do estado de oxirredução celular, para a função e sinalização celulares normais, bem como para o funcionamento do sistema imunológico (Sitkovsky e Lukashov, 2005; Hursting e Berger, 2010; Marchetti et al., 2012). Contudo, sob uma condição de estresse oxidativo, as ERO interagem com macromoléculas causando alterações moleculares, como peroxidação de lipídeos, carbonilação de proteínas e fragmentação do DNA, comprometendo as funções celulares normais (Hursting e Berger, 2010; Marchetti et al., 2012; Min-Wen et al., 2016).

A teoria dos radicais livres, proposta em 1956 por Denham Harman, sugere que o envelhecimento é uma consequência do acúmulo de lesões causadas por radicais livres (RL), que são quaisquer átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, que podem ser capazes de reagir com qualquer composto próximo, a fim de se tornarem estáveis (Kehrer et al., 2015; Vigh e Suh, 2013). Já as ERO são moléculas que apresentam um oxigênio em um estado altamente reativo, como o radical superóxido (O_2^-), o grupo hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Beckman e Ames, 1998; Vigh e Suh, 2013; Kehrer et al., 2015).

Apesar de certos níveis de EROs serem decorrentes de processos fisiológicos (Vigh e Suh, 2013), uma grande variedade de processos biológicos têm implicado no envelhecimento (López-Ortiz et al., 2013) e, algumas evidências apontam que o acúmulo de danos celulares causado por RL é considerado a causa geral do mesmo (Gems e Partridge, 2013; Kirkwood, 2005; Lenart e Krejci, 2016). Por exemplo, a produção excessiva de RL pode levar à oxidação de lipídeos de membrana formando aldeídos citotóxicos, como o 4- hidroxinonenal (4-HNE), capaz de formar adutos com proteínas, lipídeos e DNA, resultando na inativação do alvo e consequente disfunção celular (Murawska-Cialowicz et al., 2008). A ativação de outras vias metabólicas por RL, como como a via

do inflamassoma tem emergido como importante sensor de danos celulares (Lima-Junior et al., 2013), sendo bem estudado devido sua associação com importantes doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, tais como doença de Alzheimer (DA), diabetes tipo II, obesidade, aterosclerose e doenças intestinais (Wen et al., 2012)

Diversos estudos vêm demonstrando vários tipos de danos no DNA, acumulados durante a idade, e todos eles acreditam ser o estresse oxidativo o grande contribuinte deste processo, principalmente em estudos com roedores (Bonassi et al., 1995; Iamarcovai et al., 2007; Wojda et al., 2007; Heuser et al., 2008; Damiani et al., 2017). No entanto, além do estresse oxidativo, López-Otín e colaboradores (2013) enumeraram outros nove eventos que se relacionam com o envelhecimento e que juntos podem determinar o fenótipo do mesmo: 1) Instabilidade genômica; 2) alterações epigenéticas; 3) perda de proteostase; 4) desequilíbrio nutricional; 5) disfunção mitocondrial; 6) exaustão celular; 7) alteração na comunicação intercelular; 8) encurtamento de telômeros; e 9) senescência celular. Dentre esses, os que mais vêm sendo discutidos em pesquisas relacionadas ao envelhecimento, são a instabilidade genômica, o encurtamento de telômeros e a senescência celular.

A instabilidade genômica é um dos mais comuns denominadores do envelhecimento ocasionado pelo acúmulo de danos genéticos ao longo da vida (Moskalev et al., 2012). A manutenção da estabilidade genômica parece ser uma função central para prevenir envelhecimento, uma vez que as mutações decorrentes da instabilidade genômica podem contribuir para o envelhecimento de várias maneiras, desde pequenas mutações pontuais até grandes translocações e deleções, ganhos e perdas de cromossomos e encurtamento de telômeros (Aunan et al., 2017).

Os telômeros são complexos DNA-proteína encontrados nas extremidades dos cromossomos lineares, que protegem o genoma de degradação e fusão inter-cromossômica, e estão susceptíveis à deterioração relacionada à idade (Blackburn et al., 2006; Blasco, 2007; Lin et al., 2016). O encurtamento dos telômeros pode não estar primariamente envolvido na indução da senescência, mas elevados níveis de estresse oxidativo resultam em desgaste dos telômeros aumentando a probabilidade de uma célula entrar em senescência (Oeseburg et al., 2010).

Já a senescência celular é um processo de transdução de sinais que leva a uma parada irreversível do crescimento celular. As células permanecem metabolicamente ativas (Saretzki, 2010), ficando em uma parada irreversível do ciclo celular em que perdem a habilidade replicativa (Kong

et al., 2011). Molecularmente, a sinalização que leva à senescência celular, envolve a ativação da proteína sensor de dano ao DNA, a histona H2AX. A partir desta proteína, são ativadas vias de resposta a danos no DNA (DDR= sigla do inglês, DNA damage response), envolvendo o eixo Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) /ataxia-telangiectasia Rad3-relacionada (ATR)- Checkpoint quinase (ChK)1/2-p53. Como consequência, p53 atua ativando a transcrição de p21, que por sua vez pode levar a célula à senescência ou ativar proteína do retinoblastoma (pRb), que induz à parada do ciclo celular (Zhang, 2007; Klement e Goodarzi, 2014).

Baseados em todos esses achados, pesquisas sobre o envelhecimento estão ganhando destaque, pois estão sendo conduzidas com o objetivo de adquirir mais conhecimento a respeito dos diferentes fatores (moleculares, celulares ou ambientais) que podem regular o processo de envelhecimento.

1.3 ENVELHECIMENTO E REPARO DO DNA

O DNA é uma molécula orgânica complexa, responsável pelas informações genéticas das células dos organismos. Para que essas informações sejam transferidas com sucesso para as próximas gerações, a integridade do DNA deve ser mantida. Porém, constantemente esta molécula está exposta a agentes que podem danificá-la (Silva et al., 2003)

Danos no DNA podem ser definidos como qualquer modificação nas propriedades de codificação do DNA. Danos à estrutura do DNA podem ocorrer através de dois mecanismos principais: danos causados por fontes espontâneas dentro de uma célula e danos causados por fontes externas, tais como produtos químicos e radiação (Noschang et al., 2009).

Acredita-se que durante o processo de envelhecimento, ocorra uma mudança gradual na estrutura original do DNA. A maioria das alterações do DNA que são relacionadas com a idade provavelmente são resultantes da exposição contínua dos organismos vivos aos agentes que o danificam. A interação desses agentes com o DNA, direta ou indiretamente via processos celulares, pode acarretar em lesões no DNA, isto é, anormalidades na estrutura química da molécula, que podem influenciar na sua função normal (Kosik et al., 2012).

Muitos danos sofridos pelo DNA, são passíveis de reparo, pois, as células dispõem de inúmeros mecanismos de reparo do DNA, especializados na correção de diferentes tipos de alteração (Lord e Ashworth, 2012). As vias de reparação do DNA são capazes de reconhecer um dano e removê-lo da molécula ou ainda as células serem

capazes de bloquear sua replicação, impedindo a progressão do ciclo celular. Por fim, dependendo da severidade do dano, um último mecanismo de segurança é ativado, a morte celular programada ou apoptose, impedindo que células defeituosas continuem a se dividir e transmitam esses defeitos para as células filhas (Hoeijmakers, 2009). Um esquema dos principais danos do DNA, seus mecanismos de reparo e as consequências destes processos pode ser visto na Figura 2.

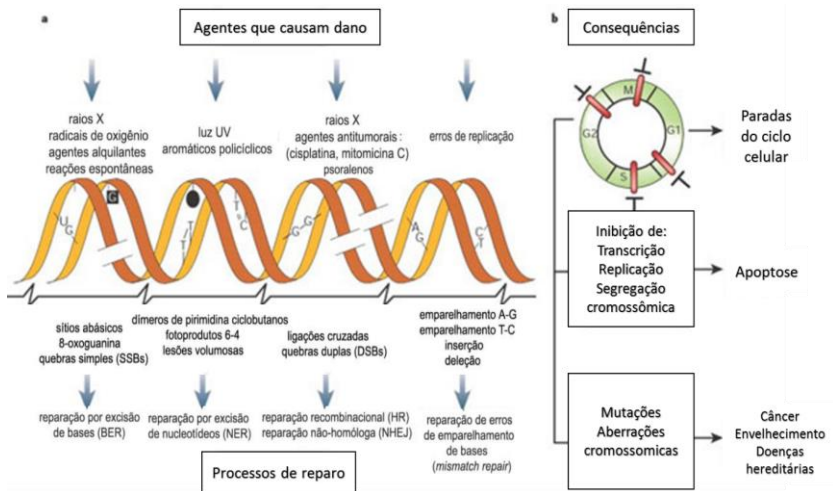


Figura 2: Danos no DNA, mecanismos de reparação e consequências. A) agentes que causam dano no DNA (parte superior); lesões induzidas por estes agentes (meio); principais mecanismos de reparação responsáveis pela remoção das lesões (parte inferior). B) efeitos agudos dos danos na progressão do ciclo celular, conduzindo a paradas nas fases G1, S, G2 ou M (parte superior) e no metabolismo do DNA (meio). Consequências dos danos em longo prazo (parte inferior) incluem alterações permanentes na sequência do DNA (mutações pontuais que afetam um único gene ou aberrações cromossômicas que devem envolver diversos genes) e seus efeitos biológicos (adaptado de Hoeijmakers, 2007).

Os sistemas de reparo do DNA, costumam ser classificados em diversos tipos: a reversão direta do dano, o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), excisão de bases (BER), reparo de erros de emparelhamento entre bases (MMR), reparo de quebras duplas (recombinação homóloga (HR) e reparação não homóloga (HNEJ) (Dianov et al., 2003). Para reparar os diferentes tipos de danos, não são utilizadas exclusivamente uma via de

reparo, podendo ocorrer a interação de dois ou mais sistemas de remoção de dano. E ainda, outras proteínas que desempenham funções celulares específicas podem se ligar ao DNA e influenciar o curso da reparação ao invés de ser somente as proteínas que desempenham funções celulares específicas (Downs et al., 2007).

Em organismos eucarióticos, a via BER é o principal mecanismo utilizado para reparo de lesões oriundas de alquilação e de danos oxidativos no DNA. Bases danificadas podem ser formadas a partir de bases normais, resultantes de metilação, oxidação ou desaminação, gerando uma variedade de lesões. Esta via pode ser subdividida em cinco passos: (i) remoção da base danificada por ação de uma DNA-glicosilase, (ii) incisão no sítio abásico resultante (sítio apurínico-apirimidínico ou sítio AP) por uma AP-endonuclease, (iii) processamento das extremidades terminais, (iv) preenchimento do sítio AP e (v) reconstituição da fita danificada (Fortini et al., 2003).

A via BER tem início através da ação das DNA-glicosilases que tem a função de reconhecer a base que sofreu modificação e dar origem a uma quebra simples de DNA. Para que ocorra a continuação dessas etapas, diversas enzimas de reparo estão envolvidas como a oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) que em eucariotos é a principal enzima que reconhece e cliva 8-oxoGua e é responsável pelo reparo de produtos derivados de guaninas, clivando a ligação glicosídica entre a base danificada e o açúcar; a endonuclease apurínica 1 (APE1), que hidroliza a ligação fosfodiéster na extremidade 5' da lesão, sendo a principal enzima que processa os sítios AP em eucariotos; e a DNA polimerase β (Pol β) que insere um nucleotídeo correto e excisa a extremidade 5' desoxirribose-fosfato (5'dRP) após a incisão de APE1 (Figura 3) (Dianov et al., 2003; Fortini et al., 2003; Kelley et al., 2003). É importante ressaltar que todas as reações enzimáticas que compõem a via BER são sequenciais, em que o produto de uma enzima é imediatamente passado como substrato da seguinte (Wilson e Kunkel., 2000).

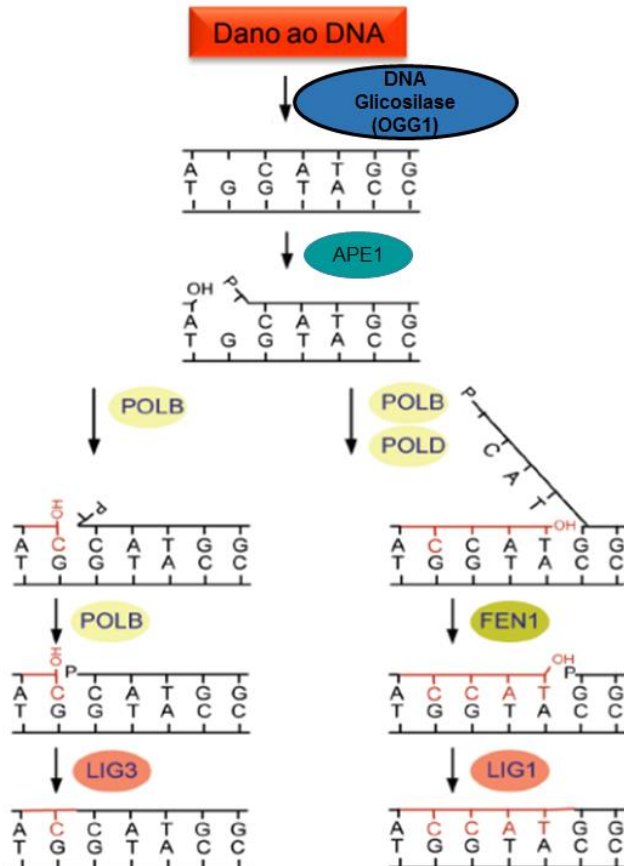


Figura 3: Via de Reparo por Excisão de Bases (BER). A via BER inicia com o reconhecimento da base lesionada por enzimas chamadas DNA glicosilase que em eucariotos a oxoguanina DNA glicosilase (OGG1) é a principal delas. Essa enzima excisa a base por meio da hidrólise da ligação N- β - glicosídica, formando um sítio abásico. Esse sítio, por sua vez, é reconhecido e clivado pela enzima AP endonuclease 1 (APE 1). A DNA polimerase β (Pol β) insere um nucleotídeo durante a síntese do reparo e excisa a extremidade 5'dRP após a incisão de APE1. Após a remoção da alça suspensa, a fita é selada pela DNA ligase (Adaptada de Robertson et al., 2009).

Diversos estudos tem demonstrado uma forte relação entre a redução da atividade das DNA glicosilases e as doenças relacionadas com o envelhecimento (Iida et al., 2002; Imam et al., 2006; Weissman et al.,

2009; Mazouzi et al., 2017; Sliwńska et al., 2017). Em um modelo animal de envelhecimento, Iman et al. (2006) relataram declínio da atividade das DNA glicosilases em cinco regiões do cérebro durante o envelhecimento, demonstrando que a manipulação deste mecanismo de reparo pode fornecer uma estratégia para prevenir a perda neuronal durante distúrbios neurodegenerativos dependentes da idade.

Danos, mutações e deleções no DNA mitocondrial (DNAMt) também estão sendo relatados por aumentar de forma dependente com a idade, tanto no sistema nervoso central (SNC) do ser humano quanto de roedores. Se o acúmulo de mutações no DNAMt tem um papel casual no envelhecimento, sugere-se então, que este pode servir como biomarcador do envelhecimento (Shigenaga et al., 1994; Lax et al., 2017; Nissanka e Moraes 2017). Desta forma, Imam et al. (2006) verificaram em extratos mitocondriais, que as três DNA glicosilases estudadas (OGG1, UDG e NTH1) apresentaram redução da sua atividade associada com a idade nas cinco regiões cerebrais avaliadas. Assim, a deficiência no reparo de DNAMt pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas a esta fase da vida.

Estudos iniciais, relacionando a atividade de BER com doença de DA, encontraram redução da atividade de OGG1 em diversas estruturas cerebrais (hipocampo, giro parahipocampal, lóbulo parietal inferior e giro temporal superior médio) nos indivíduos com esse tipo de demência quando comparados ao grupo controle (Lovell et al., 2000). Desta forma, Weissman et al. (2007) levantaram hipóteses de que uma redução da atividade de BER em células de regiões afetadas do cérebro de pacientes com DA, pode contribuir para o acúmulo de lesões oxidadas e para o efeito tóxico das mesmas, com conseqüente morte neuronal.

Kwiatkowski et al. (2016) avaliaram a associação entre danos no DNA, variabilidade de genes na via BER e risco com DA. Foi avaliado danos no DNA através do ensaio cometa e variantes polimórficas de 12 genes da via BER em 105 pacientes com DA e 130 controles. Os resultados do estudo sugerem que o estresse oxidativo e a interrupção do reparo do DNA, podem contribuir para o aumento de danos em pacientes com DA e o risco de desenvolvimento da doença.

Contudo, constata-se que a regulação do processo de envelhecimento é altamente complexa, envolvendo danos no DNA, metilação do DNA e oxidação celular (Xi et al., 2013). Sendo assim, necessitam-se mais estudos para entender e buscar soluções envolvendo ações protetoras contra os danos no DNA causados por esta fase da vida, possibilitando assim, evitar falhas no sistema de reparo.

1.4 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 4A) é o principal hormônio secretado pela glândula pineal de todos os mamíferos, incluindo o homem (Pandi-Perumal et al., 2013). Diferentemente dos hormônios dependentes do eixo hipotálamo-hipofisário, a produção de melatonina não está sujeita a mecanismos de retroalimentação sendo que, portanto, a sua concentração plasmática não regula sua própria produção (Seabra et al., 2000, SBEM, 2017).

A melatonina não é uma molécula exclusiva do reino animal, ao contrário, é ubíqua, podendo ser encontrada também em bactérias, eucariontes unicelulares, macroalgas, fungos, plantas e animais (Reiter et al., 2010; Tan et al., 2010; Cuesta et al., 2013). Além disso, em todas as espécies estudadas de vertebrados, tanto de atividade noturna quanto diurna, a produção de melatonina é exclusivamente noturna, e a duração da sua secreção é dependente da duração do período escuro do ritmo diário de iluminação ambiental (Figura 4B) (Reiter et al., 2002; Tan et al., 2007).

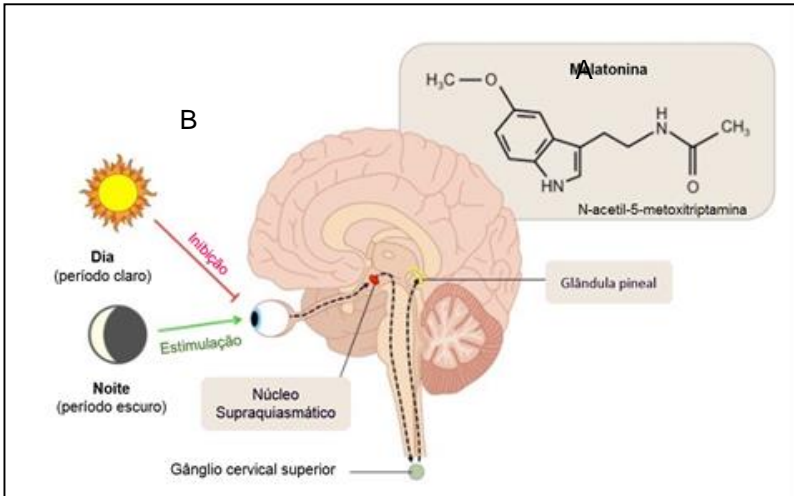


Figura 4: A: Fórmula estrutural da melatonina; B: Representação de sua produção, situado na parte anterior do hipotálamo, o núcleo supraquiasmático (NSQ) funciona como relógio biológico, na ausência de luminosidade, ele envia sinais para a glândula pineal através do gânglio cervical superior, que passa a liberar a melatonina para o cérebro. Esses sinais são bloqueados quando o nervo óptico é estimulado por luz e, então, não ocorre a produção do hormônio (Adaptado de Gilbert, et al., 1999).

