

BRUNA PETRUCELLI ARRUDA

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

Versão Original

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

Área de Concentração: Biologia
Morfofuncional

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

São Paulo

2019

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

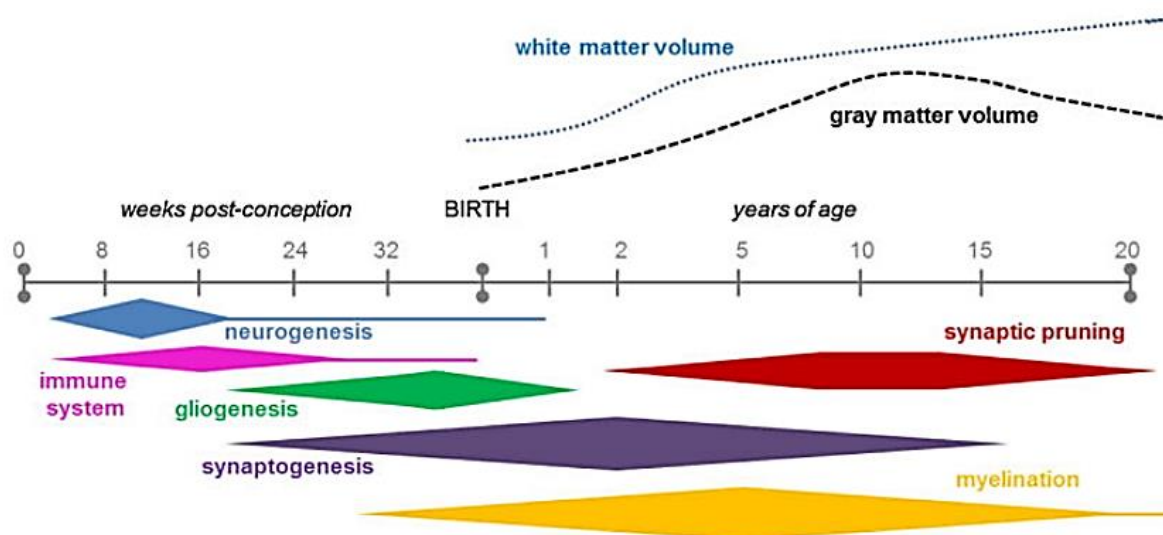
INTRODUÇÃO

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

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

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

Figura 1 - Processos do desenvolvimento neurológico



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

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

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

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

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

Figura 2 - Estimativa de proliferação celular no hipocampo

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

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

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

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

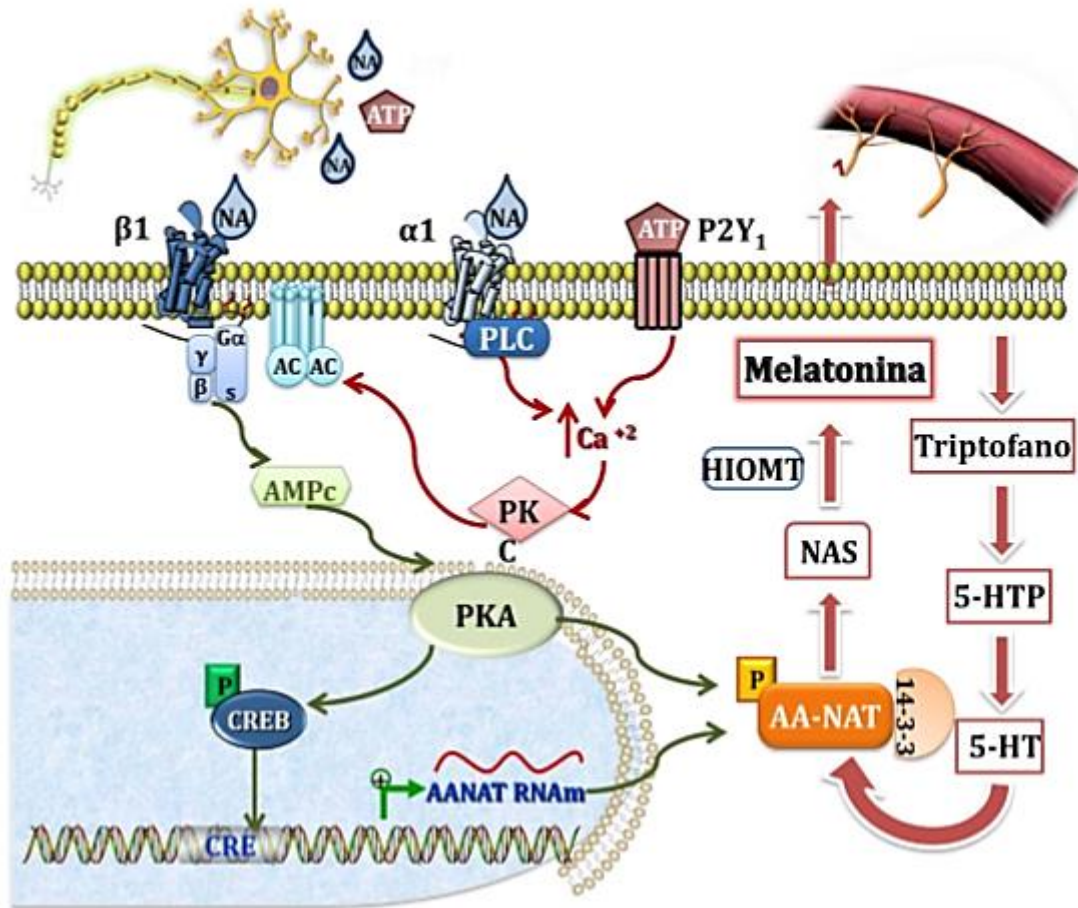
Em humanos, a prematuridade é mais comum em meninos (55%) e há maior taxa de mortalidade nestes quando comparados às meninas (STEVENSON et al., 2000; CHAWPANPAIBOON, 2019), entretanto, meninos e meninas prematuros podem ser acometidos de formas diferentes. Estudo realizado na Austrália mostrou que meninos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

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

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

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

Figura 3 - Síntese da melatonina na glândula pineal de ratos



No período escuro, as fibras pós-ganglionares liberam noradrenalina (NA) que ativa os receptores do tipo β1-adrenérgicos. Esses receptores, por sua vez, ativam a adenilil ciclase (AC) promovendo um aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a proteína quinase dependente do AMPc (PKA) e a fosforilação do fator de transcrição CREB, permitindo a transcrição da enzima N-acetiltransferase de araquilamina (AA-NAT). A atuação de NA nos receptores α1-adrenérgicos, ou a atuação da adenosina trifosfato (ATP) nos receptores purinérgicos P2Y1 potencializam a transcrição da AA-NAT via proteína quinase C (PKC) ativada pelo aumento intracelular de cálcio. A cascata da síntese de melatonina tem início com o metabolismo de triptofano para formas serotonina (5-HT) que é substrato para a ação direta da AA-NAT para formar N-acetilserotonina (NAS), que então é metilada em melatonina pela enzima HIOMT. Fonte: Sousa (2011).

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HERSHKOWITZ, M.; GRIMM, V. E.; SPEISER, Z. The effects of postnatal anoxia on

behaviour and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat. **Developmental Brain Research**, v. 7, n. 2–3, p. 147–155, 1983.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARCUZZO, S. et al. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. **Brain and Development**, v. 32, n. 4, p. 323–331, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOUSA, C. E. C. Caracterização do eixo imune-pineal: mecanismo de ação do controle da função pineal pela citocina pró-inflamatória TNF. 2011. 120f.

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

- TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 2011.
- TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, p. 247–259, 2015.
- TAKADA, S. H. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 331–338, 2016.
- TEM, V. et al. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Behavioural Brain Research**, v. 145, p. 209-219, 2003.
- VANNUCCI, R. C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. **American Journal of Perinatology**. v. 17, n. 3, p. 113-120, 2000.
- VASCONCELOS, R, G. Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento maternal e o desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar. 2013. 97 f.
- WANG, Z. et al. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 84–97, 2013.
- WOYTHALER, M. et al. Late preterm infants have worse 24-month neurodevelopmental outcomes than term infants. **Pediatrics**, v. 127, n. 3, p. 622-629, 2011.
- ZHU, C. et al. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 4, p. 1016–1027, 2006.