Originalmente, acreditava-se que a melatonina era sintetizada exclusivamente na glândula pineal. Porém, estudos vêm demonstrando que diversos tecidos e órgãos extrapineais têm a capacidade de sintetizar este hormônio. Entre eles destacam-se, a retina e o trato gastrointestinal, medula óssea, leucócitos, cóclea membranosa, glândula de harder, e também a pele e outras áreas do cérebro que têm a capacidade de sintetizá-la, porém em menores quantidades (Tan et al. 2003; Hardeland e Poeggeler 2007, 2008; Jimenez-Jorge et al., 2007; Hardeland 2008, 2009).

A síntese da melatonina dá-se por meio do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes na fase de escuro. O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, formando a serotonina, que por sua vez é metabolizada durante a fase de escuro à N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxil-indol- O-metiltransferase (HIOMT)

resultando como produto final a melatonina como demonstrado na Figura 5 (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

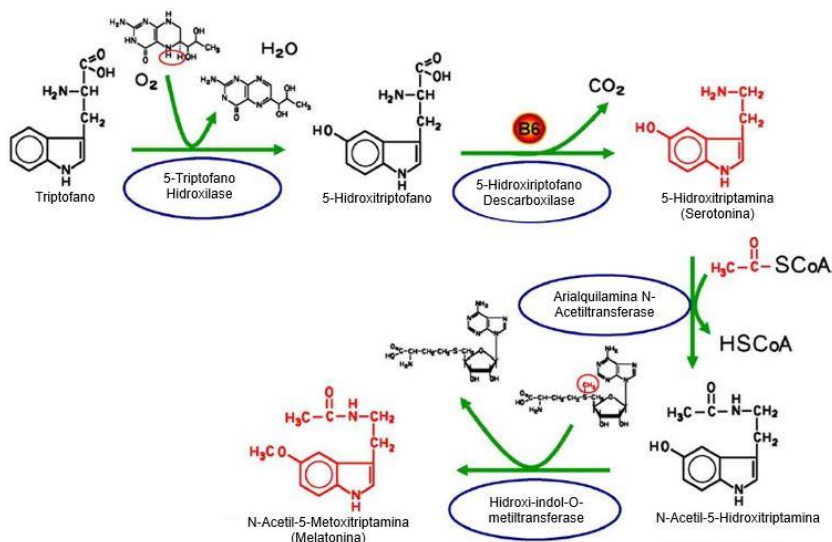


Figura 5: Biossíntese da melatonina. (Modificado de Radogna et al., 2010).

A melatonina participa em diversas funções do corpo incluindo a regulação do sono (Cardinali et al., 2012) e do ritmo circadiano (Dawson e Amrstrong, 1996) e regulação do sistema imunológico e cardiovascular (Radogna et al. 2010). Em adição, pode ter propriedades anti-inflamatórias e anti-câncer (Pandi-Perumal et al. 2006) devido principalmente ao seu papel antioxidante (Amir-Aslani e Ghobadi, 2016).

Este hormônio, possui diversas características que lhe conferem uma eficiente ação antioxidante. Dentre elas destaca-se, sua capacidade direta de atuar como doador de elétrons em processos não enzimáticos; capacidade de atravessar facilmente barreiras morfofisiológicas, e rápido acesso a locais de produção de radicais livres, como nas mitocôndrias, onde a geração destes é especialmente elevada (Reiter et al., 2001; Reiter et al., 2003). Tem sido sugerido, de fato, que a melatonina é um potente captador de radicais livres e reguladora de enzimas redox ativas (Galano et al., 2011) que protegem as células de danos induzidos por vários oxidantes, incluindo o radical hidroxila e produtos de peroxidação lipídica (Poeggeler et al., 1993; Reiter et al., 1995; Korkmaz et al., 2009).

Contudo, o principal papel descrito da Melatonina como agente antioxidante é via ativação do fator nuclear eritróide-2 (Nrf2) (Vriend e Reiter, 2015) por promover a expressão de enzimas detoxificantes como a Heme oxigenase 1 (HO-1) e NAD(P) quinona oxidoreductase-1 (NQ1) (Tripathi e Jena, 2010; Tan et al., 2007; Reiter et al., 2002; Hardeland, 2009). Adicionalmente, tem sido demonstrado, que a melatonina também promove o aumento dos níveis de glutatona intracelular ao estimular a atividade da enzima γ -glutamylcisteína sintase, que inibe a peroxidação de enzimas da síntese do óxido nítrico e lipoxigenase (Karbownik et al., 2001; Radogna et al., 2010).

Em adição, exibe ainda significativa atividade anti-inflamatória (Mauriz et al., 2013; Perdomo et al., 2013) e desencadeia um controle do nível de estresse oxidativo celular. A eficácia da melatonina como agente anti-inflamatório é resultante da sua capacidade em reduzir a expressão e atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e da ciclo-oxigenase (COX-2), limitando assim a produção de uma variedade de moléculas pró-inflamatórias (Perdomo et al., 2013). A melatonina pode modular a produção destes fatores através da regulação de de outros fatores de transcrição, incluindo NF-kB, o fator induzível por hipóxia (HIF). (Mauriz et al., 2013; Carbajo Pescador et al., 2013; Vriend e Reiter et al., 2015).

Em decorrência dessa capacidade de modular as histonas antioxidantes, Qi e colaboradores (2001) mostraram que a melatonina reduz a formação de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina sendo mais eficiente que alguns antioxidantes clássicos como ácido ascórbico e α -tocoferol (Reiter et al., 2001; Tan et al., 2002; Amir-Aslani e Ghobadi, 2016).

Diversos estudos têm investigado o efeitos da melatonina em diferentes modelos experimentais. Erenberk e colaboradores (2014), utilizando uma dose de 50mg/Kg de fenitoína sódica (uma potente droga antiepiléptica) em ratos Wistar posteriormente suplementados com melatonina (4 mg/Kg de peso corporal por 10 dias), demonstrou em seus resultados que a melatonina foi capaz de reverter os danos oxidativos no DNA causados pelo fármaco. Já em 2017, Ortiz-Franco e colaboradores avaliaram o efeito da suplementação de melatonina na capacidade antioxidante e nos danos ao DNA em atletas de treino intervalado de alta intensidade (HIIT). Os atletas foram divididos em dois grupos, um placebo e outro melatonina (20 mg/dia) e submetidos durante 2 semanas ao treinamento de HIIT. A análise dos resultados demonstrou maior capacidade total antioxidante e elevados níveis de GPx no grupo que recebeu melatonina em comparação ao que recebeu placebo, da mesma forma, os danos ao DNA também foram reduzidos no grupo que recebeu a melatonina. Contudo, o presente

estudo sugere que a suplementação com melatonina melhora o estado antioxidante podendo ocasionar efeitos benéficos que impedem a indução de dano ao DNA pelo treinamento de alta intensidade.

Outro estudo conduzido por Wu et al. (2013) investigaram os efeitos genotóxicos do bisfenol A (BPA) em células germinativas de ratos e a potencial ação protetora da melatonina contra esses efeitos. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle, melatonina (10 mg/kg/dia), BPA (200 mg/kg/dia), e melatonina + BPA, e todo o tratamento teve duração de 10 dias. Ao final do tratamento observaram que a exposição ao BPA pode induzir o acúmulo de danos no DNA em células germinativas através do estresse oxidativo. Além disso, a melatonina pode ser um candidato farmacológico promissor para prevenir a potencial genotoxicidade do BPA após exposição ocupacional ou ambiental.

Dessa forma, vê-se que nos últimos anos vem crescendo o interesse em estudar os efeitos da melatonina sobre o DNA, pois este assim como todas as macromoléculas sofrem diariamente as consequências de agentes tóxicos, genotóxicos, ambientais e até mesmo inerentes ao próprio metabolismo celular durante toda a vida.

1.5 ENVELHECIMENTO E MELATONINA

A melatonina controla a organização rítmica circadiana com suas numerosas funções oscilatórias em nível das células, dos órgãos e do comportamento, que determinam a ciclicidade anual (Hardeland et al., 2008; Claustrat e Leston, 2016)

A produção noturna de melatonina varia com a idade. Em bebês, o início da produção circadiana ocorre apenas após os 3 meses alcançando altos níveis plasmáticos noturnos entre um e três anos de idade. Durante a infância, os níveis desse hormônio caem progressivamente e somente após a adolescência os níveis de adulto são alcançados. Em adultos com idades entre 18-50 anos a produção é maior quando comparados à indivíduos idosos (Sack et al., 1986; Karasek e Reiter 2002; Skene, 2003), demonstrando que durante o processo fisiológico do envelhecimento a produção noturna de melatonina diminui significativamente, tanto em ratos (Pang et al., 1990), camundongos (Lahiri et al., 2004) quanto em seres humanos (Tozawa et al., 2003). Deixando assim, o organismo privado de um dos seus aparentemente mais potentes mecanismos de defesa antioxidante (Reiter, 1995, Güney et al., 2013).

Desta forma, o declínio na produção e os ritmos de melatonina alterados podem induzir uma variedade de mudanças fisiológicas associadas com a idade, tornando-se os fatores principais que contribuem para o aumento

dos níveis de estresse oxidativo e da associação com as alterações degenerativas observadas em idosos (Pandi-Perumal et al., 2013; Hardeland, 2013).

No âmbito do envelhecimento, estudos têm sido conduzidos a fim de investigar o papel da melatonina sobre diferentes mecanismos celulares. Rasmussen et al. (1999) avaliaram os efeitos da suplementação diária de melatonina (disponível na água de beber, na concentração de 4µg/mL) em ratos adultos (10 meses de idade) até estes animais atingirem o envelhecimento (22 meses). Ao final concluíram que a administração de melatonina suprime características relacionadas ao envelhecimento, como aumento da adiposidade, queda nos níveis de insulina e leptina, preservando outras características associadas a esta faixa etária, como quedas nos níveis de testosterona.

Utilizando a mesma dosagem e o mesmo tempo de suplementação do trabalho anterior, Wolden-Hanson et al. (2000) observaram que o tratamento com melatonina na idade adulta (10 meses) apresentou diminuição do peso corporal, adiposidade intra-abdominal, diminuição de leptina e insulina plasmática, sem alterar a ingestão de alimentos ou a adiposidade total, enquanto ocorreu um aumento na atividade locomotora dos animais. Estes resultados sugerem que a diminuição da melatonina endógena com o envelhecimento, pode alterar o metabolismo e a atividade física, resultando em peso corporal aumentado, adiposidade visceral e consequências metabólicas prejudiciais associadas.

Diante disso, não existem estudos que demonstrem o efeito da suplementação com melatonina desde a idade jovem até o envelhecimento, em parâmetros genotóxicos, comportamentais e bioquímicos.

1.6 JUSTIFICATIVA

O envelhecimento é um processo dinâmico e progressivo, na qual pesquisas estão ganhando destaque, pois estão sendo conduzidas com o objetivo de adquirir mais conhecimento de diferentes fatores (moleculares, celulares, bioquímicos, comportamentais e ambientais) que podem regular este processo. Neste cenário, a melatonina, um hormônio considerado natural, produzido pelo próprio organismo, vêm ganhando destaque. Estudos demonstram que o processo do envelhecimento é um dos fatores que leva à redução da produção deste hormônio, assim como outros trabalhos evidenciam que ela aumenta o tempo de vida e melhora as defesas do organismo. No entanto, pouco se sabe sobre a função da melatonina no DNA de indivíduos idosos. A partir dessas considerações,

percebeu-se que seria de extrema relevância estudar o papel da melatonina ingerida desde a idade jovem até a velhice em concentração moderada em animais, com o intuito de prevenir as alterações moleculares, bioquímicas e comportamentais decorrentes deste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos da administração crônica de melatonina sobre parâmetros comportamentais, genotóxicos e de estresse oxidativo em camundongos suplementados com melatonina por diferentes tempos até o envelhecimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Quantificar se a ingestão de líquidos por grupo e por animal é alterada com a suplementação de melatonina em diferentes idades.

2. Mensurar o peso dos animais a cada trimestre, durante a suplementação com melatonina;

3. Avaliar parâmetros comportamentais de memória e depressão de camundongos tratados com melatonina em diferentes idades.

4. Analisar os níveis de danos no DNA em células do sangue periférico, hipocampo, córtex, estriado, fígado e rim de camundongos que iniciaram a suplementação de melatonina em diferentes idades.

5. Avaliar o efeito protetor da melatonina sobre os danos mutagênicos causados pelo envelhecimento em camundongos que iniciaram a suplementação de melatonina em diferentes idades.

6. Avaliar a imunodeteção das proteínas de sinalização celular associadas a reparo do DNA e dano oxidativo no hipocampo de camundongos que iniciaram a suplementação de melatonina em diferentes idades.

7. Comparar o tempo de vida dos animais suplementados com melatonina desde os 3, 12 e 18 meses de idade em relação aos animais controle.

8. Avaliar se existe uma melhor idade para iniciar a suplementação com melatonina.

9. Avaliar se a melatonina prolonga o tempo de vida dos animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Considerando a necessidade de 15 animais por grupo para atender as demandas de ensaios propostas no estudo e uma morte amostral de aproximadamente 50% dos animais, conforme estudos prévios (Damiani, 2014; Garcez, 2013; Mendonça, 2011), o número total de animais utilizados foi de 240 animais. Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (30 - 40g) com idade inicial de 3 meses. Os animais foram obtidos do Centro de Experimentação (CEA) da UNESC e alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC com o protocolo número 075/2015-1 (Anexo 1) e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Cuidados foram tomados de modo a evitar o mínimo de desconforto e sofrimento para os animais.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

A administração de melatonina ocorreu considerando as diferentes fases da vida: 3 meses: animais jovens; 6 meses: animais adultos; 12 meses: Início da velhice; 18 meses: Velhice tardia (em humanos estas idades seriam aproximadamente de 20, 40, 75 e 110 anos respectivamente) (Couillard-Despres et al., 2009).

Os animais foram randomicamente divididos em 8 grupos com 30 animais cada inicialmente, como descrito a seguir:

Grupo 1: Animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 3 meses de idade e permaneceram recebendo até os 21 meses de idade; Grupo Mel 18 meses;

Grupo 2: Animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 3 meses de idade e permaneceram recebendo até a ocorrência de morte natural;

Grupo 3: Animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 6 meses de idade e permaneceram recebendo até completarem 21 meses de idade; Grupo Mel 15 meses;

Grupo 4: Animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 12 meses de idade e permaneceram recebendo até os 21 meses de idade; Grupo Mel 9 meses;

Grupo 5: Animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 12 meses de idade e permaneceram recebendo até ocorrência de morte natural;

Grupo 6: Animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 18 meses de idade e permaneceram recebendo até os 21 meses; Grupo Mel 3 meses;

Grupo 7: Animais que receberam apenas água com etanol 0,04% até os 21 meses de idade; Grupo controle (Água);

Grupo 8: Animais que receberam apenas água com etanol 0,04% até ocorrência de morte natural.

Abaixo, desenho experimental com os grupos e início do tratamento com melatonina (Figura 6).

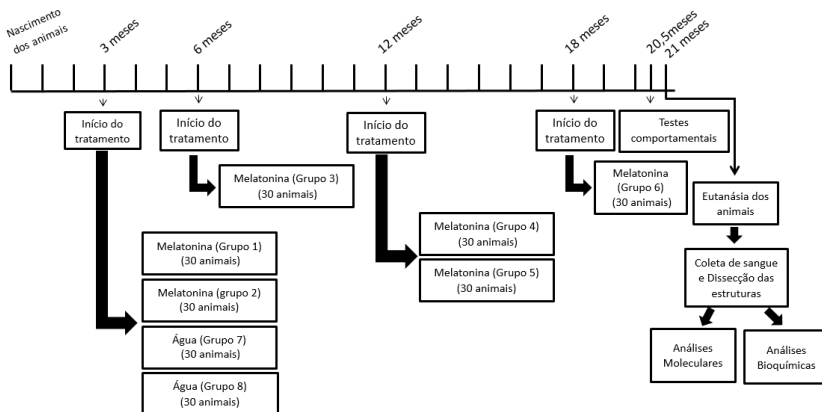


Figura 6: Esquema do desenho experimental: Grupos e início dos tratamentos com melatonina aos 3, 6, 12 e 18 meses de idade dos animais, sendo que todos receberam a suplementação até completarem 21 meses de vida.

Após 21 meses, os grupos 2, 5 e 8 não foram submetidos à eutanásia, pois os mesmos permaneceram recebendo melatonina diariamente até a ocorrência de morte natural. Após a morte, os animais foram conservados

no freezer da universidade, as carcaças armazenadas no saco leitoso foram coletadas e transportadas por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos foram conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DA MELATONINA

A melatonina (Sigma Aldrich, Brazil) na dose de 2 mg/L foi dissolvida em etanol absoluto e adicionada à água potável a uma concentração final de etanol de 0,04% (Anisimov et al., 2003). A solução de melatonina foi preparada no escuro e colocada em garrafas de água protegida da luz sendo trocada por uma solução fresca duas vezes por semana (Corrales et al., 2014).

Como a melatonina é diluída em etanol, os grupos 7 e 8 receberam a mesma dose de etanol (0,04%) que os grupos melatonina, sendo que juntamente ao etanol foi adicionado água potável.

3.4 CONSUMO DE LÍQUIDO E PESO DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados a cada 3 meses ao longo de todo o experimento (18 meses). O líquido era mensurado em cada troca, que ocorriam 2 vezes por semana. O volume de líquido consumido foi quantificado e dividido pelo número de animais por gaiola.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram executados quando os animais atingiram a idade de 20,5 meses, ressaltando que os testes não foram executados todos no mesmo dia, uma vez que poderia ocorrer alteração nos resultados.

3.5.1 Teste comportamental de atividade exploratória: Habituação ao campo aberto

Este teste é utilizado para análise da atividade exploratória e locomotora, bem como a memória de habituação. Embora seja ainda de difícil definição, o termo “atividade exploratória” é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral,

refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade uma vez que esse comportamento frequentemente se correlacionam com outras atividades como a autolimpeza corporal, defesa e reações sexuais.

Os animais foram colocados no aparato de habituação ao campo aberto (Figura 7), que foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma frontal de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 16 quadrados iguais marcados por linhas pretas.

Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia.

A sessão de teste foi realizada 24 horas após a treino na qual se repete o procedimento do treino. Foram medidos os números de “cruzamentos” (crossing) através das linhas pretas e o número de “levantamentos” (rearings) medidos pelas vezes que o animal permanece nas duas patas traseiras, esses parâmetros foram avaliados em ambas as sessões (Vianna et al, 2000).

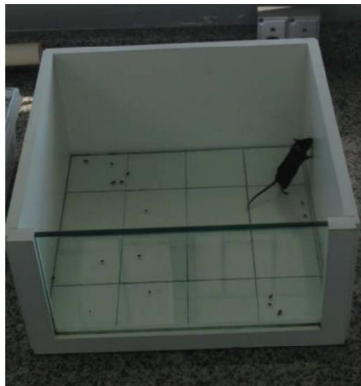


Figura 7: Habituação ao campo aberto

3. 5. 2 Teste comportamental preditivo para ação antidepressiva: suspensão pela cauda

O teste da suspensão pela cauda foi proposto por Stéru et al., (1985) com modificações de Berrocoso et al., (2013). O procedimento consistiu em suspender cada animal pela cauda, com o auxílio de uma fita adesiva colocada a 2 cm da extremidade da cauda, na bancada de experimentos a uma altura de 1,0 m do chão, de maneira tal que o animal permanecesse com a porção ventral do corpo voltada para o observador (Figura 8). Cada animal permaneceu nesta posição durante 6 min, sendo cronometrado o tempo de imobilidade: ausência de movimentos bruscos (o animal pode movimentar levemente a cabeça ou as patas dianteiras, sem que mexesse o corpo) ou ausência total de movimento; e o tempo de movimentação: movimentação difusa: movimentos não repetitivos, em todas as direções possíveis (esquerda, direita, para cima, para trás), ou, movimentação ritmada: movimentação repetitiva, algumas vezes em pêndulo, idêntica para esquerda e para a direita.



Figura 8: Posição do animal durante a realização do teste comportamental de suspensão pela cauda.

3.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao atingirem 21 meses idade, os grupos: 1, 3, 4, 6 e 7 foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina, para coleta de sangue e dissecação do córtex cerebral, hipocampo, estriado, fígado, rim e medula óssea. As amostras foram processadas, aliquotadas e armazenadas em gelo para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

Os grupos 2, 5 e 8 não sofreram eutanásia, pois permaneceram recebendo melatonina diariamente até a ocorrência de morte natural.

3.7 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Para realização dos testes de genotoxicidade, foram utilizadas as seguintes amostras biológicas: sangue, hipocampo, córtex cerebral, estriado, fígado e rim dos camundongos, para ambas as versões do ensaio cometa. A medula óssea, foi utilizada para realização do teste de micronúcleos.

3.7.1 Ensaio cometa alcalino

O ensaio cometa (EC) foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000).

O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de hipocampo, córtex cerebral, fígado e rim, foram dissecadas e imersas em tampão Merchant's refrigerado. Em seguida elas foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5 μL) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25 μL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 μL ou 75 μL , respectivamente). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta posteriormente com uma lamínula e levada, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado Syber Gold (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda considerada 0, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda.

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a

confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.7.1.2 Ensaio Cometa com tratamento enzimático (FPG)

O Ensaio Cometa modificado foi realizado como descrito por Azqueta e Collins (2013). Para a medição de purinas oxidadas, após o período de incubação na lise, as lâminas foram lavadas 3 vezes (5 min a cada vez) com tampão gelado (KCl 0,1 M, Na₂EDTA 0,5 mM, HEPES 40 mM, BSA 0,2 mg/mL, pH 8,0) e incubadas durante 40 min a 37°C com FPG (formamino pirimidina glicosilase) (na diluição recomendada pelo fabricante) ou tampão. As etapas seguintes foram realizadas de acordo com a versão alcalina do Ensaio Cometa, descrita no item anterior. Os parâmetros índice e frequência de danos foram os parâmetros de dano do DNA avaliado para descrever a formação de cometas. Os sítios sensíveis à FPG foram calculados através da diferença entre o valor obtido para ID e FD na cauda dos núcleos tratados com tampão e do valor obtido para ID e FD dos núcleos tratados com FPG.

3.7.2 Teste de Micronúcleos (MN)

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Mavournin et al., 1990; Krishna e Hayashi, 2000).

Após a extração da medula óssea, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas.

Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 200 eritrócitos/animal.

A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 2000 EPCs e ENCs para cada animal (ou seja, 1000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

3.8 NÍVEIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em tampão PBS. A quantificação das proteínas, APE1, OGG1 (relacionadas com sistema de reparo no DNA), HO-1 e NQO-1 (relacionadas com o dano oxidativo), 4-HNE (relacionada com a oxidação de lipídeos) e NLP3 (relacionada com a inflamação), foram mensuradas por Western blotting.

Para tanto, as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, SDS pH 6,8, 1%, glicerol 10%) e posteriormente as concentrações proteicas foram analisadas pelo método de Bradford (1976), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína, sendo utilizado 30 µg de proteínas para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 8-12%. As proteínas foram separadas, e em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v) e SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada.

Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução bloqueadora (3% albumina) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As membranas foram processadas por imuno-deteção utilizando os anticorpos primários específicos. Após os anticorpos primários serem removidos, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários. Por fim, as membranas foram reveladas por quimiluminescência.

Após a exposição, as membranas foram então retiradas e incubadas com um anticorpo monoclonal de ratos para β -Actina e os filmes autorradiográficos analisados e quantificados através de um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de habituação ao campo aberto foi analisado pelo teste análise de variância (ANOVA) de uma via para comparação entre os grupos. Foi utilizado também o teste *t* de *Student* comparando a sessão treino e teste, dentro de cada tempo de suplementação, sendo os dados representados como média \pm erro padrão da média.

O teste de suspensão pela cauda foi analisado pelo teste análise de variância (ANOVA) de uma via, quando ANOVA demonstrava diferença significativa ($P < 0,05$), análises *post hoc* foram realizadas com o teste de Duncan, os dados são representados como média \pm desvio padrão da média.

Para os ensaios genotóxicos e bioquímicos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. A normalidade das variáveis foi avaliada utilizando o teste de Bartlett's e analisadas estatisticamente pelo teste de ANOVA de uma via. Quando ANOVA, apresentou diferença significativa análises *post hoc* foram realizadas utilizando o teste de Tukey. Sendo que nos ensaios bioquímicos o *post hoc* utilizado quando ANOVA apresentou diferença significativa foi Dunnet.

Para verificar a possível associação entre o tempo de suplementação com melatonina e os danos ao DNA, realizou-se o teste de correlação de Pearson, uma vez que os dados destas variáveis apresentaram-se normais.

As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de P forem menores que 0,05 ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

Para a curva de sobrevivência foi realizado o teste de "Log-rank (Mantel-Cox).

4 RESULTADOS

4.1 CONSUMO DE LÍQUIDO E PESO DOS ANIMAIS

Durante os 18 meses de tratamento foram medidas as quantidades de líquido ingeridas pelos animais. A tabela 1, mostra a ingestão de água ou melatonina por animal e por grupo.

Tabela 1: Ingestão de água ou melatonina (2mg/L) em mL, por camundongo, medida duas vezes por semana, durante 18, 15, 9 e 3 meses de tratamento, até os animais completarem 21 meses de vida

	Controle (Água)	Melatonina 18 meses	Melatonina 15 meses	Melatonina 9 meses	Melatonina 3 meses
Consumo por grupo (mL)	37,4 ± 13,2	36,4 ± 12,5	36,9 ± 13,3	37,5 ± 13,4	34,5 ± 9,3
Consumo por animal (mL)	10,4 ± 2,9	10,2 ± 2,9	10,2 ± 3,2	10,6 ± 3,1	9,8 ± 1,9

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do volume de líquido ingerido por dia de troca. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Os resultados demonstram que não foram encontradas diferenças significativas no consumo de líquido entre os grupos que receberam melatonina em diversas fases da vida (início aos 3 meses, receberam por 18 meses; início aos 6 meses, receberam por 15 meses; início aos 12 meses, receberam por 9 meses e início aos 18 meses, receberam por 3 meses) ou água. O consumo médio de líquidos entre os grupos foi de 36,54 mL.

Na tabela 2, observa-se a ingestão de líquido pelos animais que iniciaram o consumo de melatonina aos 3 e 12 meses e permaneceram recebendo esta suplementação até a morte natural.

Tabela 2: Ingestão líquido em mL pelos grupos que iniciaram o consumo de melatonina (2mg /L) aos 3 e 12 meses, medida 2 vezes por semana até a ocorrência da morte natural dos animais.

	Controle (Água)	Início Melatonina 3 meses	Início Melatonina 12 meses
Consumo por grupo (mL)	41,75 ± 22,88	40,59 ± 34,02	45,8 ± 23,9
Consumo por animal (mL)	11,20 ± 6,8	10,00 ± 5,58	12,39 ± 4,99

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do volume de líquido ingerido por dia de troca. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Durante o tempo de tratamento também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos que consumiram água ou melatonina desde os 3 ou 12 meses de vida até o momento da morte natural.

Em seguida, outro parâmetro avaliado nos animais que receberam melatonina ou água até os 21 meses de vida, e nos que receberam até a morte natural foi o peso, como pode ser observado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Peso dos animais que receberam água ou melatonina (2mg/L) mensurado a cada 3 meses, durante 18, 15, 9 e 3 meses, até os animais completarem 21 meses de vida

	Controle (Água)	Melatonina 18 meses	Melatonina 15 meses	Melatonina 9 meses	Melatonina 3 meses
Peso (g)	48,3 ± 5,5	45,5 ± 5,6	45,1 ± 5,8	49,7 ± 5,6	48,6 ± 6,9

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do peso por animal mesurado a cada 3 meses durante o tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 4: Peso dos animais que iniciaram o consumo de água ou melatonina (2mg/L) aos 3 e 12 meses, até a ocorrência de morte natural

	Controle (Água)	Início Melatonina 3 meses	Início Melatonina 12 meses
Peso (g)	49,3 ± 7,5	45,6 ± 5,7	48,02 ± 6,5

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão da média do peso por animal mesurado a cada 3 meses durante o tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Os resultados encontrados nos grupos que iniciaram suplementação com melatonina em diferentes idades até completarem 21 meses demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos, onde pode-se observar que o peso médio dos animais ficou em 47,44g. Resultados semelhantes foram encontrados nos grupos que iniciaram o consumo deste hormônio aos 3 e 12 meses e continuaram até a ocorrência da morte natural, onde o peso médio encontrado foi de 47,64g.

4.2 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Este estudo buscou avaliar também, o poder da melatonina em prolongar o tempo de vida dos animais. Dois grupos de animais iniciaram o consumo de melatonina em duas diferentes fases da vida. Um iniciou o consumo aos 3 meses, idade onde os animais são considerados jovens, e outro aos 12 meses, idade esta considerada o início da velhice em camundongos, visto que o tempo de vida médio destes animais é de 22 a 24 meses. Na figura 9, pode-se observar a curva de sobrevivência destes animais.

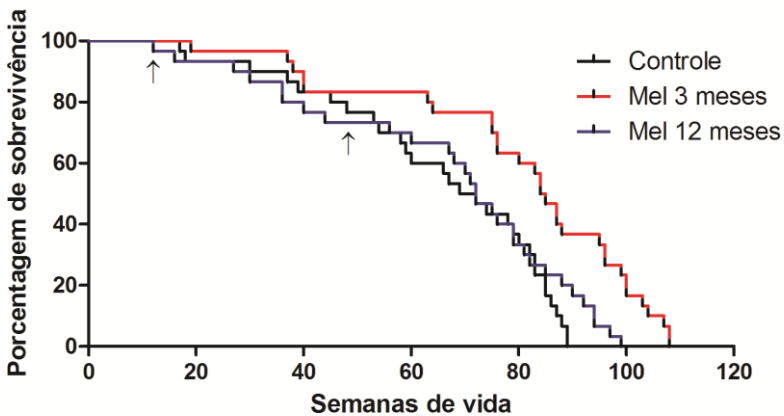


Figura 9: Curva de sobrevivência dos animais que iniciaram o consumo de melatonina em duas diferentes idades (3 e 12 meses). ↑ Início do consumo de melatonina; — Suplementação iniciada aos 3 meses apenas com água + etanol; — Suplementação com melatonina (2mg/L) iniciada aos 3 meses; — Suplementação com melatonina (2mg/L) iniciada aos 12 meses.

Constata-se que o grupo que recebeu apenas água, apresentou um tempo de vida menor quando comparado aos grupos que foram suplementados com melatonina, porém diferiu significativamente apenas do grupo suplementado com melatonina desde os 3 meses de vida. Aos 15 meses de vida (60 semanas) (completados em junho de 2016) o grupo água tinha cerca de 23 animais, após este período deu-se início a um decréscimo contínuo no número de animais neste grupo, sendo que o último animal sobreviveu até os 24 meses (89 semanas) (abril de 2017). Já a suplementação com melatonina iniciada aos 12 meses (48 semanas) (abril de 2016), continha no início do tratamento 23 animais (uma vez que estes

já estavam envelhecendo e recebendo apenas água até atingirem a idade), mesma quantidade que o grupo água no período. No decorrer do tempo de suplementação a morte dos animais foi ficando menos frequente, sendo que este grupo sobreviveu por 26 meses (99 semanas), 2 meses a mais que o grupo que recebia apenas água. Por fim, o grupo que iniciou a suplementação aos 3 meses (12 semanas), idade na qual os animais são considerados jovens, apresentou uma curva de sobrevivência acima dos demais grupos, com diferença significativa em relação ao grupo água e ao grupo que iniciou a suplementação aos 12 meses de vida. Em abril de 2017, quando o último animal do grupo água morreu, o grupo que iniciou a suplementação com melatonina aos 3 meses ainda continha 11 animais. Este grupo ficou recebendo suplementação até agosto de 2017, totalizando 28 meses de vida (108 semanas), 4 meses a mais que o grupo água e 2 a mais que o grupo que iniciou a suplementação aos 12 meses.

4.3 EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA

4.3.1 Habituação ao campo aberto

Considerando que o envelhecimento pode induzir efeitos na memória, utilizou-se o teste de habituação ao campo aberto para avaliar a atividade exploratória dos animais (Figura 10). Para a comparação dos camundongos velhos, que receberam ou não melatonina por diferentes tempos, dois parâmetros foram avaliados, a atividade locomotora, onde foi verificado o número de cruzamentos que o animal realizou a partir do momento em que foi colocado no canto esquerdo superior do aparato (Figura 10A), e a atividade exploratória, que é medida através do número de vezes que o animal se levanta nas patas traseiras (Figura 10B).

Em relação a atividade locomotora, observa-se que os grupos que receberam melatonina desde os 12 e 6 meses, consumindo este hormônio por 9 e 15 meses respectivamente, apresentaram diminuição significativa no número de cruzamentos ($p < 0,05$) em relação à sessão treino, demonstrando memória de habituação, pois reconheceram o ambiente na sessão teste realizada 24 horas após a sessão treino. O grupo que recebeu melatonina desde os 3 meses, consumindo a mesma por 18 meses, teve uma tendência de reconhecimento do ambiente, porém não foi significativo. Já o grupo controle e o que recebeu melatonina por 3 meses, não apresentaram diferença significativa da sessão treino em relação a sessão teste.

Em relação à memória exploratória (Figura 10B), os grupos que receberam melatonina por 9 e 18 meses, apresentaram diferenças significativas em relação a sessão treino ($p < 0,05$), enquanto os demais grupos não, demonstrando o reconhecimento do ambiente em que já estiveram e por isso, explorando menos.

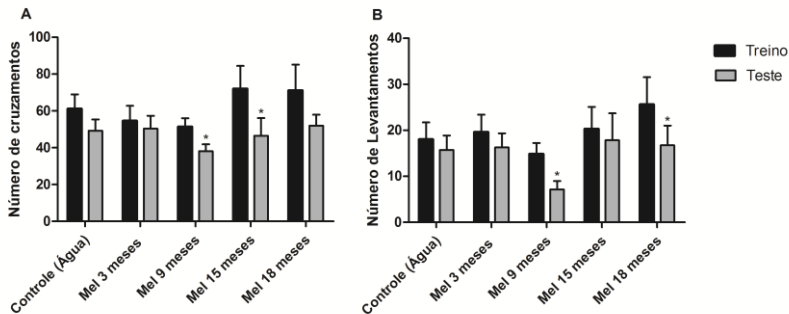


Figura 10: Efeitos do envelhecimento e da suplementação com melatonina (2mg/L) em diferentes idades na habituação ao campo aberto. Número de cruzamentos (atividade locomotora) (A) e a atividade exploratória (número de levantamentos) (B). Em ambas as sessões os animais tiveram 5 min para explorar o ambiente, com 24 horas de intervalo entre o treino e o teste. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 10$ animais por grupo). * valores estatisticamente diferentes da sessão treino com $p < 0,05$; teste t-Student para amostras dependentes. Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

4.3.2 Teste de Suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda foi aplicado para avaliar a atividade antidepressiva da melatonina, uma vez que se viu que com o processo de envelhecimento aumenta a chance de desencadeamento desta doença.

Os resultados deste teste podem ser observados na Figura 11. Os animais velhos que receberam melatonina independente do tempo de suplementação (3, 9, 15 ou 18 meses), apresentaram um tempo de imobilidade significativamente menor em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), demonstrando movimentação difusa e ritmada para tentar se livrar da posição desconfortável que o teste impõe. Já os animais do grupo controle, permaneceram a maior parte do tempo com imobilidade

reduzida ou com ausência total de movimentos, demonstrando comportamento depressivo.

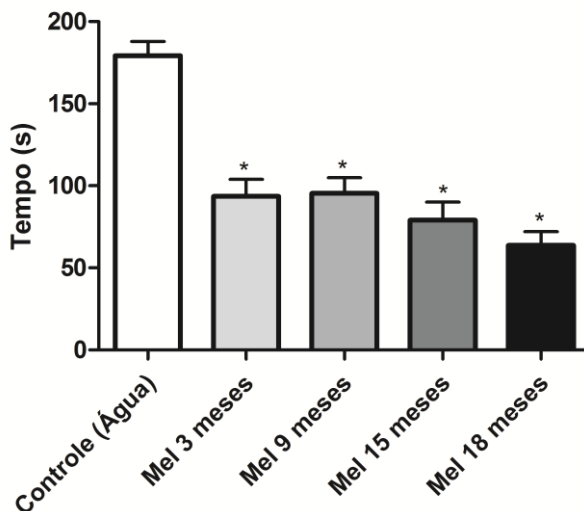


Figura 11: Efeitos do envelhecimento e da suplementação com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida, no parâmetro de imobilidade em camundongos machos velhos submetidos ao teste de suspensão pela cauda. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n= 10 animais por grupo). * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água) com $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguido pelo post hoc de Duncan. Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

4.4 EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE DANOS NO DNA DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA

4.4.1 Ensaio cometa alcalino e oxidativo.

Neste trabalho também foi investigado se o dano em DNA basal dos animais sofreu influência do processo natural de envelhecimento e se o mesmo pode ser alterado pela suplementação com melatonina (2 mg/L).

Foi investigado também se existe uma determinada “melhor” idade para iniciar a suplementação desse hormônio a fim de reduzir ou evitar que esses danos ocorram.

Em relação as estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e estriado), em ambos os parâmetros do ensaio cometa alcalino (ID e FD), observou-se uma redução significativa de danos nos grupos que receberam melatonina em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), indiferente do tempo de consumo da mesma. Ao comparar apenas os grupos que receberam melatonina, porém, com início da suplementação em diferentes fases da vida, observou-se nas três estruturas, que o grupo que iniciou o consumo aos 3 meses e continuou até os 21 apresentou níveis de danos significativamente menores ($p < 0,05$) em relação aos outros três grupos (3, 9 e 15 meses de suplementação). Porém, no córtex (Figura 12A e 13 A), os grupos que receberam melatonina por 9 e 15 meses obtiveram uma redução de danos significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo que recebeu melatonina por 3 meses. Já no estriado, apenas o grupo suplementado por 15 meses demonstrou esta diferença, tanto para ID quanto para FD (Figuras 12C e 13C).

Além disso, o dano oxidativo ao DNA, avaliado através do ensaio cometa modificado com o uso da enzima FPG, também demonstrou redução significativa no ID ($p < 0,05$) nos grupos que foram suplementados com melatonina em relação ao grupo controle em todos os tecidos cerebrais avaliados (Figura 14 e 15). Contudo, no córtex (Figura 14 A, 15A), foi observado redução expressiva de danos oxidativos nos grupos que consumiram melatonina por 9, 15 e 18 meses em relação ao grupo que consumiu por 3 meses. No parâmetro FD, somente o córtex (Figura 15A) apresentou danos significativamente menores ($p < 0,05$) nos grupos suplementados com melatonina em comparação ao grupo controle. Entre os grupos que receberam melatonina não foram encontradas diferenças significativas.

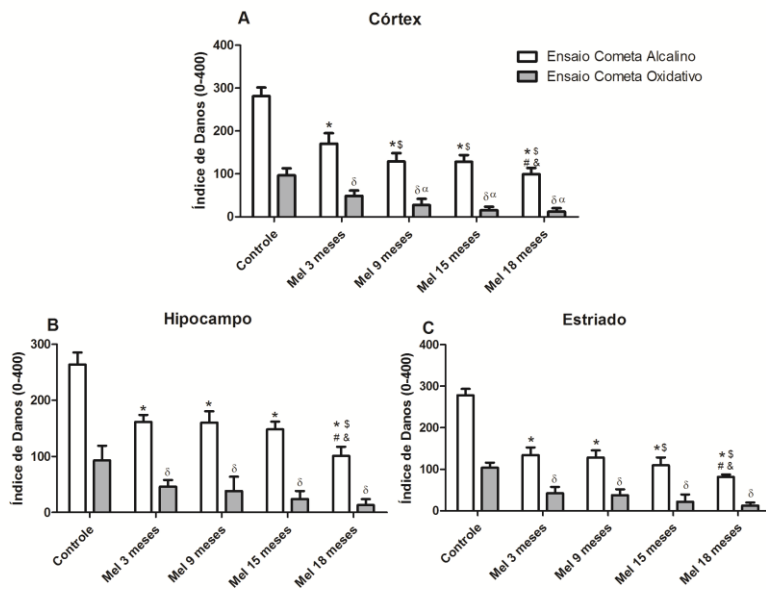


Figura 12: Índice de danos no DNA em células de tecidos cerebrais de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 8 animais por grupo). Diferenças significativas em relação ao ensaio cometa alcalino: *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey); #Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 15 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). [&]Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 9 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). ^{\$}Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 3 meses com $p < 0,005$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). Diferenças significativas em relação ensaio cometa oxidativo: ^δValores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle água com $p < 0,05$, (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey); ^αValores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 3 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

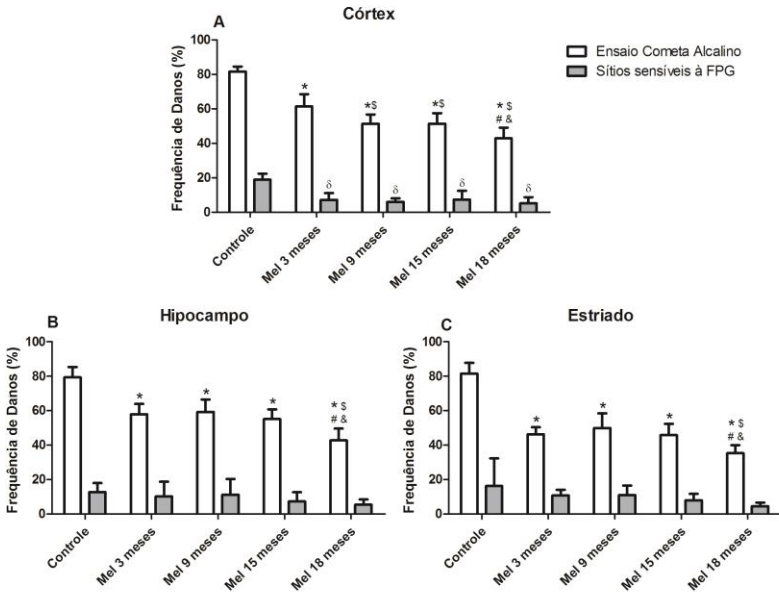


Figura 13: Frequência de danos no DNA em células de tecidos cerebrais de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 8 animais por grupo). Diferenças significativas em relação aos grupos referentes ao ensaio cometa alcalino: *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey); #Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 15 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). &Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 9 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). \$ Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 3 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). Diferenças significativas em relação aos grupos referentes ao ensaio cometa oxidativo: Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle água com $p < 0,005$, (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey); α Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 3 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do post hoc de Tukey). Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida

Neste trabalho além dos tecidos cerebrais, foi investigado também os danos basais nos tecidos periféricos (sangue, fígado e rim) através da versão alcalina do EC (Figuras 14 e 15). Nos três tecidos avaliados observou-se uma redução significativa de danos basais no DNA nos grupos que receberam melatonina em relação ao grupo controle (ID e FD). Analisando apenas os grupos que consumiram melatonina, constata-se que o grupo que a recebeu por 18 meses (grupo este que iniciou o consumo aos 3 meses de vida), demonstrou redução significativa ($p < 0,05$) de danos tanto em ID quanto em FD em relação aos demais grupos nos três tecidos analisados, com exceção do fígado cuja diferença foi observada apenas entre os grupos suplementados por 3 e 9 meses (Figuras 14B e 15B). Além disso, ainda percebeu-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de danos no fígado (Figuras 14B e 15B) e rim (Figuras 14C e 15C) dos animais suplementados com melatonina por 15 meses em relação aos que receberam este hormônio por 3 meses, diferença esta observada em ID e FD.

Em relação aos danos oxidativos visualizados através do Ensaio Cometa com uso da enzima FPG, no ID dos três tecidos periféricos estudados, o grupo controle (água) apresentou danos oxidativos significativamente ($p < 0,05$) maiores em relação a todos os grupos que receberam melatonina, independente da fase de início, com exceção do fígado, que mostrou redução de danos apenas nos grupos 15 e 18 meses (Figura 14B). Na FD, apenas o rim apresentou redução significativa de danos nos grupos que ingeriram melatonina por 9, 15 e 18 meses em comparação ao grupo controle (Figura 15C).

Em relação as comparações apenas entre os grupos que receberam melatonina, pode-se constatar uma redução significativa ($p < 0,05$) de danos oxidativos no grupo suplementado por 18 meses em relação ao suplementado por apenas 3 meses no sangue periférico, no parâmetro de ID (Figura 15A). Nos demais tecidos e na FD não foram observadas diferenças significativas (Figuras 14 e 15).

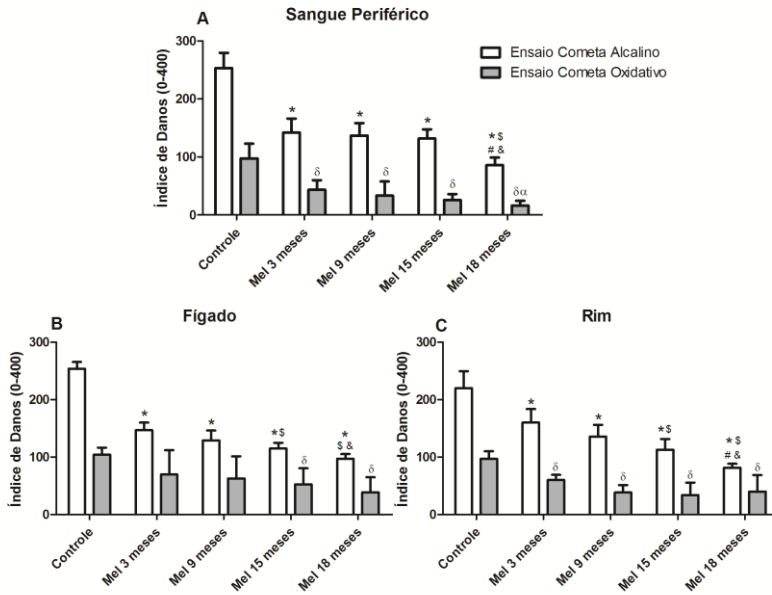


Figura 14: Índice de danos no DNA em células de tecidos periféricos de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 8 animais por grupo). Diferenças significativas em relação aos grupos referentes aos parâmetros do ensaio cometa alcalino: * Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey); # Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 15 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey). & Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 9 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey). \$ Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 3 meses com $p < 0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey). Diferenças significativas em relação aos grupos referentes ao ensaio cometa oxidativo: δ Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle água com $p < 0,05$, (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey); Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

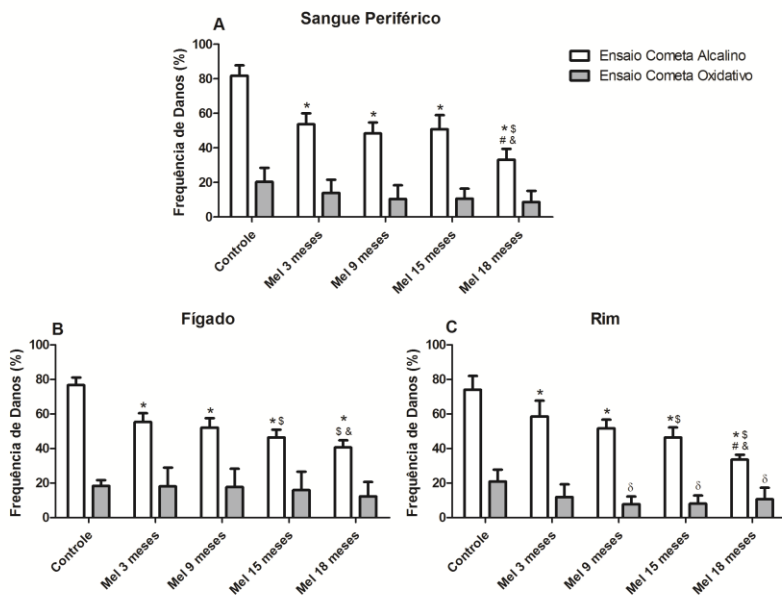


Figura 15: Frequência de danos no DNA em células de tecidos periféricos de camundongos, suplementados ou não com melatonina (2mg/L) em diferentes fases da vida. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=8$ animais por grupo). Diferenças significativas em relação aos grupos referentes aos parâmetros do ensaio cometa alcalino: *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), com $p<0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey); # Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 15 meses com $p<0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey). &Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 9 meses com $p<0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey). § Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo suplementado com melatonina por 3 meses com $p<0,05$ (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey). Diferenças significativas em relação aos grupos referentes ao ensaio cometa oxidativo: δ Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle água com $p<0,05$, (ANOVA, seguido do *post hoc* de Tukey); Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

Com o intuito de verificar se os resultados obtidos a partir do ensaio cometa, tanto alcalino quanto oxidativo, estavam associados à suplementação com melatonina, foi aplicado o teste de correlação de Pearson (Figuras 16 e 17).

No ensaio cometa alcalino (Figuras 16 e 17), no parâmetro de ID, em todos os tecidos avaliados, tanto cerebrais quanto periféricos, observou-se que o tempo de suplementação com melatonina está significativamente associado a menores danos no DNA, com exceção do hipocampo (Figura 16B) e do sangue periférico (Figura 16D), onde não foi observada esta associação (Figura 16). Em relação a frequência de danos apenas o fígado (Figura 17E) e o rim (Figura 17F) demonstraram esta correlação.

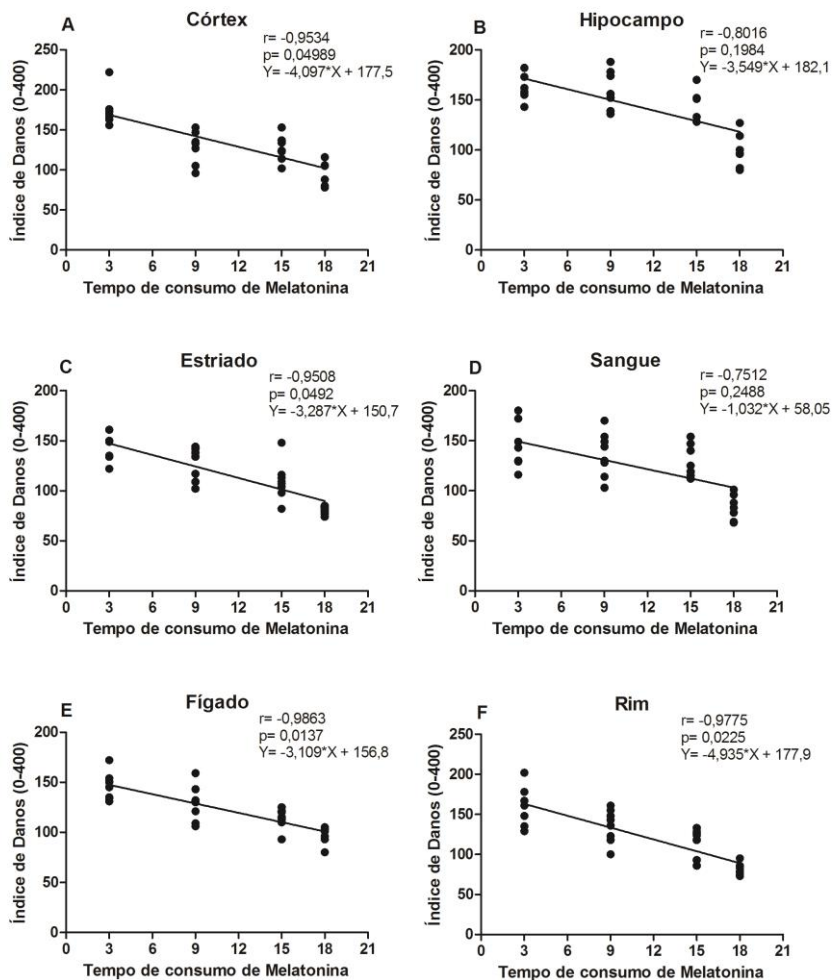


Figura 16: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos basais no DNA medidos pelo parâmetro de índice de danos.

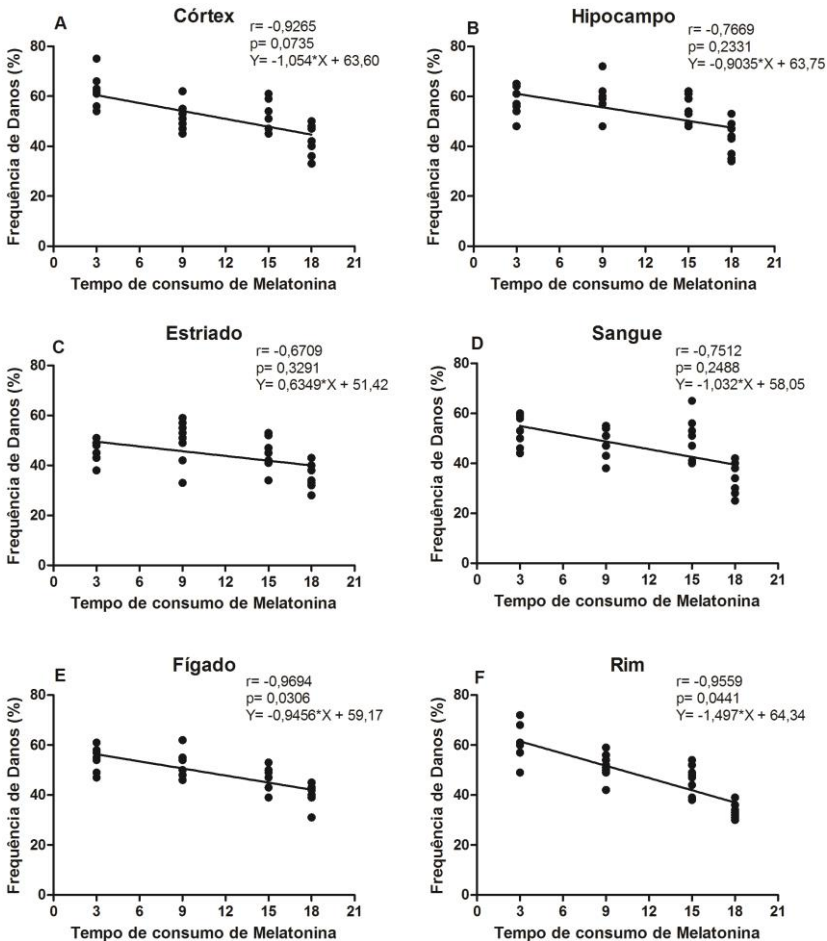


Figura 17: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos basais no DNA medidos pelo parâmetro de frequência de danos.

No ensaio cometa modificado que avalia os sítios sensíveis à enzima FPG, isto é, purinas oxidadas, todos os tecidos analisados no ID apresentaram uma forte correlação com o tempo de suplementação com melatonina, ou seja, quanto maior o tempo de suplementação, menores os danos oxidativos ocasionados na molécula de DNA (Figura 18). Na FD

nenhum dos tecidos utilizados apresentou correlação significativa (Figura 19).

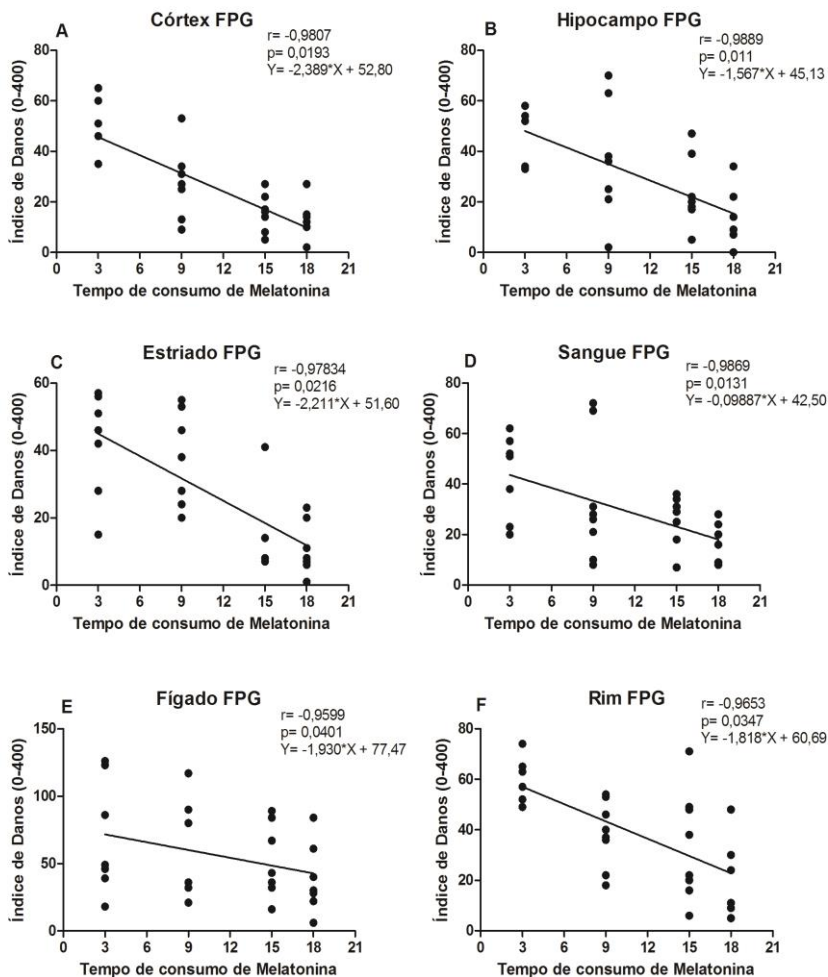


Figura 18: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos oxidativos no DNA medidos pelo parâmetro de índice de danos.

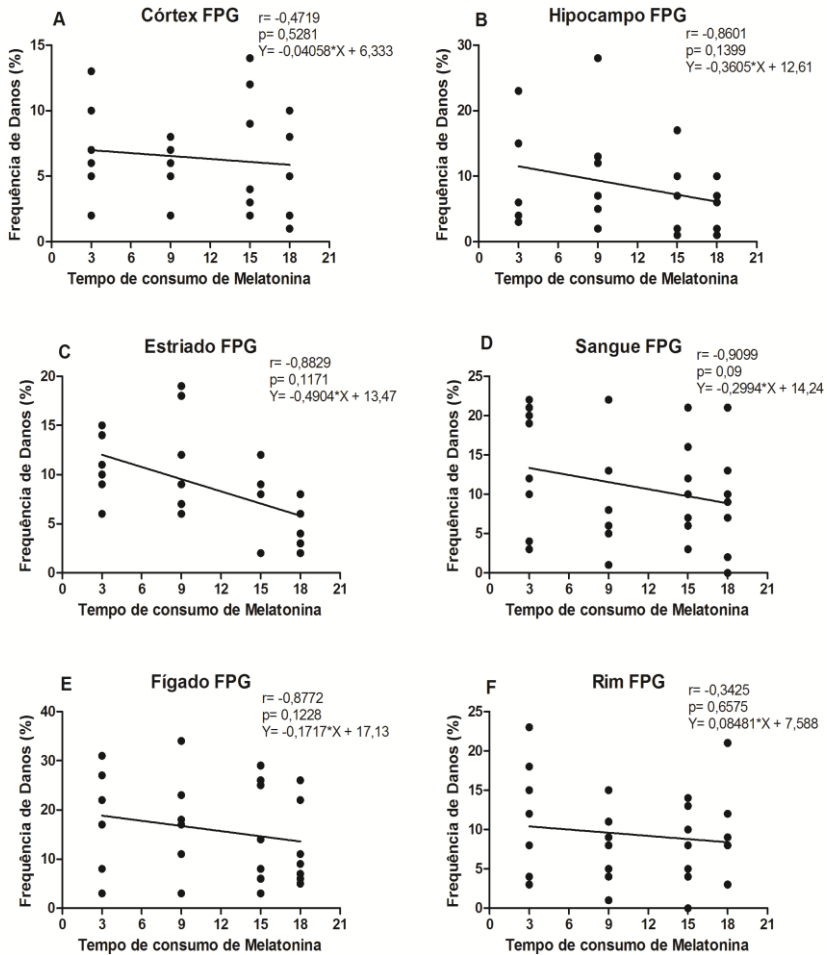


Figura 19: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus danos oxidativos no DNA medidos pelo parâmetro de frequência de danos.

4.4.2 Teste de Micronúcleos

O teste de micronúcleos avaliou se a suplementação com melatonina é capaz de reverter os efeitos mutagênicos induzidos pelo envelhecimento. A tabela 5, apresenta os resultados encontrados neste teste.

Tabela 5: Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (ENCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos Swiss machos velhos, suplementados ou não com melatonina por diferentes períodos de tempo. Foram analisadas 2000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média \pm desvio padrão da média.

Tratamento	EPCMn	ENCMn	EPC/ENC
Controle (água)	14,63 \pm 2,56	9,88 \pm 2,42	0,58 \pm 0,03
Melatonina 3 meses	6,13 \pm 1,89*	3,63 \pm 1,06*	0,56 \pm 0,04
Melatonina 9 meses	4,5 \pm 1,41*	2,63 \pm 1,19*	0,57 \pm 0,06
Melatonina 15 meses	3,5 \pm 1,69*	1,75 \pm 1,04*	0,58 \pm 0,03
Melatonina 18 meses	2,88 \pm 1,73* #	1,5 \pm 0,76*	0,58 \pm 0,02

* Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (água) ($p < 0,05$; teste Anova de uma via, seguido do *post hoc* de Tukey).

Valores estatisticamente diferentes do grupo que recebeu melatonina por 3 meses ($p < 0,05$; teste Anova de uma via, seguido do *post hoc* de Tukey).

Observa-se no teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos que, os animais que receberam apenas água com etanol durante o processo de envelhecimento tiveram aumentos significativos ($p < 0,05$) de micronúcleos, nos dois tipos celulares avaliados (EPC e ENC), em relação aos grupos que receberam melatonina, independentemente da idade do início da suplementação (tabela 5),

Além disso, quando comparados apenas os grupos que ingeriram melatonina, observou-se uma redução significativa de micronúcleos ($p < 0,05$), tanto em EPC quanto em ENC, no grupo que iniciou o consumo quando jovem (18 meses de suplementação), quando comparado ao grupo que iniciou a suplementação já na velhice tardia (3 meses de suplementação) (Tabela 5).

Em relação a proporção de EPC/ENC (Tabela 5), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, demonstrando que a produção de eritrócitos está ocorrendo normalmente na medula óssea, sem indícios de citotoxicidade.

Por fim, foram aplicados testes para analisar uma possível associação entre os tempos de suplementação com melatonina *versus* a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos e normocromáticos. Dessa forma, os testes representados pela Figura 20, revelam uma associação direta entre o aumento do tempo de suplementação e a diminuição de micronúcleos nos eritrócitos.

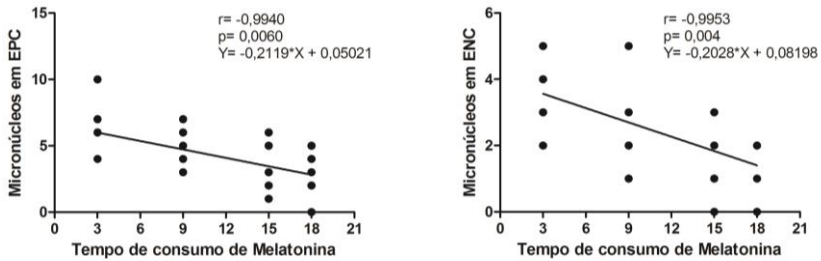


Figura 20: Representações gráficas da correlação de Pearson e regressão linear entre o tempo de suplementação com melatonina (2mg/L) versus o número de micronúcleos em EPC (eritrócitos policromáticos) ou ENC (eritrócitos normocromáticos).

4.5 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE APE1 E OGG1 EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA

No presente trabalho, também foi analisado os níveis de OGG1 e APE 1, enzimas chaves relacionadas com o reparo por excisão de base no DNA. Foram detectados níveis significativamente aumentados ($p < 0,05$) de ambas as enzimas no grupo que recebeu melatonina desde a idade jovem, ou seja, foi suplementado por 18 meses, em relação ao grupo que recebeu apenas água durante o período (Figura 21). Os demais grupos não demonstraram diferenças significativas.

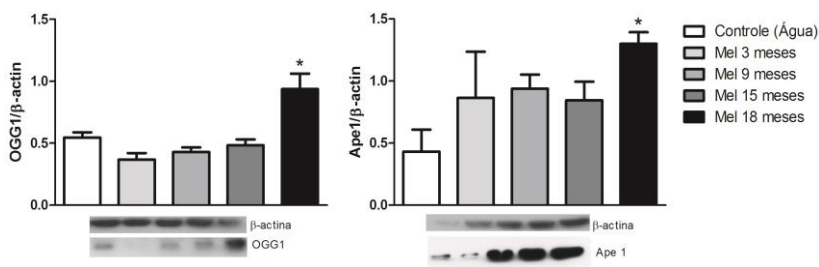


Figura 21: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de OGG1 e APE 1 no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=4$ animais por grupo). *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), $p < 0,05$, ANOVA seguido do post hoc de Dunnett. Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

4.6 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE MARCADORES OXIDATIVOS EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA

Em relação aos níveis de parâmetros oxidativos mensurados através das proteínas HO-1 e NQO-1, observou-se um aumento significativo nos níveis das mesmas no grupo suplementado com melatonina por 18 meses em relação ao grupo controle, demonstrando que a suplementação de melatonina auxiliou na modulação destes marcadores (Figura 22).

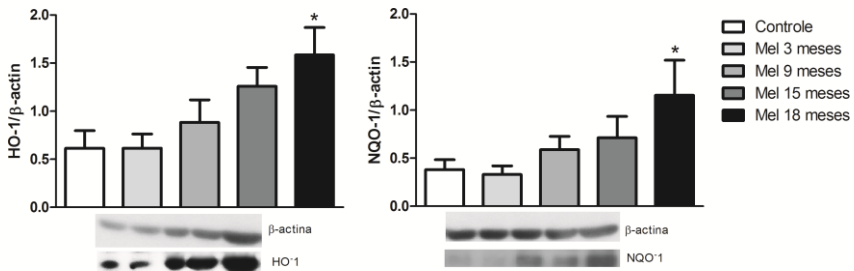


Figura 22: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de HO-1 e NQO-1 no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão (n=4 animais por grupo). *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), $p < 0,05$, ANOVA, seguido do post hoc de Dunnett. Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

4.7 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE OS NÍVEIS DE 4-HNE E NLRP3 EM HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUPLEMENTADOS COM MELATONINA EM DIFERENTES FASES DA VIDA

Em relação ao 4-HNE, que foi utilizado por ser um marcador de dano lipídico, observou-se que a suplementação com melatonina, independente do tempo de suplementação, foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) os níveis deste marcador em relação ao grupo controle (Figura 23).

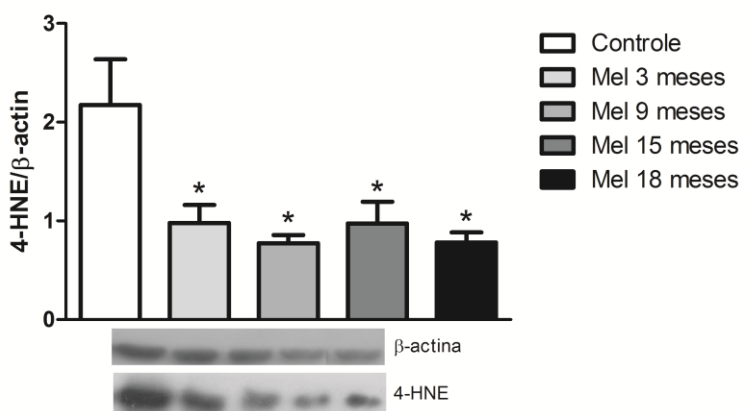


Figura 23: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de 4-HNE no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=4$ animais por grupo). *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), $p < 0,005$, ANOVA, seguido do post hoc de Dunnett. Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

Com o processo de envelhecimento ocorre a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio que podem levar a ativação de várias vias metabólicas, dentre elas a do NLRP3, assim, procurou-se avaliar a ação da melatonina nesta proteína durante o envelhecimento. Foi observado nível significativamente maiores ($p < 0,05$) desta proteína no grupo que

não recebeu melatonina em relação ao grupo suplementado desde os 6 meses de vida até os 21 meses, totalizando 15 meses de suplementação. O grupo que recebeu por 18 meses apresentou uma diminuição nos níveis desta proteína, porém não significativa (Figura 24).

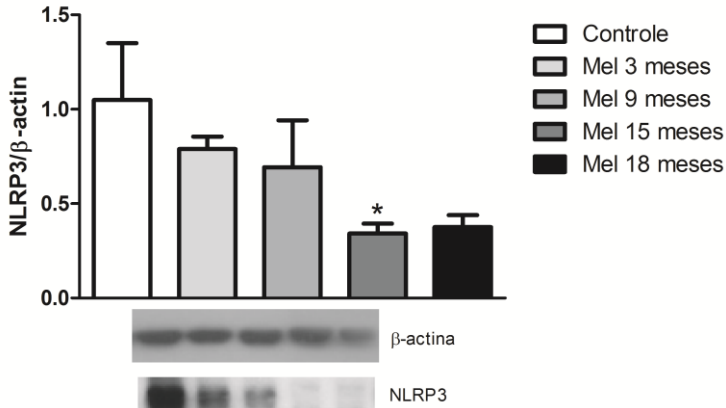


Figura 24: Efeitos do envelhecimento e da melatonina sobre os níveis de NLRP3 no hipocampo de animais suplementados em diferentes idades até o envelhecimento. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=4$ animais por grupo). *Valores estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (água), $p<0,05$, ANOVA, seguido do post hoc de Dunnett. Mel 3 meses: animais que receberam melatonina por 3 meses, dos 18 aos 21 meses de vida; Mel 9 meses: animais que receberam melatonina por 9 meses, dos 12 aos 21 meses de vida; Mel 15 meses: animais que receberam melatonina por 15 meses, dos 6 aos 21 meses e, Mel 18 meses: animais que receberam melatonina por 18 meses, dos 3 aos 21 meses de vida.

5 DISCUSSÃO

O aumento da expectativa de vida da população vem acarretando em um aumento significativo na proporção de indivíduos idosos no Brasil e no mundo. Devido a esse aumento do envelhecimento populacional, surgem preocupações em busca de novas estratégias para que o indivíduo tenha uma longevidade com maior qualidade de vida. (Sanderson e Scherbov, 2015). A qualidade de vida no envelhecimento depende de fatores moleculares, celulares, sistêmicos, comportamentais, cognitivos e sociais. Estes fatores por sua vez, interagem e regulam tanto o funcionamento típico quanto atípico do indivíduo que envelhece (Hara et al., 2014). Diante disso, pesquisas têm demonstrado que o uso de agentes antioxidantes podem contribuir contra os efeitos nocivos ocasionados às macromoléculas durante o envelhecimento (Blumberg et al., 2017; Burke, 2017; Kelly et al., 2017). Neste cenário, estudos recentes sobre o hormônio melatonina, um potente antioxidante, vêm despertando um grande interesse da comunidade científica nos últimos anos, uma vez que a perda fisiológica gradual de melatonina pode estar envolvida com os agravos celulares que ocorrem durante o envelhecimento.

No presente trabalho, camundongos swiss machos foram suplementados com uma dose baixa de melatonina, de forma crônica, em diferentes fases da vida e permaneceram recebendo este hormônio até completarem 21 meses de vida. A partir disso, foram realizadas avaliações referentes às alterações em parâmetros comportamentais, genéticos e bioquímicos destes animais, assim como observado o poder da melatonina em prolongar o tempo de vida dos mesmos.

Durante os 18 meses de tratamento, foram mensuradas as quantidades de líquidos ingeridas pelos animais e os resultados mostraram que não foram encontradas diferenças significativas quando comparada a ingestão média de líquidos entre os grupos que receberam água ou melatonina. De fato, estudos na literatura demonstram que a ingestão de líquidos no dia-a-dia não sofre alterações com o envelhecimento (Hodgkinson et al., 2003; Mckinley et al., 2006). Damiani et al. (2017) observaram que animais velhos (13-16 meses) consomem em média 11,04 mL de água por dia, resultado semelhante aos presentes achados, onde a média diária de consumo de líquidos de todos animais foi de 10 mL, independente da idade e do tempo de suplementação de melatonina. Por outro lado, se fossemos comparar o consumo de líquido entre animais jovens, e animais velhos, provavelmente existiriam diferenças, uma vez que a média de consumo de líquidos em animais jovens é de 13-14 mL/dia (Begg et al., 2012; Damiani et al., 2017). Tal redução na ingestão de água em animais

velhos pode estar relacionada com as alterações no controle hídrico dependente da idade, tornando os animais velhos mais vulneráveis à desidratação (Mentes, 2006; Begg et al., 2012).

Em relação ao peso dos animais, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Isso revela que independente do tempo de suplementação, os animais mantiveram peso adequado conforme a idade, o que sugere que a suplementação com melatonina não é um fator que interfere no peso dos animais durante o envelhecimento. Resultados semelhantes foram apontados por outros autores, onde foi constatado que o peso dos animais permaneceu similar no decorrer do processo de envelhecimento (Mckinley et al., 2006) e que a melatonina não alterou este parâmetro (Anisimov et al., 2003). No entanto, o mesmo autor em um trabalho anterior (Anisimov et al., 2001), observou um aumento no peso corporal de camundongos velhos (15 e 18 meses) suplementados com 20 mg/L de melatonina. Este efeito pode estar relacionado à alta dose deste hormônio, o qual pode levar a um efeito sedativo, deixando os animais fadigados e com atividade locomotora reduzida contribuindo para o aumento do peso corporal.

Estudos anteriores já demonstraram que a suplementação com melatonina em diferentes modelos animais, tais como camundongos (Pierpaoli e Regelson, 1994), ratos (Oakin-Bendahan et al., 1995), moscas da fruta (Bonilla et al., 2002) e planárias (Thomas e Smith-Sonneborn, 1997), pode prolongar o tempo de vida. Essas observações foram também encontradas no presente trabalho. Os resultados revelam uma maior sobrevivência dos animais que receberam melatonina, desde a idade jovem, quanto nos animais que iniciaram a suplementação no início da velhice, apresentando uma sobrevida de 15% e 8%, respectivamente a mais que os animais que consumiram apenas água durante toda a vida. Anisimov et al. (2003) também observaram um aumento na sobrevida de animais que receberam melatonina, apesar de utilizarem um protocolo de suplementação diferente do presente estudo. Estes autores mostraram que os animais que receberam melatonina, na mesma dose usada no presente estudo, sobreviveram por 29 meses e o grupo controle por 25,4 meses, totalizando 10% de sobrevida em relação aos animais que não receberam este hormônio.

O aumento na sobrevida dos animais pode ser ocasionado pelo fato da melatonina apresentar diversas características fisiológicas importantes, dentre elas, ser um poderoso antioxidante (Güney et al., 2013), ter ação anti-inflamatória (Pandi-Perumal et al. 2006), neuroprotetora (Marangoz et al., 2017), auxiliar na melhora do sistema imunológico e cardiovascular (Radogna et al. 2010). Estes fatores, tomados em conjunto, podem evitar

que o organismo fique mais vulnerável a ação dos agentes químicos, físicos e biológicos o qual está exposto diariamente durante a vida, uma vez que os níveis de melatonina tendem a diminuir com a avanço da idade (Marangoz et al., 2017).

No decorrer do processo de envelhecimento, o SNC, responsável pelas sensações, movimentos, funções psíquicas e pelas funções biológicas internas acaba sendo afetado (Childs et al., 2017). Com o avanço da idade, este sistema apresenta alterações como redução no número de neurônios, redução na velocidade de condução nervosa, redução da intensidade dos reflexos, restrição das respostas motoras, do poder de reações e da capacidade de coordenações (De Vitta, 2000). Desta forma, no presente trabalho foram realizados testes comportamentais a fim de analisar os efeitos da melatonina sobre a memória e locomoção.

Inicialmente, utilizou-se o teste de habituação ao campo aberto para avaliar a memória de habituação ao campo aberto dos animais, uma vez que com o avanço da idade ocorre um comprometimento cognitivo (Trofimiuk et al., 2017). A suplementação com melatonina por 9 e 15 meses diminuiu a atividade locomotora dos animais e reduziu a atividade exploratória dos suplementados por 9 e 18 meses, diferenças estas observadas em relação a sessão treino, demonstrando que os animais reconheceram o ambiente que já haviam explorado. De forma semelhante, Haridas et al. (2013) avaliaram a ação benéfica do tratamento crônico com melatonina em animais com complicações comportamentais induzidas pelo estresse leve crônico, e observaram que a suplementação com melatonina (10 mg/kg) reduziu a atividade locomotora e exploratória dos animais no teste de habituação ao campo aberto, demonstrando que reconheceram o ambiente já explorado na sessão teste, preservando assim a memória.

O envelhecimento e suas consequências também podem ser fatores de risco para o desenvolvimento da depressão, no entanto, estudos comprovam que o tratamento crônico com melatonina exerce efeitos antidepressivos (Mantovani et al., 2003; Pandi-Perumal et al., 2006; Detanico et al., 2009;). Desta forma, no presente trabalho, foi avaliado a eficácia da suplementação crônica da melatonina sobre o comportamento tipo depressivo dos animais. Foi possível observar que os animais suplementados com melatonina, independentemente do tempo, apresentaram efeitos antidepressivos quando comparados aos que receberam apenas água durante toda a vida. Da mesma forma, outros estudos têm demonstrado a ação antidepressiva da melatonina em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (Prakhie et al., 1998; Mantovani et al., 2003) e em ratos submetidos ao teste de nado

forçado (Micale et al., 2006) em dois modelos preditivos frequentemente utilizados para avaliar depressão (Cyran et al., 2005).

Dados da literatura afirmam que o efeito da melatonina no teste de suspensão pela cauda é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com o sistema dopaminérgico, através da ativação dos receptores de dopamina D1 e D2. Considerando que o sistema dopaminérgico esteja envolvido na depressão e que os compostos que melhoram a neurotransmissão dopaminérgica são usados para tratá-la (Ascher et al., 1995; Papakostas, 2006), estudos indicam que a melatonina exerce efeitos sinérgicos com agonistas dopaminérgicos, corroborando com a ideia de que esse neurohormônio exerce propriedades antidepressivas (Binfaré et al., 2010; Nie et al., 2017).

Além de alterações no SNC, o processo de envelhecimento ocasiona a desregulação gênica associada a perda da integridade do genoma, levando a aumento de danos ao DNA. Afim de verificar se o dano em DNA basal gerado pela idade, pode ser minimizado com a suplementação com melatonina, utilizou-se o ensaio cometa em duas versões, em tecidos cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) e periféricos (leucócitos de sangue periférico, fígado e rim) de animais que receberam este hormônio em diferentes fases da vida e permaneceram consumindo até o envelhecimento.

O ensaio cometa, também chamado de eletroforese em gel de célula única (single cell gel electrophoresis, SCGE) é um teste visual e quantitativo para medir danos ao DNA de células eucarióticas individuais (Burlinson et al., 2007). Este teste pode ser aplicado para detecção de quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína (Singh, 1988; Farbain et al., 1995). Adicionando DNA glicosilases à versão clássica deste ensaio, é possível medir danos de DNA específicos, como bases oxidadas. A enzima mais comumente utilizada é a FPG, que detecta purinas oxidadas, dentre elas a 8-oxoguanina, uma das lesões de DNA mais comuns resultantes do ataque de ERO, sendo um importante biomarcador de estresse oxidativo (Danielsen et al., 2008). Assim, a incubação com esta enzima específica permite uma estimativa dos níveis de dano oxidativo em DNA (Azqueta et al., 2009).

Danos ao DNA são comuns no decorrer da vida, desta forma sabe-se que animais jovens apresentam danos basais menores em relação a animais velhos. Prévios estudos conduzidos em nosso laboratório têm demonstrado que animais jovens saudáveis apresentam baixos níveis de danos no DNA em tecidos cerebrais e periféricos, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tecido	Índice de Danos (ID)	Frequência de Danos (FD)	Referência
Córtex	20,33 ± 22,96	8,44 ± 7,32	Leffa et al., 2014b
	66,14 ± 7,63	34,83 ± 7,00	Galvani et al., 2017
	44,0 ± 6,39	15,8 ± 2,64	Cardoso et al., 2014
Hipocampo	22,25 ± 6,6	10,25 ± 2,2	Damiani et al., 2017
	52 ± 9,2	21,0 ± 3,4	Ramos et al., 2012
	25,3 ± 7,2	9, 8± 5,3	Leffa et al., 2014b
Estriado	68,67 ± 10, 31	36,17 ± 3,19	Galvani et al., 2017
Sangue periférico	3,5 ± 2,6	2,5 ± 1,5	Damiani et al., 2017
	3,62 ± 2,29	3,38 ± 2,10	Leffa et al., 2014a
	13,0 ± 4,6	9,66 ± 2,5	Fagundes et al., 2017
Fígado	18,27 ± 3,58	11,45 ± 2,73	Leffa et al., 2014a
	61,5 ± 6,19	24,33 ± 3,5	Galvani et al., 2017
	23,1 ± 3,6	16 ± 3,5	Leffa et al., 2016
Rim	46,20 ± 16,88	18,10 ± 4,79	Leffa et al., 2014a
	45,83 ± 11,07	18,67 ± 4,31	Galvani et al., 2017
	24,1 ± 3,1	18,1 ± 2,4	Leffa et al., 2016

Tabela 6: Resultados de trabalhos do grupo de pesquisa em genética toxicológica da UNESC, utilizando animais jovens, demonstrando os valores basais de índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) em diferentes tecidos cerebrais e periféricos (FD).

Comparando os valores do presente estudo, com os demonstrados na tabela acima, podemos observar que os animais velhos apresentaram uma maior incidência de danos no DNA em todos os tecidos analisados, aumento este, decorrente do processo de envelhecimento. Resultados semelhantes na literatura em relação aos danos causados pelo envelhecimento são citados por outros autores (Hashimoto et al., 2007; Heuser et al., 2008; Damiani et al., 2017; Vilela et al., 2017). Todos estes trabalhos mostram um aumento significativo de danos no DNA em diferentes tecidos de animais velhos quando comparados a jovens, detectados através do ensaio cometa na versão alcalina. Esses resultados, somados aos presentes achados, se devem ao fato de que ocorrem aumentos de danos e mutações relacionadas com a idade, resultando na redução de 50 à 75% da capacidade de reparo nesta fase da vida (Swain et al., 2011). No entanto, a suplementação com melatonina, independente

da fase de início, reduziu significativamente os danos em todos os tecidos avaliados no presente estudo, o que representa uma ação antígeno-tóxica deste hormônio. Tais resultados sugerem que a melatonina pode estar auxiliando na prevenção de danos ocasionados pelo envelhecimento, uma vez que, quanto antes iniciou-se a suplementação, menores foram os danos observados. Em concordância com os presentes achados, Erenberk et al. (2013) avaliaram os efeitos protetivos da melatonina (4 mg/kg) durante 10 dias, contra os danos no DNA induzidos por fenitoína sódica. Ao final, concluíram que os danos ao DNA foram reduzidos no grupo que recebeu fenitoína sódica mais melatonina levando a acreditar que a melatonina após ser metabolizada consegue desempenhar função antígeno-tóxica.

Ainda, afim de verificar os efeitos benéficos da melatonina no envelhecimento, Taruma et al. (2016), suplementaram ratas de 11 meses de vida com melatonina (100 µg/mL) por 10 semanas. Ao final do período experimental avaliaram o comprimento de telômeros através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e observaram que o grupo que recebeu melatonina apresentou telômeros significativamente maiores em relação grupo controle, sugerindo que a melatonina possui um efeito protetivo contra o envelhecimento. Tais observações são reforçadas por tantos outros estudos que demonstram os efeitos benéficos da melatonina em proteger o genoma (Ortega-gutiérrez et al., 2009; Parisotto et al., 2016; Ortiz-Franco et al., 2017).

Uma hipótese para explicar a ação antígeno-tóxica da melatonina encontrada nos resultados está na sua reconhecida ação antioxidante. Dessa forma, no presente trabalho também foi realizado o ensaio cometa modificado, ou seja, o ensaio também pode ser aplicado para medir danos de DNA específicos, como bases oxidadas, adicionando DNA glicosilases à versão alcalina clássica deste ensaio. A enzima mais comumente utilizada é a FPG, que detecta purinas oxidadas, incluindo 8-oxoguanina, uma das lesões de DNA mais comuns resultantes do ataque de ERO, sendo um importante biomarcador de estresse oxidativo (Danielsen et al., 2008). Assim, a incubação com esta enzima específica permite uma estimativa dos níveis de dano oxidativo no DNA (Azqueta et al., 2009). Os resultados demonstraram que a ingestão de melatonina independente do tempo, levou a uma redução de danos oxidativos ao DNA de todos os tecidos avaliados, com exceção do fígado, onde apenas os grupos suplementados por 15 e 18 meses apresentaram redução significativa em relação ao controle. Estudos como o de Ferreira e colaboradores (2013) também têm demonstrado a eficácia da melatonina em reverter danos oxidativos. Estes autores avaliaram os efeitos da

melatonina (1 mg/kg na água de beber) sob danos no DNA induzidos por ciclofosfamida (CP) em ratos. Os dados revelaram que a melatonina foi capaz de proteger contra as lesões oxidativas induzidas pela CP. Além disso, Charão e colaboradores (2015) verificaram o efeito protetor de nanocápsulas com núcleo lipídico carregados com melatonina (10 mg) na citotoxicidade e genotoxicidade induzida por paraquat (um herbicida amplamente utilizado) em células epiteliais A549 (de pulmão humano). Ao final, observaram que o paraquat induziu danos oxidativos no DNA detectados pelo EC modificado com a enzima FPG, e que a nanocápsula com melatonina foi efetivamente capaz de reduzir esses danos.

O presente trabalho é o primeiro na literatura a utilizar a enzima FPG para detectar redução de danos oxidativos decorrentes do envelhecimento utilizando a suplementação com melatonina. Uma das hipóteses bioquímicas para explicar a base molecular do envelhecimento que pode ser tanto endógena quanto exógena, são os radicais livres resultantes do acúmulo de danos oxidativos em várias biomoléculas no decorrer da vida do organismo (Harman, 1956). O aumento da peroxidação lipídica, dos níveis de proteínas carboniladas e danos oxidativos no DNA, têm sido fatores associados com o avanço da idade.

Diante disso, indiretamente, a melatonina promove o aumento dos níveis enzimáticos de diversas enzimas antioxidantes por ativar a translocação para o núcleo da célula do NFR2 (Claustrat et al., 2005) e, diretamente neutralizando as ERO (Reiter et al., 2014). Com a função de proteger contra as ERO, as células desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, que inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, este último ocorre devido a remoção de radicais livres, incluindo ERO, que pode ser realizado diretamente pela melatonina por meio da transferência de elétrons (Hardelan et al., 2005).

Estes achados permitem inferir que a suplementação de melatonina em diversas fases da vida dos animais testados, levou a uma diminuição do estresse oxidativo, destacando que quanto antes for a suplementação melhores serão os resultados. Isto pode ter sido ocasionado pela inativação de radicais oxidantes por meio de ações: 1) direta, pela remoção de ERO como OH^\cdot e O_2^\cdot , e 2) indireta, por meio da estimulação das enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutatona peroxidase e a glutatona redutase.

A não observação de redução de danos oxidativos na FD, pode ser vinculado ao fato deste parâmetro determinar apenas a porcentagem de células que apresentam danos, indiferente da classe (0, 1, 2, 3 ou 4), ou seja, do grau de lesão, sendo que podemos ter grupos com FD baixa, porém com ID superior aos grupos que apresentam FD alta.

Um outro teste utilizado neste trabalho para análise da instabilidade genômica foi o teste do MN em medula óssea de camundongos, que providencia uma estimativa da quantidade de mutações cromossômicas induzidas através de eventos de clastogênese e aneugênese (Krishna e Hayashi, 2000). Da mesma forma que no ensaio cometa, os resultados mostraram um aumento significativo de MNs no grupo que recebeu apenas água, demonstrando que o envelhecimento causou a formação de MNs em eritrócitos jovens e maduros. Analisando resultados sobre envelhecimento na literatura, constatamos que o processo de envelhecimento tem demonstrado uma associação entre o aumento significativo na frequência de micronúcleos e o avanço da idade, tanto em animais (Sato et al., 1995; Heuser et al., 2008; Damiani et al., 2017;) quanto em seres humanos (Bolognesi et al., 1997; Bonassi et al., 2001; Nefic e Handzic, 2013).

O aumento de MN com a idade, pode ocorrer devido à combinação de diversos fatores que incluem: 1) efeito cumulativo de mutações adquiridas em genes envolvidos no reparo do DNA, segregação cromossômica e checkpoints do ciclo celular; e 2) aberrações estruturais e numéricas nos cromossomos, decorrentes da exposição a genotoxinas endógenas, ambientais ou ocupacionais, bem como uma série de fatores de estilo de vida pouco saudáveis (Fenech e Bonassi, 2011).

A redução de EPCMn e ENCMn nos grupos suplementados com melatonina em diferentes fases da vida também foi observada neste trabalho, evidenciando que a melatonina agiu como protetora celular, uma vez que auxiliou na proteção contra os danos ocasionados pelo envelhecimento. Estudos na literatura estão de acordo com os presentes achados, Ortega-Gutiérrez et al. (2009), realizaram um trabalho avaliando o efeito protetivo da melatonina contra danos genotóxicos induzidos pela Mitomicina-C (MMC), um quimioterápico que quando metabolizado gera a produção de radicais livres. Os dados do teste de MN, demonstraram que o grupo MMC apresentou maior incidência de células micronucleadas quando comparado ao grupo MMC + melatonina (melatonina 2 mg/kg), demonstrando que a MMC induziu mutagenicidade e que a suplementação com melatonina foi capaz de reduzir estes danos. Além disso, a melatonina também demonstrou ação protetora contra os danos provocados pelo diazinon, um pesticida organofosforado, em esperma de ratos, conforme relatado por Sarabia et al. (2009).

Conforme já descrito anteriormente, a melatonina é um potente antioxidante que apresenta efeitos protetivos que contribuem para reforçar as defesas celulares contra danos oxidativos ocasionados pelo

envelhecimento. Devido à sua lipossolubilidade, a melatonina consegue facilmente atravessar a barreira hematoencefálica, podendo ser encontrada em qualquer compartimento celular (Rodriguez et al., 2004; Simonneaux et al., 2003). Além disso, vários estudos sugerem que a melatonina pode estar localizada dentro do núcleo para proteger o DNA de danos oxidativos e promover a estabilidade do mesmo (Tan et al., 1994), podendo desta forma auxiliar na proteção contra os danos causados no material genético.

A melatonina é um antioxidante bem conhecido (Gazi et al., 2006) e esta característica pode contribuir para sua ação anticancerígena, uma vez que muitas mutações envolvidas na transformação celular podem surgir como resultado de danos ocasionados por ERO, levando a modificações de base no DNA (Bjelland e Seeberg, 2003). Essas modificações são removidas através da via de reparo por excisão de bases, contribuindo para a estabilidade e integridade do genoma. Interessantemente, as deficiências no reparo do DNA no envelhecimento estão correlacionadas com o declínio cognitivo e doenças neurodegenerativas que são mais proeminentes na população idosa (Jeppesen et al., 2011). Diante disso, o presente trabalho também avaliou os níveis de OGG1 e APE1, enzimas chaves desta via de reparo.

Os resultados mostraram aumento significativo nos níveis destas enzimas no grupo que recebeu melatonina desde os 3 meses até os 21 meses em relação ao grupo controle. Rezapoor e colaboradores (2017) investigaram a capacidade da melatonina em modular a expressão de genes de reparo por excisão de base (OGG1, Ape 1 e Xrcc) induzidos por radiação, através da técnica de PCR. O tratamento com melatonina resultou na modulação da expressão dos genes avaliados, reduzindo os danos no DNA induzidos pela radiação por raio-X.

Estudos anteriores demonstram que a expressão de genes na via BER é dependente de Ape1 e OGG1 (Campalans et al., 2015; Caldecott, 2003), assim, se a inibição de um destes genes pode resultar na supressão de outros envolvidos nesta via (Rezapoor et al., 2017). O óxido nítrico (NO) pode ser gerado a partir de diversos processos, dentre eles o envelhecimento, levando a inibição do mecanismo de 8-oxo-2'-desoxiguanosina resultando no acúmulo de danos ao DNA. A melatonina por sua vez tem capacidade de inibir a disponibilidade de óxido nítrico (Sliwinski t al., 2007), aumentando a regulação de OGG1. Desta forma, além da sua atividade antioxidante, pode ser efetiva na mobilização de mecanismos de reparo de DNA, podendo ativar os genes responsáveis pelo início da nova síntese de DNA (Vijayalaxmi et al., 1998; Rezapoor et al., 2017).

Com o aumento da idade, ocorre alteração também na resposta inflamatória, sendo frequentemente acompanhada pelo nível baixo e crônico de inflamação, mesmo na ausência de estímulos externos (Franceschi et al., 2000; Namas et al., 2013). Essas alterações do estado inflamatório são características contínuas do processo de envelhecimento e também podem estar relacionadas com o estresse oxidativo característico dessa fase da vida.

Confirmando as teorias que afirmam que o envelhecimento esteja relacionado com o estresse oxidativo e com inflamação, Lee e colaboradores (2012), em uma revisão sistemática apenas com modelos de envelhecimento, evidenciaram um aumento na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e consequente diminuição das vias de ativação de enzimas antioxidantes. Eles constataram que, na maioria dos estudos referentes ao envelhecimento, ocorre ativação da via das proteínas de fase aguda e diminuição da via de Nrf2 (Lee et al., 2012).

Sob condições de estresse oxidativo, Nrf2 migra para o núcleo onde atua como fator de transcrição. Dentro do núcleo, juntamente com uma molécula de cofator Maf, ativa um promotor de DNA, o elemento de resposta antioxidante (ARE). A ativação de ARE leva à transcrição de uma série de proteínas antioxidantes, enzimas desintoxicantes, enzimas que processam espécies reativas de oxigênio e proteínas de transporte (Tripathi e Jena, 2010).

A via Nrf2-ARE é capaz de estimular a atividade de enzimas antioxidantes como, SOD, CAT, GPx, HO-1, NQO-1, sulfiredoxina (Srx), tioredoxina redutase (Trx1), peroxiredoxina (Prx1), glutathione S-transferase (GST) e a subunidade reguladora glutamato-cisteína ligase (GCLC) (Tripathi e Jena, 2010; Zhang et al, 2014). Consequentemente, com a diminuição de expressão da via de Nrf2 decorrente do avanço da idade, ocorre uma redução das enzimas HO-1 e NQO-1 que participam da via de regulação deste fator nuclear (Lee et al., 2012; Vriend e Reiter, 2015).

Diante disso, no presente trabalho também observou-se uma redução significativa dos níveis de HO-1 e NQO-1 no grupo controle, sendo esta diminuição característica do envelhecimento conforme já descrito anteriormente. Contudo, os animais suplementados por 18 meses com melatonina, apresentaram um aumento significativo nos níveis destas enzimas, sugerindo que a suplementação com melatonina modula parâmetros de estresse via fosforilação do Nrf2. Concordando com os presentes achados, Ding et al. (2014) avaliaram o potencial envolvimento da melatonina na ativação da via Nrf2-ARE e a modulação da atividade enzimática antioxidante, em um modelo experimental de lesão cerebral

traumática. Os dados encontrados sugerem que a melatonina aumentou as concentrações de Nrf2 no núcleo de camundongos submetidos à lesão cerebral traumática, aumentando também a transcrição de enzimas antioxidantes, HO-1, NQO1, GPx e SOD. Sendo esses efeitos, característicos da capacidade deste hormônio em estimular as atividades das enzimas antioxidantes, desempenhando um papel crítico em suas características antioxidativas (Barlow-Walden, 1998).

Durante o envelhecimento, o estresse oxidativo também está associado a dislipidemia (Kirkland et al., 2002), promovendo um aumento nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (Franceschi et al., 2000), o que estimula a geração de ERO e a produção de metabólitos lipídicos citotóxicos, incluindo aldeídos como o 4-HNE (Cutler et al., 2004; Mattson, 2009). O produto de peroxidação lipídica 4-HNE, modifica covalentemente proteínas em resíduos de lisina, histidina e cisteína, sendo um marcador confiável de estresse oxidativo cumulativo (Mattson, 2009; de Mello-Coelho et al., 2017). Neste sentido, o presente estudo mostrou níveis aumentados deste aldeído nos animais velhos, contudo, mediante a suplementação com melatonina os níveis de 4-HNE foram reduzidos significativamente em todos os grupos que receberam este hormônio, independentemente do tempo de consumo. Este é o primeiro estudo que demonstra que o aumento dos níveis de 4-HNE gerados pelo envelhecimento pode ser reduzido com a suplementação com melatonina. Por conseguinte, é possível que os mecanismos de ação citoprotetores da melatonina observados, estejam principalmente ligados à sua inibição multidimensional do estresse oxidativo, reduzindo a geração de radicais livres e de produtos tóxicos decorrentes de suas reações (Oxenkrug et al., 2001; Lee et al., 2005; Kwon et al., 2015).

Pesquisas recentes descobriram que o acúmulo de ERO envolvem os inflamassomas, que são complexos de multiproteínas intracelulares que medeiam a ativação de caspases inflamatórias (Lamkanfi e Dixiti, 2012; Conforti-Andreoni et al., 2011) e, por sua vez, induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18) (Lamkanfi e Dixiti, 2012). Dentre eles, destaca-se o NLRP3 que está associado a patogênese de doenças relacionadas ao envelhecimento, doenças autoimunes e inflamatórias (Cordero et al., 2018).

A ativação do inflamassoma NLRP3 recebe dois sinais distintos em sucessão: (i) um sinal de "inicialização" que ativa o fator de transcrição NF- κ B, induzindo a expressão de genes que codificam citocinas; e (ii) após a iniciação, a ativação do inflamassoma NLRP3 requer um segundo sinal orquestrado por um grupo diversificado de agonistas que desencadeiam a ativação e montagem do complexo de NLRP3 e,

finalmente, a ativação da caspase-1 (Lamkanfi e Deixiti, 2014). O inflamassoma NLRP3 é ativado em resposta a uma série de estímulos, incluindo DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), como ATP extracelular (Sadatoni et al., 2017), fibrilas β -amilóides (Heneka et al., 2013), cristais de colesterol (Düwell et al., 2010) e ERO (Abderrazak et al., 2015). Muitos destes estímulos encontram-se elevados no envelhecimento e envolvidos em doenças relacionadas com a idade. Diante disso a ativação do inflamassoma NLRP3, parece estar envolvida na produção de inflamação decorrente da idade. Estes achados corroboram com os do presente estudo, uma vez que foi observado níveis elevados deste inflamassoma nos animais que receberam somente água durante toda a vida, em relação aos que receberam melatonina por 15 e 18 meses.

Diversos estudos demonstram redução de NLRP3 com o tratamento com melatonina em animais, demonstrando efeito positivo deste hormônio (Escames et al., 2006; Garcia et al., 2015; Ortiz et al., 2015). Liu et al. (2017) avaliaram os efeitos da melatonina (20mg/kg) na ativação do inflamassoma na piromitose (uma forma inflamatória de morte celular regulada que depende da ativação do inflamassoma citosólico) dos adipócitos. Os resultados, de fato, demonstraram que a melatonina exógena melhorou a inflamação do tecido adiposo, além disso, atenuou a ativação do inflamassoma NLRP3 em modelo de camundongos obesos ou induzidos com LPS (lipopolissacarídeo). Assim, os dados indicam que a melatonina está envolvida na regulação de inflamassoma de adipócitos em estado inflamatório, podendo ser utilizada como uma nova terapia para prevenir e tratar a obesidade causada pela resposta inflamatória sistêmica. No entanto, o mecanismo molecular pelo qual o inflamassoma NLRP3 é regulado pela melatonina durante o envelhecimento ainda é desconhecido, porém, acredita-se que seja através das propriedades antiinflamatórias deste hormônio, pela inibição da ativação da via NF- κ B, induzindo a conservação da homeostase mitocondrial e reduzindo ERO e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Carretero et al., 2009; Volt et al., 2016).

Em todas as proteínas quantificadas no presente estudo observa-se diferenças significativas do grupo controle em relação ao grupo que recebeu melatonina por 18 meses, no entanto, 4-HNE foi a única que apresentou níveis extremamente baixos em todos tempos de suplementação com melatonina. Nas demais, observamos apenas uma tendência em obter esta diferença nos suplementados por 15 e 9 meses. Sendo que nos grupos tratados por 3 meses apenas NLRP3 e APE1 demonstraram esta tendência. Isto pode ser decorrente da idade em que

se iniciou o consumo deste hormônio, pois uma vez que, quanto mais jovem, maior a produção endógena de melatonina e com a suplementação exógena aumentam mais ainda as defesas antioxidantes do organismo contra agentes tóxicos, deixando-o preparado para as próximas fases do ciclo da vida. Acredita-se também que estas enzimas são mais propensas a danos causados por agentes tóxicos, tornando mais difícil a sua modulação. Dessa forma, esses dados sugerem que a melatonina quando consumida na dose padrão (3-5 mg), e iniciada na fase jovem da vida parece apresentar melhores benefícios em relação a um início mais tardio, onde a produção endógena deste hormônio começa a diminuir gradativamente, sendo assim, nesta faixa etária, a suplementação deveria ser com doses mais altas, para poder auxiliar na modulação destas proteínas e demais alterações fisiológicas e comportamentais decorrentes do envelhecimento.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este foi o primeiro estudo a iniciar a suplementação com melatonina em diferentes fases da vida e permanecer até o envelhecimento com o intuito de modular os efeitos comportamentais, genéticos e bioquímicos decorrentes desta idade.

Nos modelos comportamentais foi observado melhora na memória de habituação dos animais suplementados com melatonina e efeito tipo antidepressivo deste hormônio reduzindo o tempo de imobilidade dos animais.

A partir dos resultados obtidos em relação à instabilidade genômica, os dados fornecem evidências de que a suplementação com melatonina na dose testada (2mg/L), independentemente da idade de início é efetiva em auxiliar na redução de danos ocasionados pelo envelhecimento, desta forma apresentando atividade antigenotóxica e antimutagênica.

Em relação as enzimas de reparo do DNA (APE1 e OGG1) observou-se que a suplementação com melatonina elevou os níveis destas enzimas, apresentando melhora no sistema de reparo.

No sistema antioxidante, observou-se aumento nos níveis de HO-1 e NQO-1, sugerindo que a suplementação com melatonina modula parâmetros de estresse via fosforilação do Nrf2.

Referente a oxidação de lipídeos, foi observada uma redução nos níveis de 4-HNE nos grupos suplementados com melatonina, demonstrando que a melatonina protege contra os danos lipídicos ocasionados pelo processo de envelhecimento.

No inflamassoma NLRP3, também foi detectado redução significativa nos níveis desta enzima nos animais suplementados com melatonina, demonstrando proteção contra danos na via do inflamassoma.

Estes resultados tomados em conjunto, mostram que a melatonina apresenta um eficiente mecanismo antioxidante auxiliando na modulação de alterações comportamentais, genéticas e fisiológicas decorrentes do envelhecimento.

REFERÊNCIAS

Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015;4:296-307.

Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* 2016;146:163-73.

Anisimov VN, Alimova IN, Baturin DA, Popovich IG, Zabezhinski MA, Rosenfeld SV, Manton KG, Semenchenko AV, Yashin AI. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Exp Gerontol.* 2003; 38(4):449-61.

Anisimov VN, Zavarzina NY, Zabezhinski MA, Popovich IG, Zimina OA, Shtylick AV, Arutjunyan AV, Oparina TI, Prokopenko VM, Mikhalski AI, Yashin AI. Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CBA mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56(7):311-23.

Ascher JA, Cole JO, Colin JN, Feighner JP, Ferris RM, Fibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E, Sulser F. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. *J. Clin. Psychiatry.* 1995;56:395-401.

Aunan JR, Cho WC, Søreide K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis.* 2017;8(5):628-642.

Avila J, Gómez-Ramos A, Soriano E. Variations in brain DNA. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:323.

Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol.* 2013;87(6):949-68.

Azqueta A, Lorenzo Y, Collins AR. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis.* 2009;24(4):379-81.

Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 1995;26(5):497-502.

Beckman K, Ames B. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78(2):547-81.

Begg DP, Sinclair AJ, Weisinger RS. Reductions in water and sodium intake by aged male and female rats. *Nutr Res.* 2012;32(11):865-72.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49(2 Suppl 1):3-8.

Binfaré RW, Mantovani M, Budni J, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur J Pharmacol.* 2010;638(1-3):78-83.

Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res.* 2003;531:37-80.

Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 2006;12(10):1133-8.

Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat. Chem. Biol.* 2007;3:640-649.

Blumberg JB, Frei B, Fulgoni VL, Weaver CM, Zeisel SH. Contribution of Dietary Supplements to Nutritional Adequacy in Various Adult Age Groups..*Nutrients.* 2017;9(12).

Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6(4):249-56.

Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, Dalpra L, De Ferrari M, Forni A, Lando C, et al. Influence of sex on

cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(6):671-9.

Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A. Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen.* 2001;37(1):31-45.

Bonilla E, Medina-Leendertz S, Diaz S. Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonin. *Exp Gerontol.* 2002;37:69–638.

Bonini JS, Da Silva WC, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neurosc.* 2007;147(1):37-45.

Burke KE. Mechanisms of Aging and Development-A New Understanding of Environmental Damage to the Skin and Prevention with Topical Antioxidants. *Mech Ageing Dev.* 2017;S0047-6374(17)30284-1. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research.* 2007;627:31–35.

Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst).* 2003;2:955–69.

Campalans A, Moritz E, Kortulewski T, Biard D, Epe B, Radicella JP, et al. Interaction with OGG1 is required for efficient recruitment of XRCC1 to base excision repair and maintenance of genetic stability after exposure to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2015;35:1648–58.

Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, Galle PR, González-Gallego J, Strand S. Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer*. 2013;108(2):442-9.

Cardinali DP, Vigo DE, Olivar N, Vidal MF, Furio AM, Brusco LI. Therapeutic application of melatonin in mild cognitive impairment. *Am J Neurodegener Dis*. 2012;1(3):280-91.

Cardoso E, Rezin GT, Zanoni ET, de Souza Notoya F, Leffa DD, Damiani AP, Daumann F, Rodriguez JC, Benavides R, da Silva L, Andrade VM, da Silva Paula MM. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. *Mutat Res*. 2014;766-767:25-30

Carretero M1, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, García L, Acuña-Castroviejo D. Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging. *J Pineal Res*. 2009;47(2):192-200.

Charão MF, Baierle M, Gauer B, Goethel G, Fracasso R, Paese K, Brucker N, Moro AM, Bubols GB, Dias BB, Matte US, Guterres SS, Pohlmann AR, Garcia SC. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;784-785:1-9.

Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, van Deursen JM. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(10):718-735.

Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):11-24.

Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 2015;61(2-3):77-84.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30(2):139-46.

Collins AR, El Yamani N1, Lorenzo Y, Shaposhnikov S, Brunborg G, Azqueta A. Controlling variation in the comet assay. *Front Genet.* 2014;5:359.

Conforti-Andreoni C, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The inflammasomes in health and disease: from genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. *Cell Mol Immunol.* 2011;8(2):135-45.

Cordero MD, Williams MR, Ryffel B. AMP-Activated Protein Kinase Regulation of the NLRP3 Inflammasome during Aging. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(1):8-17.

Corrales A, Vidal R, García S, Vidal V, Martínez P, García E, Flórez J, Sanchez-Barceló EJ, Martínez-Cué C, Rueda N. Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J Pineal Res.* 2014;56(1):51-61.

Costa MS, Botton P, Mioranza HS, Souza DO, Porciúncula LO. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (trkb) content in mice. *Neuroscience.* 2008;153(4):1071-78.

Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29:571-625.

Cuesta S, Kireev R, García C, Rancan L, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr).* 2013;35(3):659-71.

Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):2070-5.

Damiani AP, Garcez ML, Letieli de Abreu L, Tavares TH, Rodrigues Boeck C, Moraes de Andrade V. A reduction in DNA damage in neural tissue and peripheral blood of old mice treated with caffeine. *J Toxicol Environ Health A.* 2017;80(13-15):621-629.

Damiani AP. Avaliação de danos no DNA de tecido neural e sangue periférico de camundongos velhos tratados com cafeína. [dissertação de mestrado]. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC; 2014.

Danielsen PH, Brauner EV, Barregard L, Sallsten G, Wallin M, Olinski R, Rozalski R, Moller P, Loft S. Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. *Mutat Res.* 2008;642(1-2):37-42.

Dawson D, Armstrong SM. Chronobiotics—drugs that shift rhythms. *Pharmacol Ther.* 1996;69(1):15-36.
de Mello-Coelho V, Cutler RG, Bunbury A, Tammara A, Mattson MP, Taub DD. Age-associated alterations in the levels of cytotoxic lipid molecular species and oxidative stress in the murine thymus are reduced by growth hormone treatment. *Mech Ageing Dev.* 2017;167:46-55.

Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky E. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol.* 2009;607:121–125.

Dianov GL, Sleeth KM, Dianova II, Allinson SL. Repair of a basic sites in DNA. *Mutation Research.* 2003;531:157–163.

Ding K, Wang H, Xu J, Li T, Zhang L, Ding Y. Melatonin stimulated antioxidant enzymes and reduced oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2014;73:1-11

Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature.* 2007;447:951-958.

Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell.* 2007;6(3):361-70.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010;464(7293):1357-61.

Erenberk U, Dundaroz R, Gok O, Uysal O, Agus S, Yuksel A, Yilmaz B, Kilic U. Melatonin attenuates phenytoin sodium-induced DNA damage. *Drug Chem Toxicol.* 2014;37(2):233-9.

Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 2006;41(11):1165-73.

Fagundes GE, Damiani AP, Borges GD, Teixeira KO, Jesus MM, Daumann F, Ramlov F, Carvalho T, Leffa DD, Rohr P, Moraes De Andrade V. Effect of green juice and their bioactive compounds on genotoxicity induced by alkylating agents in mice. *J Toxicol Environ Health A.* 2017;80(13-15):756-766.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res.* 1995;339(1):37-59.

Farriol M1, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J Appl Toxicol.* 2000;20(1):21-4.

Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011;26(1):43-9.

Ferreira SG1, Peliciari-Garcia RA, Takahashi-Hyodo SA, Rodrigues AC, Amaral FG, Berra CM, Bordin S, Curi R, Cipolla-Neto J. Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(3):278-86.

Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie.* 2003;85(11):1053-71.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244-54.

Froy O, Miskin R. The interrelations among feeding, circadian rhythms and ageing. *Prog Neurobiol.* 2007;82(3):142-50.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011;51(1):1-16.

Galvani NC, Vilela TC, Domingos AC, Fagundes MÍ, Bosa LM, Della Vechia IC, Scussel R, Pereira M, Steiner BT, Damiani AP, Chávez-Olórtegui C, De Andrade VM, de Ávila RAM. Genotoxicity evaluation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice. *Toxicol.* 2017;140:132-138.

Garcez ML. Aumento da atividade de ecto-nucleotidases em hipocampo de camundongos adulto-velhos tratados ou não com cafeína [dissertação de mestrado]. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC; 2013.

García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice. *FASEB J.* 2015;29(9):3863-75.

Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol.* 2008;10(11):1241-7.

Gates KS. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(7):1747-1760.

Gazi S, Altun A, Erdogan O. Contrast-induced nephropathy: preventive and protective effects of melatonina. *J Pineal Res.* 2006;41:53-57.

Gems, Partridge L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:621-44.

Gilbert SS, van den Heuvel CJ, Dawson D. Daytime melatonin and temazepam in young adult humans: equivalent effects on sleep latency and body temperatures. *J Physiol.* 1999;514(3):905-914.

Güney SE, Glu AC, Öztürk G, Akbulut KG, Karasu Ç. comparison of melatonin effect on oxidant status and antioxidant capacity in liver and heart of young and aged rats. *Int J Gerontol.* 2013;7(1):45-49.

Hara Y, Morrison JH, Ten C. Synaptic Correlates of Aging and Cognitive Decline. *The Synapse Structure and Function*. 2014;19:301- 42.

Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2007;7(4):289-303.

Hardeland R, Poeggeler B. Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiol J*. 2008;1:1–23.

Hardeland R. Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *J Pineal Res*. 2013;55(4):325-56.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:2001–2013.

Hardeland R. Neuroprotection by radical avoidance: search for suitable agents. *Molecules*. 2009;14:5054–102.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 2005;27(2):119-30.

Haridas S, Kumar M, Manda K. Melatonin ameliorates chronic mild stress induced behavioral dysfunctions in mice. *Physiol Behav*. 2013;119:201-207.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300.

Hashimoto K, Takasaki W, Sato I, Tsuda S. DNA damage measured by comet assay and 8-OH-dG formation related to blood chemical analyses in aged rats. *J Toxicol Sci*. 2007;32(3):249-59.

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013;493(7434):674-8.

Heuser VD, Andrade VM, Peres A, Braga LMGM, Chies JAB. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int*. 2008;32(10):1223-9.

Hodgkinson B, Evans D, Wood J. Maintaining oral hydration in older adults: a systematic review. *Int J Nurs Pract*. 2003;9(3):19-28.

Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(15):1475-85.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(7-8):460-2.

Hughes KA, Reynolds RM. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol*. 2005;50:421-45.

Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010;28(26):4058-65.

Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsire T. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat Res*. 2007;615:18-27.

Instituto brasileiro de geografia e estatística: Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises de Dinâmicas Demográficas. Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 – Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/default.shtm>2016. Acesso em 07 jan 2018.

Instituto brasileiro de geografia e estatística: Censo do IBGE 2010–. Disponível em: http://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo?view_noticia_eid=1e1dnoticia=1866et=primeiros-resultados-definitivos-censo-2010-populacao-brasil-190-755-799-pessoas. Acesso em 08 jan 2018

Iida T, Abumi K, Kotani Y, Kaneda K. Effects of aging and spinal degeneration on mechanical properties of lumbar supraspinous and interspinous ligaments. *Spine J*. 2002;2(2):95-100.

Imam SZ, Karahalil B, Hogue BA, Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an agedependent manner. *Neurobiol Aging*. 2006;27(8):1129-36.

Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 2011;94(2):166-200.

Ji M, Su X, Liu J, Zhao Y, Li Z, Xu X, Li H, Nashun B. Comparison of naturally aging and D-galactose induced aging model in beagle dogs. *Exp Ther Med*. 2017;14(6):5881-5888.

Jimenez-Jorge S, Guerrero JM, Jimenez-Caliani AJ, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Osuna C, Molinero P. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J Pineal Res*. 2007;42:240–246.

Karasek M, Reiter RJ. Melatonin and aging. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;1:14-6.

Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(8):735-53.

Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol*. 2015;45(9):765-98.

Kelley MR, Kow YW, Wilson III DM. Disparity between DNA Base Excision Repair in Yeast and Mammals: Translational Implications. *Cancer Research*. 2003;63:549–554.

Kelly E, Vyas P, Weber JT. Biochemical Properties and Neuroprotective Effects of Compounds in Various Species of Berries. *Molecules*. 2017;23(1).

Kirkland JL, Tckonia T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I. Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol*. 2002;37:757-767

Kirkwood TB. Understanding the odd science of ginseng. *Cell*. 2005;120:437-447.

Klement K, Goodarzi AA. DNA double strand break responses and chromatin alterations within the aging cell. *Exp Cell Res*. 2014;329(1):42-52.

Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H. Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res*. 2011;2011:963172.

Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med*. 2009;15(1-2):43-50.

Kosik KS, Rapp PR, Raz N, Small SA, Sweatt JD, Tsai LH. Mechanisms of Age-Related Cognitive Change and Targets for Intervention: Epigenetics. *J Gerontol. Biol Sci Med Sci*. 2012;67(7):741-6.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000;455(1-2):155-66.

Kwiatkowski D, Czarny P, Toma M, Jurkowska N, Sliwinska A, Drzewoski J, Bachurska A, Szemraj J, Maes M, Berk M, Su KP, Galecki P, Sliwinski T. Associations between DNA Damage, DNA Base Excision Repair Gene Variability and Alzheimer's Disease Risk. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2016;41(3-4):152-71

Kwon KJ, Lee EJ, Kim MK, Jeon SJ, Choi YY, Shin CY, Han SH. The potential role of melatonin on sleep deprivation-induced cognitive impairments: implication of FMRP on cognitive function. *Neuroscience*. 2015;301:403-14.

Lahiri DK, Chen D, Lahiri P, Rogers JT, Greig NH, Bondy S. Melatonin, metals, and gene expression: implications in aging and neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1035:216-30.

Laird KT, Lavretsky H, Paholpak P, Vlasova RM, Roman M, St Cyr N, Siddarth P. Clinical correlates of resilience factors in geriatric depression. *Int Psychogeriatr*. 2018;16:1-10

Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014;157:1013-1022.

Lax NZ, Gorman GS, Turnbull DM. Review: Central nervous system involvement in mitochondrial disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017;43:102-118.

Lee EJ, Lee MY, Chen HY, Hsu YS, Wu TS, Chen ST, Chang GL. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res.* 2005;38(1):42-52.

Lee JS, Ward WO, Ren H, Vallanat B, Darlington GJ, Han ES, Laguna JC, DeFord JH, Papaconstantinou J, Selman C, Corton JC. Meta-analysis of gene expression in the mouse liver reveals biomarkers associated with inflammation increased early during aging. *Mech Ageing Dev.* 2012;133(7):467-78.

Leffa DD, Bristot BN, Damiani AP, Borges GD, Daumann F, Zambon GM, Fagundes GE, de Andrade VM. Anesthetic Ketamine-Induced DNA Damage in Different Cell Types In Vivo. *Mol Neurobiol.* 2016;53(8):5575-81

Leffa DD, da Silva J, Daumann F, Dajori AL, Longaretti LM, Damiani AP, de Lira F, Campos F, Ferraz Ade B, Côrrea DS, de Andrade VM. Corrective effects of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake on biochemical and genotoxic parameters in mice fed on a high-fat diet. *Mutat Res.* 2014a;770:144-52.

Leffa DD, Damiani AP, Damazio DD, Guerra NP, Moretti M, de Brito GG, Boeck CR, Gavioli EC, de Andrade VM. Long-term effects of ageing and ovariectomy on aversive and recognition memory and DNA damage in the hippocampus of female rats. *Acta Neuropsychiatr.* 2014b;26(3):161-9.

Lenart P, Krejci L. DNA, the central molecule of aging. *Mutat Res.* 2016;786:1-7.

Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med.* 2013;19(7):909-15.

Lin PY, Huang YC, Hung C. Shortened telomere length in patients with depression: A meta-analytic study. *J Psychiatr Res.* 2016;76:84-93.

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993; 362(6):709-715.

Liu Z, Gan L, Xu Y, Luo D, Ren Q, Wu S, Sun C. Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF- κ B/GSDMD signal in mice adipose tissue. *J Pineal Res.* 2017;63(1).

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.

Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481:287–294.

Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 2000;855(1):116-23.

Mantovani M, Pértile R, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett.* 2003;343:1–4.

Marangoz D, Guzel E, Eyuboglu S, Gumusel A, Seckin I, Ciftci F, Yilmaz B, Yalvac I. Comparison of the neuroprotective effects of brimonidine tartrate and melatonin on retinal ganglion cells. *Int Ophthalmol.* 2017.

Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tetè S, Baldini A, Teccoh S, Marzo G. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab.* 2012;9(1):88.

Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol.* 2009;44:625-633.

Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res.* 2013;54(1):1-14.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1990;239(1):29-80.

Mazouzi A, Battistini F, Moser SC, Ferreira da Silva J, Wiedner M, Owusu M, Lardeau CH, Ringler A, Weil B, Neesen J, Orozco M, Kubicek S, Loizou JI. Repair of UV-Induced DNA Damage Independent of Nucleotide Excision Repair Is Masked by MUTYH. *Mol Cell.* 2017;68(4):797-807.

McKinley MJ, Denton DA, Thomas CJ, Woods RL, Mathai ML. Differential effects of aging on fluid intake in response to hypovolemia, hypertonicity, and hormonal stimuli in Munich Wistar rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(9):3450-5.

Mendonça SAT. Efeito do exercício físico voluntário associado com o consumo de caféina no comportamento e estresse oxidativo em camundongos adultos-velhos [dissertação de mestrado]. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC; 2011.

Mentes J. Oral hydration in older adults: greater awareness is needed in preventing, recognizing, and treating dehydration. *Am J Nurs.* 2006;106(6):40-9.

Micale V, Arezzi A, Rampello L, Drago F. 2006. Melatonin affects the immobility time of rats in the forced swim test: the role of serotonin neurotransmission. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2006;16:538–545

Min-Wen JC, Jun-Hao ET, Shyh-Chang N. Stem Cell Mitochondria during Aging. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;52:110-8.

Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2013;12(2):661-84.

Murawska-Cialowicz E, Januszewska L, Zuwała-Jagiello J, Milczarska J, Zawadzki M, Paprocka-Borowicz M, Wierzbicka-Damska I. Melatonin decreases homocysteine level in blood of rats. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59(4):717-29.

Namas RA, Bartels J, Hoffman R, Barclay D, Billiar TR, Zamora R, Vodovotz Y. Combined *in silico*, *in vivo*, and *in vitro* studies shed insights into the acute inflammatory response in middle-aged mice. *PLoS One*. 2013;8(7):e67419.

Nefic H, Handzic I. The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutat Res*. 2013;753(1):1-11.

Nie L, Wei G, Peng S, Qu Z, Yang Y, Yang Q, Huang X, Liu J, Zhuang Z, Yang X. Melatonin ameliorates anxiety and depression-like behaviors and modulates proteomic changes in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biofactors*. 2017;43(4):593-611.

Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. 2017;Epub ahead of print.

Noschang CG, Pettenuzzo LF, Toigo EVP, Andreazza AC, Krolow R, Fachin F, Ávila MC, Arcego D, Crema LM, Diehl LA, Gonçalves CA, Vendite, Dalmaz C. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;94(1):63-9.

Oakin-Bendahan S, Anis Y, Nir I, Zisappel N. Effects of longterm administration of melatonin and a putative antagonist on the ageing rat. *Neuro Rep*. 1995;6:785-788.

Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch*. 2010;459(2):259-68.

ONU, United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). *World Population Ageing*;2015.

Ortega-Gutiérrez S, López-Vicente M, Lostalé F, Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, García JJ. Protective effect of melatonin against mitomycin C-induced genotoxic damage in peripheral blood of rats. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:791432.

Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, Dayoub JC, López LC, Venegas C, García JA, López A, Volt H, Luna-Sánchez M, Escames G.

Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J Pineal Res.* 2015;58(1):34-49.

Ortiz-Franco M, Planells E, Quintero B, Acuña-Castroviejo D, Rusanova I, Escames G, Molina-López J. Effect of Melatonin Supplementation on Antioxidant Status and DNA Damage in High Intensity Trained Athletes. *Int J Sports Med.* 2017;38(14):1117-1125.

Oxenkrug G, Requentina P, Bachurin S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;939:190-9.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, Hardeland R, Cardinali. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res.* 2013;23(3):267-300.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Cardinali DP, Monti MJ. Could agomelatine be the ideal antidepressant? *Expert Rev Neurother.* 2006;6:1595–1608.

Pang SF, Tsang CW, Hong GX, Yip PC, Tang PL, Brown GM. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging. *J Pineal Res.* 1990;8(2):179-92.

Papakostas GI. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2006;16:391–402.

Parisotto EB, Vidal V, García-Cerro S, Lantigua S, Wilhelm Filho D, Sanchez-Barceló EJ, Martínez-Cué C, Rueda N. Chronic Melatonin Administration Reduced Oxidative Damage and Cellular Senescence in the Hippocampus of a Mouse Model of Down Syndrome. *Neurochem Res.* 2016 Nov;41(11):2904-2913.

Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & behavior.* 2000;68(4):509-14.

Perdomo J, Cabrera J, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen

species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J Pineal Res.* 2013;55(2):195-206.

Petranka J1, Baldwin W, Biermann J, Jayadev S, Barrett JC, Murphy E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res.* 1999;26(3):129-36.

Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:787-791.

Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res.* 1993;14(4):151-68.

Portal Brasil, 2016- Expectativa de vida do brasileiro. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/governo/2014/12/expectativa-de-vida-do-brasileiro-subiu-para-74-9-anos>. Acesso em 03 jan 2018.

Prakhie IV, Oxenkrug GF. The effect of nifedipine, Ca²⁺ antagonist, on activity of MAO inhibitors, N-acetylserotonin and melatonin in the mouse tail suspension test. *Int J Neuropsychopharmacol.* 1998;1:35-45.

Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Siu AW, Garcia JJ. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. *J Pineal Res.* 2000;29(1):54-61.

Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1844-52.

Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, Whittaker P, McCann OT, Finer S, Valdes AM, Leslie RD, Deloukas P, Spector TD. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 2010;20(4):434-9.

Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, Whittaker P, McCann OT, Finer S, Valdes AM, Leslie RD, Deloukas P, Spector TD. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs

preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 2010;20(4):434-9.

Rao KS. DNA repair in aging rat neurons. *Neuroscience.* 2007;145(4):1330-40.

Rasmussen DD1, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology.* 1999;140(2):1009-12

Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):194-210.

Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995;18(1):1-11.

Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations *Physiology (Bethesda).* 2014;29(5):325-33

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys.* 2001;34(2):237-56.

Reiter RJ, Tan DX, Saiz RM, Mayo JC. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:1299-1321.

Rezapoor S, Alireza Shirazi, Sakineh Abbasi, Javad Tavakkoly Bazzaz, Pantea Izadi, Hamed Rezaeejam, Majid Valizadeh, Farid Soleimani-Mohammadi, Masoud Najafi. Modulation of Radiation-induced Base Excision Repair Pathway Gene Expression by Melatonin. *J Med Phys.* 2017;42(4):245–250

Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(6):981-93.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36:1–9.

Rutten BP, Schmitz C, Gerlach OH, Oyen HM, de Mesquita EB, Steinbusch HW, Korr H. The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss? *Neurobiol Aging.* 2007;28(1):91-8.

Ryan KK, Grayson BE, Jones KR, Schneider AL, Woods SC, Seeley RJ et al. Physiological responses to acute psychological stress are reduced by the PPARgamma agonist rosiglitazone. *Endocrinology* 2012;153:1279-87.

Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM. Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res.* 1986;3(4):379-88.

Sadatomi D, Nakashioya K, Mamiya S, Honda S, Kameyama Y, Yamamura Y, Tanimura S, Takeda K. Mitochondrial function is required for extracellular ATP-induced NLRP3 inflammasome activation. *J Biochem.* 2017;161(6):503-512.

Sanderson WC, Scherbov S. Faster increases in human life expectancy could lead to slower population aging. *PLoS One.* 2015;10(4):0121922.

Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregón E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009;72(2):663-8.

Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16(1):79-100.

Sato S, Taketomi M, Nakajima M, Kitazawa M, Shimada H, Itoh S, Igarashi M, Higashikuni N, Sutou S, Sasaki YF. Effect of aging on spontaneous micronucleus frequencies in peripheral blood of nine mouse strains: the results of the 7th collaborative study organized by CSGMT/JEMS.MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenesis Study Group. *Mutat Res.* 1995;338(1-6):51-7.

SBEM, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia: Posicionamento sobre a melatonina, 2017. Disponível em:

- <https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/posicionamento_sobre_melatonina_sbem.pdf>. Acesso em 03 jan 2018
- Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR Jr, Tufik S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res.* 2000;29(4):193-200.
- Segovia G, Del Arco A, Mora F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm.* 2009;116(8):1007-1016.
- Shammas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(1):28-34.
- Shigenaga MK, M.K., Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10771-8
- Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética Toxicológica.* Porto Alegre: Editora alcance. 2003;422p.
- Simões, CCS. *Relações entre as alterações históricas na dinâmica demográfica brasileira e os impactos decorrentes do processo de envelhecimento da população.* Rio de Janeiro : IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais, 2016.
- 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.* 2003;55(2):325-95.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.
- Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(9):712-21.
- Skene DJ1. Optimization of light and melatonin to phase-shift human circadian rhythms. *J Neuroendocrinol.* 2003;15(4):438-41.

Sliwinska A, Sitarek P, Toma M, Czarny P, Synowiec E, Krupa R, Wigner P, Bialek K, Kwiatkowski D, Korycinska A, Majsterek I, Szemraj J, Galecki P, Sliwinski T. Decreased expression level of BER genes in Alzheimer's disease patients is not derivative of their DNA methylation status. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;79:311-316.

Sliwinski T, Rozej W, Morawiec-Bajda A, Morawiec Z, Reiter R, Blasiak J. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutat Res*. 2007;634(1-2):220-7

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70.

Swai U, Rao KS. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(8-9):374-81.

Swenberg JA, Lu K, Moeller BC, Gao L, Upton PB, Nakamura J, Starr TB. Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci*. 2011;120(Suppl 1):S130-S145.

Tamura H, Kawamoto M, Sato S, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Aasada H, Takaki E, Nakai A, Reiter RJ, Sugino N. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *J Pineal Res*. 2017;62(2).

Tan D, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden LR, et al. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*. 1994;15:215-8.

Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*. 2003;34:75-78

Tan DX, Manchester LC, Sanchez-Barcelo E, Mediavilla MD, Reiter RJ. Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*. 2010;8:162-167.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007;42(1):28-42.

Thomas JN, Smith-Sonneborn J. Supplemental melatonin increases clonal lifespan in the protozoan *Paramecium tetraurelia*. *J Pineal Res.* 1997;23:123-130.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.

Tozawa T, Mishima K, Satoh K, Echizenya M, Shimizu T, Hishikawa Y. Stability of sleep timing against the melatonin secretion rhythm with advancing age: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(10):4689-95.

Tripathi DN, Jena GB. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *J Pineal Res.* 2010;48(4):324-31.

Tripathi DN, Jena GB. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *J Pineal Res.* 2010;48:324-331

Trofimiuk E, Wielgat P, Braszko JJ. Candesartan, angiotensin II type 1 receptor blocker is able to relieve age-related cognitive impairment. *Pharmacol Rep.* 2017;70(1):87-92.

Van Geldorp B, Heringa SM, Van den Berg E, Olde Rikkert MG, Biessels GJ, Kessels RP. Working memory binding and episodic memory formation in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's dementia. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2015;37(5):538-48.

Vermeij WP, Hoeijmakers JH, Pothof J. Aging: not all DNA damage is equal. *Curr Opin Genet Dev.* 2014;26:124-30.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling

pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-40

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Meltz ML, Herman TS. Melatonin: possible mechanisms involved in its 'radioprotective' effect. *Mutat Res.* 1998;404:187-189.

Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:645-68.

Vilela TC, Muller AP, Damiani AP, Macan TP, da Silva S, Canteiro PB, de Sena Casagrande A, Pedroso GDS, Nesi RT, de Andrade VM, de Pinho RA. Strength and Aerobic Exercises Improve Spatial Memory in Aging Rats Through Stimulating Distinct Neuroplasticity Mechanisms. *Mol Neurobiol.* 2017;54(10):7928-7937

Volt H, García JA, Doerrier C, Díaz-Casado ME, Guerra-Librero A, López LC, Escames G, Tresguerres JA, Acuña-Castroviejo D. Same molecule but different expression: aging and sepsis trigger NLRP3 inflammasome activation, a target of melatonin. *J Pineal Res.* 2016;60(2):193-205.

Vriend J, Reiter RJ. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;401:213-20.

Weissman L, de Souza-Pinto NC, Mattson MP, Bohr VA. DNA base excision repair activities in mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2009;30(12):2080-1.

Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases—did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol.* 2012;13:352-357.

Wilson DM III, Bohr VA, McKinnon PJ. DNA damage, DNA repair, ageing and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2008;129:349-352.

Wilson SH, Kunkel TA. Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol.* 2000;7(3):176-8.

Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis*. 2007;22:195-200.

Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology*. 2000;141(2):487-97.

Wu HJ, Liu C, Duan WX, Xu SC, He MD, Chen CH, Wang Y, Zhou Z, Yu ZP, Zhang L, Chen Y. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutat Res*. 2013;752(1-2):57-67.

Xi H, Li C, Ren F, Zhang H, Zhang L. Telomere, aging and age-related diseases. *Aging Clin Exp Res*. 2013;25(2):139-46.

Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res*. 2005;591(1-2):93-102.

Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol*. 2007;210(3):567-74.

Zhang J, Fu B, Zhang X, Zhang L, Bai X, Zhao X, Chen L, Cui L, Zhu C, Wang L, Zhao Y, Zhao T, Wang X. Bicyclol upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res Bull*. 2014;100:38-43

**ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Em
Animais**



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da administração crônica de melatonina em camundongos swiss de diferentes idades, sobre parâmetros genéticos, bioquímicos e comportamentais" Protocolo nº 075/2015-1 sob a responsabilidade de Vanessa Moraes de Andrade e equipe: Ricardo Aurino de Pinho, Adriani Paganini Damiani, Giulia Strapazzon, Thanielly Thais de Oliveira Sardínhas, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 15/06/2015.

Vigência do Projeto	30/06/2015 a 30/04/2017
Espécie/linhagem	Mus musculus – Camundongos Swiss
Nº. De animais	240
Peso/Idade	30g a 35g / 90 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 075/2015-1


Principal Investigator: Vanessa Moraes de Andrade

Researchers: Ricardo Aurino de Pinho, Adriani Paganini Damiani, Giulia Strapazzon, Thanielly Thais de Oliveira Sardínhas

Project title: Assessment of the effects of chronic administration of melatonina in swiss mice of different ages, on genetic, biochemical and behavioral parameters

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 16 de junho de 2015.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA