



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Papel da melatonina como neuroprotetora em  
alterações bioquímicas, comportamentais e  
morfológicas na prole de ratas Wistar submetidas  
à hipermetioninemia gestacional**

Paula Woltmann Figueiró

Orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**Papel da melatonina como neuroprotetora em  
alterações bioquímicas, comportamentais e  
morfológicas na prole de ratas Wistar submetidas  
à hipermetioninemia gestacional**

Paula Woltmann Figueiró

Orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do  
título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2017

## CIP - Catalogação na Publicação

Figueiró, Paula Woltmann  
Papel da melatonina como neuroprotetora em  
alterações bioquímicas, comportamentais e morfológicas  
na prole de ratas Wistar submetidas à  
hipermetioninemia gestacional / Paula Woltmann  
Figueiró. -- 2017.  
81 f.  
Orientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Hipermetioninemia gestacional. 2. Melatonina.  
3. Estresse oxidativo. 4. Deficit cognitivo. 5.  
Morfologia. I. Wyse, Angela Terezinha de Souza,  
orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa Angela T. S. Wyse, pela oportunidade de retornar aos estudos acadêmicos, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional.

À minha mãe Miriam, que muitas vezes deixou de realizar seus sonhos em prol dos nossos, por estar sempre ao meu lado, apoiando minhas decisões com muito amor e carinho, por ser pai, mãe, amiga, exemplo, uma guerreira que sempre insistiu na importância da nossa educação.

Ao meu irmão Lucas, por me ouvir sempre com atenção, agregando reflexões importantes para meu amadurecimento pessoal, por ser meu melhor amigo e companheiro desde o dia em que nasceu.

À minha cunhada Maria Clara pela amizade que criamos, pelo suporte psicológico nos momentos de dúvida, pelo apoio de sempre e pelas sugestões cheias de empatia e enriquecendo minhas escolhas, saiba que és uma irmã para mim.

A todas minhas amigas, que entenderam minha ausência devido os estudos e sempre me ajudaram a descontraír quando necessário.

Aos amigos e colegas do laboratório Dani, Fe, Eduardo, Carol Gessinger, Carol Prezzi, Cassi, Helena, Tiago, Carol Gasparin, Josi e demais colegas que contribuíram de algum modo na execução deste trabalho, pela companhia e por tornarem o meu dia-a-dia mais alegre.

À Profa Vanusa Manfredini da Universidade Federal do Pampa, pela colaboração neste trabalho.

À Profa Maria Cristina Heuser e à Franciele Rohden, pela colaboração neste trabalho.

À UFRGS e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica por essa oportunidade de ensino público de extrema qualidade.

Aos professores e funcionários da UFRGS e do Departamento de Bioquímica.

Ao CNPq e a CAPES pelo incentivo financeiro para a pesquisa.

Muito obrigada!

“A lei da mente é implacável.  
O que você pensa, você cria;  
O que você sente, você atrai;  
O que você acredita, torna-se realidade.”

Buda

“Na simplicidade aprendemos que reconhecer um erro não nos diminui,  
mas nos engrandece, e que as pessoas não existem para nos admirar,  
mas para compartilhar conosco a beleza da existência.”

Mário Quintana

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
1.1 Metabolismo Metionina .....	4
1.2 Hipermetioninemia gestacional .....	6
1.3 Estresse oxidativo .....	8
1.4 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase .....	9
1.6 Terapia antioxidante Melatonina .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
<b>3 METODOLOGIA E RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 Artigo científico .....	16
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>61</b>
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>63</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>8 ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
8.1 Anexo I - Carta de aprovação do comitê de ética .....	76

## RESUMO

A metionina é um aminoácido sulfurado essencial para o organismo. Quando os níveis de metionina no sangue estão acima de 45  $\mu\text{M}$  é caracterizada a hipermetioninemia, a qual pode ter sua origem hereditária, como na deficiência enzimática ou devido a causas não genéticas, como, por exemplo, uma dieta hiperproteica. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de hipermetioninemia gestacional induzida e os filhotes das ratas submetidas ao modelo apresentaram alterações bioquímicas, hepáticas, musculares, comportamentais, além de alterações a nível morfológico no cérebro da prole de 21 e 30 dias de vida. A melatonina é um hormônio envolvido no ritmo circadiano e tem efeitos antioxidantes importantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito neuroprotetor da melatonina sobre os prejuízos observados na prole de ratas hipermetioninêmicas em parâmetros bioquímicos (enzimas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, catalase, superóxido dismutase, conteúdo de sulfidrilas e índice de dano ao DNA), em testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris) e também realizamos análise morfológica, por microscopia eletrônica de transmissão, em córtex cerebral da prole. Fêmeas Wistar receberam metionina (2,68  $\mu\text{mol}$  /g de peso corporal) e/ou melatonina (10 mg /kg de peso corporal) por injeções subcutâneas durante toda a gravidez. Ratas controle receberam solução salina no mesmo volume. Após a execução dos testes comportamentais aos 30 dias vida, parte da prole sofreu eutanásia para posterior análise bioquímica, e outra parte dos filhotes foram perfundidos para posterior análise morfológica. Os resultados mostraram que a hipermetioninemia gestacional reduziu a atividade das enzimas antioxidantes e da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no encéfalo. A melatonina preveniu, completamente, a diminuição da atividade da enzima catalase e parcialmente da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. A metionina causou danos ao DNA da prole e a melatonina preveniu parcialmente o aumento desse índice, porém a melatonina apresentou uma ação *per se* neste parâmetro. Em relação aos testes comportamentais, os dados indicaram que filhotes expostos à hipermetioninemia gestacional passaram mais tempo na zona central no teste de campo aberto, não diferenciaram os objetos novos no teste de reconhecimento de objetos e obtiveram um tempo superior para localizar o quadrante alvo e a plataforma na tarefa labirinto aquático de Morris. A melatonina preveniu somente o déficit de memória na tarefa de reconhecimento de objetos. A microscopia eletrônica revelou alterações morfológicas das células neuronais da prole de ratas hipermetioninêmicas e melatonina preveniu tais efeitos. Esses achados sugerem que a melatonina pode ser útil como terapia neuroprotetora capaz de minimizar, pelo menos em parte, os efeitos prejudiciais da hipermetioninemia materna na prole.

**Palavras-chave:** Hipermetioninemia gestacional; Melatonina; Estresse oxidativo; Dano ao DNA; Deficit cognitivo; Morfologia.

## ABSTRACT

Methionine is an essential amino acid for the body. When blood methionine levels are above 45  $\mu\text{M}$  hypermethioninemia is characterized, which may have its hereditary origin, via (through) enzyme deficiency or due to non-genetic causes, such as a hyperproteic diet. Our research group has developed a chemical model of induced gestational hypermethioninemia and the pups of rats submitted to model presented biochemical, hepatic, muscular and behavioral changes, as well as alterations at the morphological level in the brains of the offspring from 21 and 30 days of life. Melatonin is a hormone involved in the circadian rhythm and has important antioxidant effects. The objective of the present study was to evaluate the neuroprotective effect of melatonin on the observed damages in the offspring of hypermethioninemic rats in biochemical parameters ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, catalase, superoxide dismutase, sulfhydryl content and DNA damage index), in behavioral tests (open field, object recognition and water maze task) and also performed morphological analysis, by transmission electron microscopy, in the cerebral cortex of offspring. Female Wistar rats received methionine (2.68  $\mu\text{mol/g}$  body weight) and /or melatonin (10 mg/kg body weight) by subcutaneous injections throughout the pregnancy. Control rats received saline solution in the same volume. After performing the behavioral tests at 30 days life, part of the offspring was euthanized for later biochemical analysis, and another part of the pups were perfused for later morphological analysis. The results showed that gestational hypermethioninemia reduced the antioxidant enzymes and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in the brain. Melatonin completely prevented the decrease of the activity of the catalase enzyme and partially of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Methionine caused damage to offspring DNA and melatonin partially prevented the increase of this index, but melatonin showed an action per se only in this parameter. Regarding behavioral tests, the results indicated that pups exposed to gestational hypermethioninemia spent more time in central area in open field test, did not differentiate the new objects in the recognition test, and obtained a higher time to locate the target quadrant and the platform in water maze test. Melatonin only prevented memory deficit in the object recognition task. Electron microscopy revealed alterations in morphological of cortical neural cells in offspring of hypermethioninemic rats and melatonin reversed such effects. These findings suggest that melatonin may be useful as neuroprotective therapy capable of minimizing, at least in part, the deleterious effects of maternal hypermethioninemia in offspring.

**Keywords:** Gestational hypermethioninemia; Melatonin; Oxidative stress; DNA damage; Cognitive deficit; Morphological.



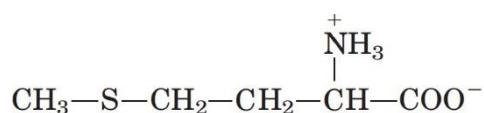
## LISTA DE ABREVIATURAS

- AFMK** - N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina  
**AMK** - N-acetil-5-methoxyquinuramina  
**ATP** - Adenosina trifosfato  
**CAT** - Catalase  
**CBS** - Cistationina  $\beta$ -sintase  
**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**ERO** - Espécies reativas de oxigênio  
**ERN** - Espécies reativas de nitrogênio  
**FoxO3a** - Forkhead box O3  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio  
**Hcy** - Homocisteína  
**MAT** - Metionina adenosiltransferase  
**Mel** - Melatonina  
**Met** - Metionina  
**MPTP** - Poro de transição de permeabilidade mitocondrial  
**mtDNA/RNA** - DNA, RNA mitocondrial  
**Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase** - Sódio, potássio ATPase  
**NCAM** - Moléculas de adesão celular neural  
**O<sup>2-</sup>** - Ânion Superóxido  
**3-OHM** - 3-hidroximelatonina  
**PB** - Tampão de fosfato  
**PBS** - Solução salina tamponada com fosfato  
**RI** - Índice de Reconhecimento  
**RMT** - Tarefa de memória de referência  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**SIRT3** - gene sirtuína 3  
**SNC** - Sistema nervoso central  
**SOD** - Superóxido dismutase  
 **$\Delta\psi_m$**  - Potencial de membrana mitocondrial

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Metabolismo de Metionina

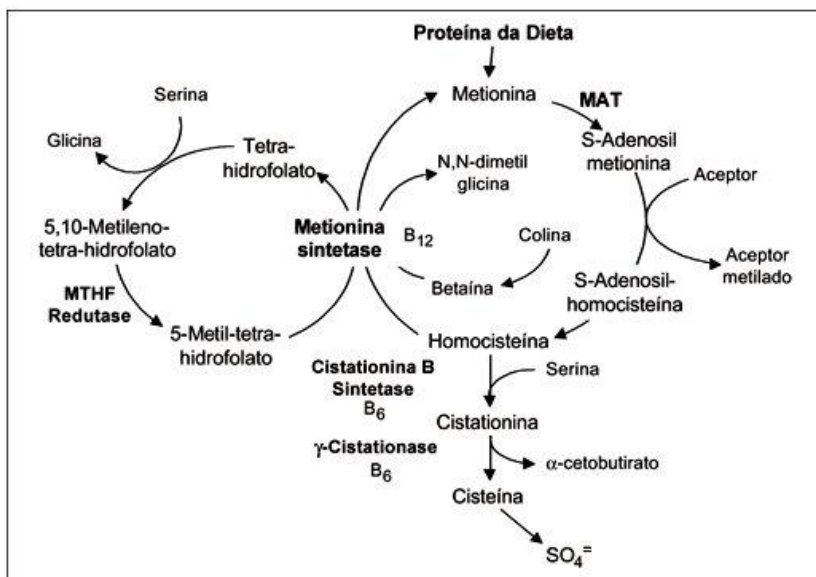
A metionina (Met) (Figura 1) é um aminoácido sulfurado essencial, proveniente da dieta ou da degradação de proteínas endógenas, sendo metabolizado principalmente no fígado. Dentre suas inúmeras ações, o aminoácido Met é precursor de succinil-CoA, homocisteína, cisteína, creatina e glutathione, além de ser o principal doador de grupamentos metila para a biossíntese de DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios (Cooper, 1983; Pirkov et al., 2008). Uma revisão elaborada por Kim e colaboradores (2014) indicou a contribuição de Met e cisteína para a estrutura e estabilidade das proteínas, devido sua relativa facilidade de reversibilidade em oxidação e redução indicando que ambos os aminoácidos podem atuar como antioxidantes, reguladores e sinalizadores (Kim et al., 2014).



**Figura 1.** Estrutura química da metionina.

A metionina adenosiltransferase (MAT) catalisa o primeiro passo da via metabólica da Met, a qual é responsável por transferir o grupo adenosil do ATP para a metionina, gerando S-adenosilmetionina (SAM). A síntese adequada de SAM é muito importante, pois a MAT está presente em todo organismo. Conhecem-se três formas de MAT (I, II, e III), que são codificadas por dois genes: MAT1A (codifica MAT I e III) e MAT2A (codifica MAT II). No segundo passo da rota, a SAM doa seu grupamento metil para outras moléculas, como os ácidos nucleicos. Após doação de seu grupamento, a

SAM passa a ser S-adenosil homocisteína (SAH), que posteriormente é hidrolisada em homocisteína (Hcy) e adenosina. A Hcy pode seguir por duas vias diferentes para ser metabolizada: remetilação ou transulfuração. Na via de remetilação, a Hcy recebe um grupamento metila da betaína ou do 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF) através de uma reação dependente de vitamina B12, reação esta catalisada pela enzima metionina sintase (MS). A Met é regenerada quando a homocisteína é remetilada (Finkelstein and Martin, 1986; Mato et al., 2008). Na via de transulfuração, a Hcy em uma reação catalisada pela enzima cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) tendo a vitamina B6 como cofator, é convertida em cistationina, a qual posteriormente é hidrolisada à cisteína e deste modo pode participar da formação da glutatona reduzida (GSH), um importante antioxidante (Maddineni et al., 2013) (Figura 2).



**Figura 2.** Metabolismo da metionina (adaptado de Mudd, 2001). MAT- metionina adenosil transferase; CBS - cistationina  $\beta$ -sintase; CL- cistationina  $\gamma$ -liase; MS- metionina-sintase; MTHFR- metileno tetrahidrofolato redutase; SAM- S-adenosil

metionina; SAH- *S*-adenosil homocisteína; THF- tetrahydrofolato; 5,10-MTHF- 5,10-metileno-tetrahydrofolato.

A Met é um aminoácido importante para o desenvolvimento e o crescimento normal dos tecidos, desempenhando um papel essencial na manutenção das metilações biológicas e na homeostase redox da célula. Deste modo, seu metabolismo deve ser cuidadosamente controlado, isto ocorre pela concentração de AdoMet, que pode ativar ou inibir enzimas importantes, regulando a velocidade da rota metabólica (Finkelstein 2007).

## 1.2 Hipermetioninemia gestacional

Os níveis plasmáticos normais de Met variam de 13 a 45  $\mu\text{M}$  e a hipermetioninemia é caracterizada quando esses valores são ultrapassados no sangue, o que pode ser uma consequência de diferentes condições genéticas ou não. As causas não genéticas têm origem em doenças hepáticas que alterem a atividade da enzima MAT; o nascimento prematuro pode atrasar a maturação desta enzima, geralmente de modo transitório; sendo que uma dieta de 7 g/kg de proteína por dia pode elevar as concentrações de Met plasmática para 1206  $\mu\text{M}$  (Levy et al., 1969; Mudd, 2011).

Com relação às causas hereditárias, a mais comum hipermetioninemia é a deficiência genética isolada da MAT, enzima responsável por catalisar a síntese de *S*-adenosilmetionina (AdoMet) a partir de Met e ATP. Nesta situação, os níveis sanguíneos de metionina podem atingir até 2500  $\mu\text{mol/l}$ . A hipermetioninemia também pode ser consequência da homocistinúria clássica, que é definida pela deficiência da enzima cistationina  $\beta$ -sintase e leva ao acúmulo de homocisteína, pois a sua conversão à cistationina fica prejudicada. O acúmulo de Hcy faz com que aumentem os níveis de Met, pois a Hcy é remetilada a Met pela ação da enzima metionina sintase através da

transferência do grupamento metil para a Hcy, numa reação dependente de vitamina B12. O grupamento metil é proveniente do 5-metiltetrahidrofolato. Outras causas para hipermetioninemia incluem a tirosinemia ou galactosemia (Chamberlin et al., 1996; Mudd et al., 2000, 2011).

As manifestações clínicas dos pacientes afetados pela hipermetioninemia são variáveis de acordo com níveis de Met. As alterações neurológicas revelam-se como déficit cognitivo, retardo mental, edema cerebral e desmielinização, porém os mecanismos ainda não estão totalmente elucidados (Mudd et al, 2000, 2001). Estudos que utilizam modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstram que o excesso de Met gera toxicidade cerebral, alterando o estado redox e diminuindo a atividade de importantes enzimas relacionadas à homeostase celular (Stefanello et al., 2007a, 2007b, 2011; Costa et al., 2013).

Em um modelo de hipermetioninemia gestacional foi demonstrado que a neurotoxicidade de metionina durante o período natal diminuiu a atividade das enzimas cerebrais Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase e Mg<sup>2+</sup>-ATPase (Schweinberger et al., 2014). Devido ao fato do cérebro fetal ser suscetível a inúmeras condições adversas no ambiente materno, os estudos nesta linha continuaram. Outros estudos demonstraram que a hipermetioninemia gestacional induziu estresse oxidativo, diminuiu os níveis de neurotrofinas, causou ruptura do metabolismo energético, comprometeu a memória, ademais alterou a estrutura de células neurais dos filhotes (21 e 30 dias de vida) de ratas hipermetioninêmicas (Schweinberger et al., 2014; 2017a; 2017b).

### 1.3 Estresse oxidativo

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) ocorre naturalmente durante o metabolismo energético, aproximadamente 5% do oxigênio consumido não é completamente reduzido a água, gerando assim as espécies reativas, as quais em altas concentrações causam danos aos sistemas biológicos. Em quantidades normais as ERO desempenham papel importante na defesa do organismo contra agentes infecciosos, na regulação da síntese proteica e nos processos de sinalização celular (Halliwell and Gutteridge, 2007; Halliwell, 2012).

As principais espécies reativas são as de oxigênio, como ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), radical hidroxil ( $\text{OH}\bullet$ ), e os não radicais peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o "oxigênio singlet" ( $^1\text{O}_2$ ). Do mesmo modo, em diferentes processos no organismo pode ocorrer a produção das espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo as principais o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Halliwell, 2014). Em condição celular normal, as espécies reativas geradas podem ser eliminadas por defesas antioxidantes, as quais podem ser enzimáticas e não enzimáticas (Halliwell, 2006a). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres ultrapassa a capacidade do organismo de neutralizá-los, gerando danos às proteínas, lipídeos e ao ácido desoxirribonucleíco (DNA) da célula. Estudos têm demonstrado que o desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes estão associados com a ocorrência de doenças neurodegenerativas (Dröge, 2002; Halliwell, 2006b; Miller et al., 2015).

As defesas antioxidantes são responsáveis por eliminar as espécies reativas. Os antioxidantes enzimáticos são as enzimas: superóxido dismutase (SOD), que dismuta o ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a catalase (CAT) que cliva o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 2 moléculas  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  e a glutathiona peroxidase (GPx), que decompõe o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,

através do seu desacoplamento a  $H_2O$  com a concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG). Em contrapartida, as defesas antioxidantes não enzimáticas são compostas pela GSH, assim como pelas vitaminas C (ácido ascórbico) e E (alfa-tocoferol), além de compostos carotenoides e flavonoides (Gutteridge and Halliwell, 2010). A ausência ou a redução do sistema antioxidante da célula contribui para o desenvolvimento do estresse oxidativo/nitrativo (Li et al., 2013).

O papel do estresse oxidativo está bem descrito na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Uttara et al., 2009; Kamat et al., 2016), erros inatos do metabolismo (Olsen et al., 2015), doenças cardiovasculares (Misra et al., 2009), isquemia, câncer, diabetes e envelhecimento (Halliwell, 2012). Neste contexto, a melatonina tem sido demonstrada como um agente antioxidante importante em inúmeras condições patológicas (Pandi-Perumal, et al., 2013; Wilhelm et al., 2013; Reiter et al., 2017).

#### **1.4 $Na^+, K^+$ ATPase**

A enzima  $Na^+, K^+$ -ATPase é uma proteína oligomérica, transmembrana e está largamente distribuída nos tecidos. É responsável pelo controle dos potenciais de membrana, uma vez que exporta íons  $Na^+$  para fora da célula e importa íons  $K^+$ , permitindo a geração de alta concentração de sódio extracelular e alta concentração de potássio intracelular. Este transporte de íons ocorre contra o gradiente de concentração e a energia necessária para esse processo é proveniente das moléculas de ATP, deste modo, a enzima demanda uma alta taxa energética consumindo em torno de 60% do ATP formado no cérebro. O potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) é essencial para as transmissões

sinápticas, regulação do volume e pH celular, transporte de moléculas ligadas ao  $\text{Na}^+$ , como glicose, aminoácidos, neurotransmissores, dentre outros (Kaplan, 2002).

Devido à importância da manutenção do gradiente iônico para diversas funções da célula, como a excitabilidade celular, regulação do potencial de repouso e modulação de neurotransmissores, a inibição da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pode ser extremamente prejudicial para o sistema nervoso central (SNC) (Illarionova et al., 2010; Holm and Lykke-Hartmann, 2016). Alguns estudos revelam a relação entre a redução da atividade dessa enzima com o prejuízo da consolidação da memória e aprendizagem no hipocampo de ratos Wistar (Wyse et al., 2004; Vanzella et al., 2017). Além disso, disfunção na sua atividade pode levar a oscilações no potencial de membrana, despolarizações prolongadas ou repetidas. Há muitas referências que apontam uma correlação entre a inibição dessa enzima com a fisiopatologia de doenças que afetam o SNC, tais como isquemia (Wyse et al., 2000), doença de Alzheimer (Vitvitsky et al., 2012), distúrbios neuropsiquiátricos (Goldstein et al., 2006; Banerjee et al., 2012) e erros inatos metabolismo (Zanatta et al., 2015; Kolling et al., 2016).

Sabe-se que a enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é particularmente sensível ao estresse oxidativo, uma vez que as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) podem levar à inativação de proteínas ao oxidar seus grupamentos sulfidrilas (SH). Além disso, os radicais livres podem causar a lipoperoxidação, alterando a fluidez da membrana na qual a enzima está inserida, este processo é devido a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados intimamente ligados à estrutura da enzima, como fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina, sensíveis à ação das ERO/ERN (Stefanello et. al, 2005; Cornelius et al., 2015). Estudos indicam que a Met e/ou seus metabólitos, como a Hcy, podem induzir estresse oxidativo em diferentes tecidos, tais como cérebro, coração, fígado e pulmão (Kolling et al., 2011; Stefanello et al., 2011; Ai et al., 2017), sugerindo que a



redução da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no cérebro da prole de ratas hipermetioninêmicas seja causada pelo desbalanço entre a produção e eliminação das ERO/ERN (Schweinberger et al., 2014; de Lores Arnaiz and Ordieres, 2014).

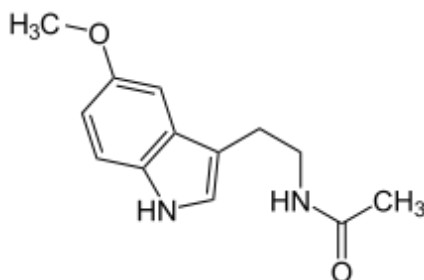
Apesar da importância das ERO/ERN para sinalização e modulação da plasticidade sináptica no desenvolvimento da memória (Massad and Klann, 2011), podemos observar alterações cognitivas em situações de desequilíbrio oxidativo, principalmente naqueles que envolvem mudanças na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, uma vez que a mesma está relacionada com mecanismos de memória conforme demonstrado em diversos estudos (Moseley et al., 2007; dos Santos et al., 2017; Vanzella et al., 2017).

O SNC é mais vulnerável ao estresse oxidativo, devido à grande quantidade de oxigênio consumido neste órgão, gerando assim maior produção de ERO. Outro fator pertinente são suas altas concentrações de metais de transição, como ferro, podendo ocorrer a reação de Fenton com ânion superóxido e formar radical hidroxila, o qual demonstra-se mais reativo e danoso para biomoléculas celulares (Gozzelino, 2016). O arranjo das membranas neurais é composto de ácidos graxos poli-insaturadas, suscetíveis ao roubo de elétrons realizado pelas espécies reativas, gerando uma disfuncionalidade da membrana, alterando sua permeabilidade e fluidez (Halliwell, 2006a; Cobb and Cole, 2015).

## **1.5 Terapia antioxidante com melatonina**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 3) é um hormônio liberado principalmente pela glândula pineal e outros tecidos em menor proporção e essa molécula deriva do triptofano, sendo a serotonina sua precursora. Ela controla o ritmo sazonal e circadiano, o ciclo sono-vigília, além disso apresenta ações antioxidantes,

anticancerígenas e na melhora da qualidade do sono. Seu pico de liberação ocorre no ciclo escuro do sono e ação da luminosidade nos seus receptores da retina pode inibir sua síntese noturna (Reiter et al., 2014a; Ganie et al., 2016).



**Figura 3.** Estrutura química da Melatonina

Estudos revelam que a melatonina age sobre a maturação fetal e homeostase placentária, exercendo uma proteção nos folículos ovarianos, ajudando no desenvolvimento do oócito e reduzindo o dano oxidativo e sua concentração pode aumentar ao longo da gestação (Tamura et al., 2012; Reiter et al., 2014b). A melatonina é uma molécula anfifílica com capacidade de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica, atuando assim como agente neuroprotetor durante o período natal e em condições de neurodegeneração (Jahnke et al., 1999; Voiculescu et al., 2014; Miller et al., 2015). Portanto, essa substância pode ajudar preventivamente em gravidezes de risco, uma vez que atua em mecanismos epigenéticos, antioxidantes e antiapoptóticos (Baydas et al., 2007; Chen et al., 2013).

Devido seu anel indol aromático, a melatonina é considerada uma indolamina. Tanto a melatonina, quanto seus metabólitos agem como sequestradores diretos de ERO/ERN. Porém a melatonina difere de outros antioxidantes, posto que não se submete a ciclos de redução/oxidação; uma vez oxidada, não pode ser regenerada a sua forma

reduzida. Isso ocorre porque a melatonina forma intermediários estáveis após a reação com radicais livres, o que a torna um antioxidante terminal. Esse aspecto é importante, uma vez que a melatonina pode doar dois elétrons, não apenas um, garantindo assim que não se torne um radical livre durante seu metabolismo (Tan et al., 2000).

A capacidade da melatonina em neutralizar radicais livres ocorre continuamente pela ação de seus metabólitos AFMK (N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina, AMK (N-acetil-5-metoxiquinuramina) e cíclico 3-OHM (3-hidroxi-melatonina), os quais quando metabolizados geram uma cascata de remoção dos radicais livres (Tan et al., 2007; Reiter et al., 2007). Estudos demonstraram que a melatonina pode aumentar indiretamente a expressão e os níveis de antioxidantes enzimáticos, como catalase e glutathione. A melatonina auxilia na homeostase da mitocôndria, pois ela pode aumentar a eficiência da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, evitando o desacoplamento do complexo IV, reduzindo desta forma a produção de ERO (Kotler et al., 1998; Acuña-Castroviejo et al., 2003; Tomas-Zapico e Coto-Montes, 2005).

Além das evidências sobre a ação antioxidante, a melatonina também demonstra ter atividades imunomoduladoras, uma vez que esta indolamina controla a expressão de proteínas anti e pró-apoptóticas, inibe caspases, regula a produção de citocinas, diminui a infiltração de células polimorfonucleares, evitando a morte celular programada (Ferreira et al., 2010; Najafi et al., 2017; Caballero et al., 2017). Existem achados mostrando que a melatonina modula a plasticidade neuronal, evitando atraso na maturação cerebral de ratos com hiperhomocisteinemia induzida (Baydas et al., 2008), deste modo melhorando os efeitos patológicos causados pela Hcy durante a gestação.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Considerando que estudos prévios do nosso laboratório mostraram que filhotes de ratas submetidas à hipermetioninemia durante a gestação apresentaram alterações metabólicas, histológicas e comportamentais, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos da melatonina como agente neuroprotetor sobre parâmetros bioquímicos, comportamentais e morfológicos em encéfalo e/ou córtex da prole de ratas Wistar submetidas à hipermetioninemia gestacional.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Investigar o efeito da hipermetioninemia gestacional e/ou melatonina sobre atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em encéfalo da prole;
2. Avaliar o efeito da hipermetioninemia gestacional e/ou melatonina sobre atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) em encéfalo da prole;
3. Investigar o efeito da hipermetioninemia gestacional e/ou melatonina sobre o conteúdo sulfidrilado em encéfalo da prole;
4. Analisar o efeito da hipermetioninemia gestacional e/ou melatonina sobre o índice de dano ao DNA em encéfalo da prole;
5. Verificar se a melatonina previne os prejuízos da memória espacial da prole aos 30 dias de vida, de ratas submetidas à hipermetioninemia, em testes comportamentais, como: campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris.
6. Analisar a morfologia de córtex cerebral da prole de ratas submetidas à hipermetioninemia gestacional e/ou melatonina por microscopia eletrônica de transmissão.

### **3 METODOLOGIA E RESULTADOS**

Os materiais e métodos e os resultados serão apresentados na forma de artigo científico.

**Melatonin as Adjuvant Therapy for Biochemical, Behavioral and Morphological Changes Caused by Gestational Hypermethioninemia in Wistar Rats Offspring**

**Paula W. Figueiró, Daniella de S. Moreira, Tiago M. dos Santos, Caroline A. Prezzi, Francieli Rohden, Maria Cristina Faccioni-Heuser, Vanusa Manfredini, Carlos A. Netto, Angela T.S. Wyse**

**Periódico:** Molecular Neurobiology

**Status:** Submetido

### 3.1 Artigo científico

#### **Melatonin as Adjuvant Therapy for Biochemical, Behavioral and Morphological Changes Caused by Gestational Hypermethioninemia in Wistar Rats Offspring**

**Paula W. Figueiró<sup>a,b</sup>, Daniella de S. Moreira<sup>a,b</sup>, Tiago M. dos Santos<sup>a,b</sup>, Caroline A. Prezzi<sup>b</sup>, Francieli Rohden<sup>a</sup>, Maria Cristina Faccioni-Heuser<sup>a,d</sup>, Vanusa Manfredini<sup>e</sup>, Carlos A. Netto<sup>a,c</sup>, Angela T.S. Wyse<sup>a,b,c</sup>**

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica; <sup>b</sup> Laboratório de Neuroproteção e Doenças Neurometabólicas; <sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

<sup>d</sup> Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

<sup>e</sup> Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 592, Caixa Postal 118, Uruguaiana, RS, 97508-000, Brazil

**Address reprint requests to:** Dra. Angela T. S. Wyse, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: 55 51 3308 5573, Fax: 55 51 3308 5535, E-mail: [wyse@ufrgs.br](mailto:wyse@ufrgs.br)

## ABSTRACT

Elevated levels of methionine in blood characterize the hypermethioninemia, which may have hereditary or non-genetic origin (from diet high protein). Studies showed that rat pups borned from hypermethioninemic mothers presented cerebral oxidative stress, inhibition of  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, memory deficit and morphological cerebral changes. Melatonin is a hormone involved in circadian rhythm and has antioxidant effects. The aim of this study was to verify the possible neuroprotective effects of melatonin administration in hypermethioninemic pregnant rats on biochemical parameters ( $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -ATPase, catalase, superoxide dismutase, sulfhydryl content and DNA damage index); behavior (open field, novel object recognition and water maze tasks); and effect in cels morphology by electron microscopy in offspring of 30-days-old. Wistar female rats received methionine (2.68  $\mu\text{mol/g}$  body weight) and/or melatonin (10 mg/kg body weight) by subcutaneous injections during entire pregnancy. Control rats received saline. Results showed that gestational hypermethioninemia reduced all biochemical parameters analyzed in encephalon. Melatonin prevented only decrease of catalase activity. Methionine caused DNA damage in offspring and melatonin partially prevented this index. Regarding to behavioral tests, data showed that pups exposed to gestational hypermethioninemia decreased reference memory in water maze, did not differentiate the objects in the recognition test and spent more time in central zone of the open field test. Melatonin was able to prevent memory deficit in object recognition task. Electron microscopy revealed morphological alterations in neural cells of hypermethioninemic and melatonin reversed such effects. These findings suggest that melatonin may be a neuroprotective agent to minimize the harmful effects of maternal hypermethioninemia on offspring.

**Keywords:** Gestational hypermethioninemia; Melatonin; Oxidative stress; DNA damage; Memory; Morphological.

## 1. INTRODUCTION

Methionine (Met) is an essential sulfur amino acid with plasma levels in the range of 13-45  $\mu\text{mol/L}$ ; values above 45  $\mu\text{mol/L}$  characterize hypermethioninemia. The most common cause of isolated hypermethioninemia is the genetic deficiency of methionine adenosyltransferase (MAT), the enzyme that catalyzes the synthesis reaction of S-adenosylmethionine (AdoMet) from Met and ATP [1]. Other conditions such as homocystinuria (genetic deficiency of the enzyme cystathionine  $\beta$ -synthase), liver problems and hyperproteic diets can also increase plasma Met levels [1-3]. Pre-clinical studies have suggested that brain damage caused by hypermethioninemia may be due to an oxidative status imbalance, which results in the increased production of reactive oxygen species (ROS) and/or from diminished levels of antioxidants [4-8]. It is well-known that changes in oxidative status can alter biomolecules such as protein, lipid and DNA [9].

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is a transmembrane protein that controls membrane potentials since it exports  $\text{Na}^+$  ions from the cell and imports  $\text{K}^+$  ions, allowing for the maintenance of the ionic gradient. Its activity is important for several functions of the cell, such as cellular excitability, regulation of resting potential and modulation of neurotransmitters [10, 11].  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is sensitive to oxidative stress due to its sulfhydryl components that can be oxidized by reactive species, and due to the lipid composition of the membrane in which it is inserted [4]. Recent studies have demonstrated that changes in the redox status and in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity may also occur in the brain of offspring borned from hypermethioninemic in rat dams. The fetal brain is susceptible to various adverse conditions in the maternal environment and neurotoxicity challenges during the prenatal period can lead to biochemical, morphological and behavioral changes in the offspring [7, 12, 13].



It was recently shown [13] that gestational hypermethioninemia impaired memory and altered neural cells morphological in the offspring at 21 and 30 days of age, suggesting that the cell morphological changes caused by maternal hypermethioninemia may be, at least partly, associated to memory deficits in the rat offspring. Since there is strong evidence that the neurological injury caused by hypermethioninemia occurs due to oxidative stress, antioxidant molecules may be useful to avoid such harmful effects.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a hormone released primarily by the pineal gland [14, 15], and well known for its circadian regulation. It has been recently recognized its production by many other cells and organs [16]. Melatonin (Mel) also acts as direct scavenger of reactive oxygen and nitrogen species, reducing lipid peroxidation and cellular damage caused by free radicals [17-19]. According to Martín and colleagues [20], melatonin can increase the efficiency of the mitochondrial electron transport chain, as it avoids the decoupling of complexes I and IV, thus reducing ROS production. There are studies also showing that in the follicles melatonin also presumably aids in the development of the oocyte and protects it from oxidative damage [21-23]. Therefore, this substance may help preventively in risky pregnancies since it engages in redox and epigenetic mechanisms [24, 25]. It has been shown that administration of melatonin can be rapidly transferred from the maternal circulation into the fetal circulation and brain tissue [22, 26]. Studies also suggest that melatonin metabolites (N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, AFMK and N-acetyl-5-methoxykynuramine, AMK) negatively regulate pro-oxidative and proinflammatory enzymes [27].

Considering available evidence gestational hypermethioninemia alters  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, antioxidant enzymes, sulfhydryl content and memory, as well as neural cells morphology by electron microscopy in the offspring, the aim of the present study was to verify whether the administration of melatonin to hypermethioninemic pregnant rats

could prevent the brain biochemical, morphological and behavioral changes in the offspring. We also analyzed the effect of gestational hypermethioninemia and/or melatonin on DNA damage index in the encephalon. The working hypothesis is that melatonin, due to its scavenger action, will prevent biochemical, morphological and behavioral effects of gestational hypermethioninemia observed in the offspring.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals and reagents**

90 days-old-female Wistar rats were obtained from the Central Animal House of Department of Biochemistry at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, in Porto Alegre, Brazil. They were maintained in light/dark cycles of 12/12 h at constant temperature ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ), with free access to water and commercial food protein (20%). Experimental protocol followed the official governmental guidelines issued by the Brazilian Federation of Societies for Experimental Biology, following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (No. 80-23, revised 1996) and Arouca Law (Law no. 11.794/2008). This research project was approved by the Ethics Committee in Research of Universidade Federal do Rio Grande do Sul under protocol number 31251.

### **2.2 Chronic Methionine treatment**

Rats with confirmed pregnancy received two daily subcutaneous injections of Met throughout the gestational period (about 21 days) every 12 hours. The dose chosen was  $2.68 \mu\text{mol Met/g}$  body weight in a maximum volume of 2 mL [7]. This dose was chosen based on previous work, which demonstrated that this protocol induces plasma levels of Met around 30-fold higher (approximately 2 mM) than normal levels [28]. Control rats received saline at the same volume. 30-days-old pups were submitted to behavior tests

and after 12 hours, animals were killed by decapitation for removal of encephalon.

### **2.3 Chronic Melatonin treatment**

Rats received a daily subcutaneous injection of melatonin throughout the gestational period (21 days) in the evening period. The dose chosen was 10 mg/kg of weight the animal in a maximum volume of 1.5 mL, according to Baydas et al. [29]. Control rats received saline solution in equivalent volume.

### **2.4 Tissue and homogenate preparation**

After decapitation, without anesthesia, the brain was removed and immediately divided into two parts. The first part was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of Medium buffer for determining the activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. The second part was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of buffer solution (sodium phosphate 20 mM, KCl 140 mM, pH 7.4) for determining oxidative stress parameters.

## **2.5 BIOCHEMICAL ANALYZES**

### **2.5.1 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity assay**

The reaction mixture for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in final volume of 200 mL. The reaction begins by addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as reported by Wyse et al [30]. Released inorganic phosphate (Pi) was measured

by the method of Chan et al [31]. Specific activity of the enzyme was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicate.

### **2.5.2 Catalase activity assay**

Catalase (CAT) activity was measured as previously described by Aebi [32]. This assay is based on the disappearance of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) at 240 nm in a medium with 20 mM  $H_2O_2$ , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 0.1–0.3 mg protein/ml. The specific activity is expressed in units/mg protein using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies). One CAT unit was defined as one  $\mu$ mol of  $H_2O_2$  consumed per min.

### **2.5.3 Superoxide dismutase activity assay**

To determine superoxide dismutase (SOD) activity, measurement is based on the capacity of pyrogallol to auto-oxidize, a process dependent on superoxide (substrate for enzyme). The inhibition of the auto-oxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly measured at 420 nm using SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) [33]. SOD activity was calculated using a calibration curve performed with purified SOD as standard.

### **2.5.4 Sulfhydryl content**

This technique was performed as described by Aksenov and Markesbery [34], this method is based on the reduction of 5,50-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which become oxidized (disulphide), generating the yellow derivative thionitrobenzoic acid (TNB) whose absorption was determined at 412 nm using a

Beckman DU1 640 spectrophotometer. The sulfhydryl content is inversely correlated with oxidative impairment to proteins. Results were expressed as nmol TNB/mg protein.

### **2.5.5 Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)**

This technique uses alkaline comet assay and was performed as described by Singh et al [35] in accordance with general guidelines for use of the comet assay [36]. Encephalon of the pups was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 800g for 10 min at 4 °C. Supernatants were suspended in agarose and spread into glass microscope slides pre-coated with agarose, settled at 4 °C for 5 min. In order to maintain DNA as "nucleoids", slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0, and 1% triton X-100 with 10% DMSO) to remove cell proteins. After lysis process, slides were placed on a horizontal electrophoresis chamber, covered with a fresh solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4°C to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 315 mA; 0.9 V/cm). Slides were then neutralized, washed in bi-distilled water, stained using a silver staining protocol by Maluf and Erdtmann [37] and left to dry at room temperature overnight. Last, one hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were arbitrarily chosen and analyzed using an optical microscope. Cells were visually scored from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) based on tail length and intensity. Accordingly, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). Slides were analyzed by two researchers (F, M) blind to animal's experimental condition.

### **2.5.6 Protein determination**

Protein concentration was measured by the method of Lowry et al [38] for oxidative stress analyses and Bradford [39] for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity assay, both using bovine serum albumin as standard.

## **2.6 BEHAVIORAL TESTING**

The tests were performed with male offspring, thirty days of life, in a quiet room, with adequate lighting for animal comfort. The order of execution appears below with 24-hour interval between each test.

### **2.6.1 Open field test**

The open field test was performed to evaluate locomotor and exploratory activities, besides being a habituation for the subsequent tests. The apparatus consists of a wooden box (55×40×50 cm) with a dark floor divided by white lines into 12 areas in computer acquisition. The animals were placed in front of the lower left corner of the box and spontaneous motor activity was observed as the distance traveled over 5 minutes [40, 41]. The behavioral parameters were recorded and later elaborated with an automated system of monitoring (Any-maze; Stoelting, Wood Dale, IL, USA).

### **2.6.2 Novel object recognition**

The novel object recognition task assesses declarative memory [42]. In the first step (familiarization session), the animal was placed in the arena containing two identical objects (A1 and A2) for 5 min and the time spent in the exploration of each object was recorded. In the second phase, 1 h after familiarization, each animal was exposed to two objects placed in the same open-field box: one familiar object (A1), used in the first

phase, and one novel object (B). The time spent exploring the novel object and the familiar object was measured based on Ennaceur and Delacour [43] and adapted from the task by Ouchi et al [44]. After 24 h, other test session was performed, and the animal was returned to the arena for 5 min with two objects: the familiar object (A1) and a second novel object (C). The time devoted to each object was registered. Recognition Index (RI) was determined through the division of the time devoted to novel object by the total time spent exploring both objects [45].

### **2.6.3 Morris water maze**

The cognitive status of the animals about spatial learning and memory was assessed in the water maze as described previously [46, 47]. The water maze apparatus consisted of a black round tank, 200 cm in diameter and 100 cm high, filled to a depth of 50 cm with water, maintained at constant temperature (23°C). The tank was theoretically divided into four equal quadrants for analysis. Several distal visual cues were placed on the walls of the room. Trials and data were captured by a video kit positioned above the center of the tank and recorded and analyzed using dedicated software (ANY-maze; Stoelting, Wood Dale, IL, USA).

### **2.6.4 Reference memory task (RMT)**

The RMT consisted of five training sessions and one test session [48, 49]. During the training sessions, the platform remained fixed between the south-western quadrants. In the acquisition phase, the animals were trained once a day for six consecutive days to find the platform. At this stage, the animals were placed in water with their faces facing the tank wall at each of the four starting points (N, S, W and E) with a 5-minute interval for each point. For each starting point, the animals remain for a maximum of 60s in the

water to find the platform. If the rat does not find the platform, they were oriented to it and remained there for 10s. Starting points were changed every day, and these were not repeated on the other training day. The latency to find the platform on each day was recorded. On the 5th day, the rats were subjected to a probing test with the platform removed; they were dropped in the quadrant opposite to what the platform was. In the test, we determined the spatial memory, the time in the opposite quadrant, the time spent in the target quadrant (the location platform quadrant in the training sessions), the latency for the first entry in the platform zone and the number of crossings in the target [39].

## **2.7 MORPHOLOGICAL PARAMETER**

### **2.7.1 Transmission Electron microscopy**

This technique was performed in cerebral cortex and analyzed as described by Souza [50] and adapted according to Schweinberger et al [12]. First, cardiac perfusion was performed with 0.9% saline solution and then with paraformoldehyde 4% plus glutaraldehyde 2.5% in 0.1M phosphate buffer (PB) at room temperature. We divide the cortex of pups in vibratomo (50  $\mu\text{m}$ ), the slices (1 mm) were immersed again in the same fixative solution. After, they were washed in PB and fixed in 1% osmium tetroxide,  $\text{OsO}_4$  (Sigma-Aldrich) in PB, pH 7.4 for one hour at room temperature. They were washed again with PB and then dehydrated gradually with acetone (MERCK) and soaked in epon resin. The polymerization was carried out for 48 hours at 60° C. Semi-thin sections were made in the thickness of 1  $\mu\text{m}$  were prepared with an ultramicrotome and stained with 1% toluidine blue. Ultra-fine cuts were obtained in ultramicrotome for the assembly of copper grids (200 mesh). The samples of cortex were counterstained with 1% uranyl



acetate and then with 1% lead citrate (MERCK), examined in transmission electron microscopy (JEM 1200 EXII, Japan).

## **2.8 Statistical determination**

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Tukey's test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All analyzes and plots were performed using GraphPad Prism 5.1 software program in a compatible computer.

## **3. RESULTS**

### **3.1 Effect of gestational hypermethioninemia and melatonin prevention on biochemical analyzes in encephalon of the offspring**

Figure 1 shows that maternal hypermethioninemia significantly decreased  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in encephalon of 30 days-old pups [ $F(3, 15) = 4.42$ ;  $p < 0.05$ ]. Melatonin *per se* did not alter this parameter.

With respect to oxidative stress parameters, Figure 2 shows that Met significantly reduced the activities of CAT (A) [ $F(3, 18) = 11.12$ ;  $p < 0.05$ ] and SOD (B) [ $F(3, 20) = 10.61$ ;  $p < 0.01$ ], as well as sulfhydryl content (C) [ $F(3, 16) = 18.8$ ;  $p < 0.01$ ] in encephalon of pups. Melatonin prevented the decrease in CAT activity, but it was not able to prevent the decrease in SOD and sulfhydryl content. Melatonin had no effect *per se* on antioxidant enzymes.

### **3.2 Effect of gestational hypermethioninemia and melatonin prevention on detection of DNA damage in encephalon of the offspring**

Figure 3 shows that maternal hypermethioninemia significantly increased DNA damage index in the brains of 30-days-old pups [ $F(3, 20) = 2236$ ;  $p < 0.01$ ]. Melatonin *per se* did change this parameter [ $p < 0.01$ ] and the offspring of mothers who were treated with Met + Mel combined showed a partial reduction of the damage caused by methionine [ $p < 0.01$ ].

### **3.3 Effect of gestational hypermethioninemia and melatonin prevention on behavioral parameters of offspring**

We evaluated the effect of gestational hypermethioninemia on the open field test. First, we did not find differences in crossing lines and distance traveled when comparing groups with control. However, the time spent at the central zone was higher in the pups exposed to Met during intrauterine development and melatonin was not able prevent this effect. Melatonin did not show an action *per se* in this test [ $F(3, 41) = 4.23$ ;  $p < 0.05$ ] (Table 1).

Regarding the object recognition test, the exploration of the objects in the training session maintained a pattern among the groups, about 50% of the time on each object (Figure 4A). At 1 hour [Figure 4B;  $F(3, 44) = 8.71$ ;  $p < 0.01$ ] and 24 hours [Figure 4C;  $F(3, 44) = 20.99$ ;  $p < 0.01$ ] test sessions, the animals whose mothers were exposed to Met explored equally the familiar object (Obj A1) and the new object (Obj B or C), and the Met + Mel group had a longer exploration in the novel object, demonstrating that melatonin reversed this effect. Besides, offspring whose mothers were treated with Met had decreased index of recognition objects, and melatonin reversed this effect [ $F(3, 44) = 12.18$ ;  $p < 0.05$ ] (Figure 4D).

Spatial memory was assessed by the water maze test. Results show that pups whose mothers were treated with Met presented a deficit in reference memory acquisition

[F(3, 44)= 1.88;  $p < 0.05$ ], requiring more time to find the platform at the 5th day of training when compared to the control animals (Figure 5A). It is showed that the offspring born to hypermethioninemic mothers crossed the platform less frequently in the probe trial, and that melatonin was not able to reverse this effect [Figure 5B; F(3, 44)= 5.77;  $p < 0.05$ ]. Other variables assessed in the probe trial were: the time animals spent in the target quadrant [saline ( $27.17 \pm 8.5$ ), melatonin ( $21.32 \pm 9.4$ ), methionine ( $17.31 \pm 6.2$ ), Met + Mel ( $14.39 \pm 7.1$ )] and the time spent in the opposite quadrant [saline ( $8.2 \pm 4.8$ ), melatonin ( $15.27 \pm 7.2$ ), methionine ( $16.96 \pm 4.1$ ), Met + Mel ( $23.49 \pm 12.2$ )]. These results show that Met decreased the time spent in target quadrant [F(3, 44)= 5.34;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ] and increased time spent in the opposite quadrant [F(3, 44)= 7.58;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ]; however melatonin failed to prevent these effect caused by gestational hypermethioninemia. Melatonin did not show an action *per se* in this test.

### **3.4 Effect of gestational hypermethioninemia and melatonin prevention on electron microscopy in cerebral cortex of the offspring**

The electron microscopy of the cerebral cortex of pups whose mothers received saline (Figure 6) presented well defined nucleus and karyotheca, with well delimited bilayer membrane, also presented well preserved organelles with intact mitochondria. The melatonin offspring's (Figure 7) obtained similar micrographs to controls, only partial dilation of Golgi complex and reticulum, but all other well preserved structures. On the other hand, the electron micrographs of pups from hypermethioninemic mothers (Figure 8) showed a decrease in number of organelles, neural cells with disorganized cytoplasm, vesiculation near the nucleus, discontinuity of the karyotheca, disarranged mitochondria, some with their cristae corroded and others with mitochondrial swelling, in addition they presented lipofuscin in the cytoplasm. Structures such as the Golgi complex

and rough endoplasmic reticulum with vacuoles and dilated. The micrographs of offspring whose mothers treated with Met + Mel (Figure 9) presented organized cytoplasm, preserved nucleus, well defined karyotheca, intact mitochondria and only complexes of Golgi and rough endoplasmic reticulum were slightly dilated. These results demonstrated damage reversal generated by excessive methionine with use of melatonin as a possible neuroprotective agent.

#### **4. DISCUSSION**

Since studies show that gestational hypermethioninemia induces brain oxidative stress, decreases  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities, impairs memory and causes changes in cell morphology in encephalon of the offspring, in the present study we tested whether the administration of melatonin to hypermethioninemic pregnant rats could prevent the brain biochemical, morphological and behavioral changes in offspring. We also analyzed the effect of gestational hypermethioninemia and/or melatonin on DNA damage index in offspring encephalon.

In the present study a well-established model of gestational hypermethioninemia in Wistar rats [7] was used and the antioxidant chosen was melatonin since an extensive literature has shown that this substance has an excellent biosafety profile and crosses the placenta and the blood-brain barrier acting as an oxidant eliminator during the prenatal period and in some pathological conditions [51]. Here presented results corroborate with the previous reports showing that gestational hypermethioninemia changed the redox state of the cell in the encephalon of the offspring. It was shown a reduction in the activities of SOD and CAT, which are enzymes responsible for the detoxification of the superoxide anion ( $\text{O}^{2-}$ ), and the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), respectively. When there is loss of balance between production and elimination of ROS, which is called oxidative

stress, it may lead to damage to DNA, RNA, lipids and proteins. In addition, ROS can cause a malfunction of the DNA repair system, contributing to the development of neurodegenerative diseases [8]. It was also observed a reduction of brain sulfhydryl content in pups whose mothers received Met suggests that thiol-containing proteins may have been targeted by ROS. Treatment with melatonin was able to prevent only the reduction of CAT activity, but it did not alter the alteration found in SOD activity and sulfhydryl content of the pups caused by gestational hypermethioninemia. The prevention of CAT decrease by melatonin seems important since this enzyme may protect the cell from damage caused by excess methionine [52].

It was also shown, for the first time, that gestational hypermethioninemia caused DNA damage as analyzed by comet test in brain tissue of the offspring. It was observed that the Met offspring group had a DNA damage index three times higher than that of control pups. Melatonin *per se* had a slight action on the damage index, but it partly reduced the DNA damage index of the offspring of the mothers who received Met + Mel. These results are in agreement with those of Liang and colleagues [53], who showed that Melatonin could attenuate the effect of oxidative stress on DNA damage from *in vitro* embryo cultures. The antioxidant action of Melatonin also improves fertility and maintains a normal embryonic development as observed in studies reviewed by Tamura et al [54].

Supporting previous findings [7], there was a decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the encephalon of pups born to rats treated with Met during gestation. Once this enzyme is a membrane-embedded protein highly sensitive to free radicals insult, the oxidative stress observed may be, as least partly, responsible for such enzyme activity reduction. Another important aspect to be discussed is that decreased sulfhydryl groups could also affect components of this enzyme, making its permeability unstable, favoring

environmental toxicity and its dysfunction. Since the adequate functioning of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase is essential for nerve impulse conduction, the reduction of its activity may also lead to decreased memory and learning capacity [55-57]. Melatonin was not able to reverse the inhibition of brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, suggesting that the inhibition of this enzyme by hypermethioninemia could be associated to the decrease in the sulfhydryl content that was also not prevented by this compound.

Behavioral tests were run to verify whether biochemical alterations observed in the encephalon of the offspring could cause cognitive deficit. It is shown that rat offspring exposed to Met during gestation bear learning and memory impairments. Object recognition task demonstrated that the short and long-term memories were compromised since animals from Met group spent similar time exploring both objects at 1 hour and 24 hours after training, indicating that they did not recognize the familiar object. Object recognition index was also decreased in the Met group. Nevertheless, we verified that gestational hypermethioninemia reduced the total exploration time of the rat pups in this task, which may suggest that a less interest in exploring may have a role in the non-recognition of familiar object. As regarding to the water maze task, pups whose mothers were treated with Met showed reference spatial memory acquisition deficit since they required more time to find the platform during the training, crossed the platform less frequently, spent less time in the target quadrant and spent longer time in the opposite quadrant.

The administration of melatonin during pregnancy was able to prevent memory damage in object recognition task. However, melatonin was less effective in improving the performance of rat pups during the water labyrinth task, since this substance reduced the time that the animals exposed to Met (during pregnancy) led to finding the platform but showed no effect on the others analysis of this test. According to Shen et al [58],

melatonin reduced spatial memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. In this context, improved performance in object recognition task strongly suggests that melatonin increases associative strength, but does not completely reverse spatial memory results [59].

It is important to note that the motor activity does not seem to be interfering in the observed effects on learning and memory, since travelled distance and the number of crossed lines in the open field task were not affected by any of the treatments. In the open field test, the only parameter altered was the time spent in the center of the arena, which was longer in the offspring whose mothers received Met. This effect may suggest an anxiolytic-like behavior, a possible action of the enzyme SAM, the field center is an unprotected area for rodents. Reduced basal anxiety may decrease alertness and attention of the young animals and perhaps contribute to memory acquisition deficit [60, 61].

Using the same melatonin dose utilized in our study (10 mg/kg body weight), Baydas and colleagues [62] demonstrated that chronic exposure to alcohol impaired the performance of young and elderly rats in water maze task and melatonin reversed this effect, as well as the reduction of lipid peroxidation, suggesting that the oxidative stress can contribute to learning and memory deficits as reported by Tagliari et al [63]. An important finding of the study performed by Baydas et al [62, 64] was the modulation of the levels of neural cell adhesion molecules (NCAM) by melatonin in the hippocampus. These cells are included in the neural circuit for cognitive processing information. The results show that melatonin modulates the neuronal plasticity that involves memory and learning processes by regulating the expression of NCAM in the brain.

Pups whose mothers were treated with methionine presented alterations in cortex, analyzed by electron transmission microscopy. Changes in important organelles such as mitochondrial deranged architecture were observed, as well as rupture of cristae with

mitochondrial swelling in some parts it is not possible to define the nucleus and the karyotheca. Another visible change in microscopy was the Golgi complex and rough endoplasmic reticulum with vacuoles and dilated. These pups presented lipofuscin, originating from the lysosome with indigestible remains of macromolecules and organelles, with granules and vacuoles, indicating that the neural cells were degrading unnecessary or altered organelles. Mitochondria participate in biosynthetic and metabolic pathways of the cell; regulate calcium homeostasis and redox balance. If there are morphological changes as adaptation or response to a certain stress, mitochondria can signal survival or cell death depending on the severity of insult [65]. These data indicate the extent of insult caused by excessive methionine in maternal environment and agreed with our recent study [13].

The study of an ischemia and reperfusion model demonstrated the phases involved in cellular apoptosis [66]. These researchers found morphological changes in the mitochondria, dilatation of the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex and rupture of the membranes. This finding corroborates with our study indicating that the Met pups are on the path of neuronal cell death and probably because of this they presented a cognitive deficit in the behavioral tests. Despite all observed changes, we have seen that melatonin has been able to improve the morphology of the affected cell with excess maternal methionine. The pups of the Met + Mel group presented organelles and cellular composition like control animals, probably due to the antioxidant action of melatonin. Melatonin provided protection against increased mitochondrial oxidative stress, a specific action against increased common deletion formation of mROS at basal conditions. It avoids the depolarization of  $\Delta\psi_m$ , prevents the opening of MPTP and release of cytochrome c, thus preventing apoptosis [67]. Research has indicated that melatonin can behave as blocker in stages of the apoptotic pathway. This indolamine acts



on down-regulation of the pro-apoptotic protein Bax, up regulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and showed reduced DNA fragmentation [68].

Melatonin also protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in model of Parkinson's disease [69] and attenuates behavioral deficits and reduces brain oxidative stress in a model of schizophrenia [70]. An extensive review by Anderson et al [71] indicates that the increase of ROS, in addition to proinflammatory cytokines, removes tryptophan from serotonin synthesis, and later in melatonin, reducing the production of both. Serotonin has significant effects on cognitive processes, it positively promotes objective memory and synaptic plasticity processes. This research reinforces the antioxidant, anti-inflammatory effects of melatonin in the context of neuropsychiatric diseases.

Summarizing, our findings reveal that melatonin administration in a model of maternal hypermethioninemia prevents memory impairment, the decrease of antioxidant defenses (CAT activity), DNA damage and brain cell morphological changes. Although melatonin has not been able to completely prevent all damage caused by maternal hypermethioninemia, the results seem promising. Additional studies are needed to clarify the mechanisms of action of melatonin.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), PRONEX(16/2551-0000465-0)/ Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS-Brazil) and INCT (EN 465671/2014-4)/CNPq.

### **Conflicts of interest**

All authors declare no financial/commercial conflicts of interest.

### **Ethical approval**

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

### **REFERENCES**

1. Mudd SH. Hypermethioninemias of Genetic and Non-Genetic Origin: A Review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2011; 157:3–32.
2. Mudd SH, Levy HL, Tangerman A et al. Isolated persistent hypermethioninemia. *Am J Hum Genet*; 1995; 57:882–892.
3. Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York; 2001; 2016–2040.
4. Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG et al. Methionine alters Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Devl Neurosc* 2005; 651-65.
5. Stefanello FM, Ferreira AG, Pereira TC et al. Effect of hypermethioninemia on some parameters of oxidative stress and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampus of rats. *Metab Brain Dis*; 2007; 22(2):172-82.
6. Stefanello FM, Ferreira AGK, Pereira TCB et al. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *Int J Devl Neurosc* 2011; 29:483–488.
7. Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, Sitta A et al. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain

- Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase /Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metab Brain Dis* 2014; 29:153–160.
8. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634–1658.
  9. Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med* 2013; 62:170–185
  10. Goldstein I, Levy T, Galili D et al. Involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry* 2006; 60 (5):491-9.
  11. De-Lores-Arnaiz GR and Ordieres MG. Brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in aging and disease. *Int J Biomed Sci* 2014; 10:85–102.
  12. Schweinberger BM, Rodrigues AF, Turcatel E, et al. Maternal Hypermethioninemia Affects Neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression content in brain of rat offspring. *Mol Neurobiol*. 2017 Jan 13. doi: 10.1007/s12035-017-0383-z. [Epub ahead of print]
  13. Schweinberger BM, Rodrigues AF, Santos TM et al. Methionine administration in pregnant rats causes memory deficit in the offspring and alters ultrastructure in brain tissue. *Neurotox Res*. 2017 Oct 30. doi: 10.1007/s12640-017-9830-x. [Epub ahead of print]
  14. Ganie SA, Dar TA, Bhat AH, et al. Melatonin: A potential antioxidant therapeutic agent for mitochondrial dysfunctions and related disorders. *Rejuvenation Res* 2016; 19(1):21-40
  15. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 15; 49 (8):654-64.

16. Emet M., Ozcan H., Ozel L., Yayla M., Halici Z., Hacimuftuoglu A. A review of melatonin, its receptors and drugs. *Eurasian J. Med* 2016; 48:135-141.
17. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J. Pineal Res* 2003; 34:249–259.
18. Osuna C, Reiter RJ, García JJ et al. Inhibitory effect of melatonin on homocysteine-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90:32–37.
19. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K et al. Melatonin protects fetal rat brain against oxidative mitochondrial damage. *J. Pineal Res* 2001; 30:22-28.
20. Martín M, Macías M, Escames G, et al. Melatonin induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red *in vivo*. *J. Pineal Res* 2000; 28:242-248.
21. Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, et al. Fetal placental regulation of maternal melatonin in rats. *J. Pineal Res* 2008; 44:335–340.
22. Reiter RJ, Tamura H, Tan DX et al. Melatonin and the circadian system contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril* 2014; 102 (2):0015-0282.
23. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, et al. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Human Reprod Update* 2014; 20(2):293–307.
24. Alers NO, Jenkin G, Miller SL et al. Antenatal melatonin as an antioxidant in human pregnancies complicated by fetal growth restriction – a phase I pilot clinical trial: study protocol. 2013; 3:12.

25. Chen Y, Sheen J, Tiao M et al. Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. *Int J Mol Sci* 2013; 5380-5401.
26. Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K et al. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res* 1998; 25:129–134.
27. Schaefer M and Hardeland R. The melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine is a potent singlet oxygen scavenger. *J Pineal Res* 2009; 46:49-52.
28. Stefanello FM, Matté C, Scherer EB et al. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *J Neurosci Methods* 2007; 160(1):1-4.
29. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M et al. Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. *J. Pineal Res* 2008; 44:181–188.
30. Wyse ATS, Streck EL, Worm P, et al. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem* 2000; 25:969-973.
31. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375–380.
32. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121–126.
33. Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton 1985; 243–247.
34. Aksenov MY and Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302: 141–145.
35. Singh NP, McCoy MP, Tice RR et al. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experim Cell Res* 1988; 175(1): 184–91.

36. Hartmann A, Agurell E, Beevers C et al. Recommendations for Conducting the *in Vivo* Alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 2003; 18(1): 45–51.
37. Maluf SW and Erdtmann B. Follow-up Study of the Genetic Damage in Lymphocytes of Pharmacists and Nurses Handling Antineoplastic Drugs Evaluated by Cytokinesis-Block Micronuclei Analysis and Single Cell Gel Electrophoresis Assay. *Mutat Res* 2000; 471(1): 21–27.
38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-267.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
40. Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. *Experim Neurol* 2013; 241:25–33.
41. Netto CA, Dias RD, Izquierdo I. Differential effect of post training naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychoneuroendocrinology* 1986; 11(4):437-46.
42. Clark RE and Martin SJ. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15:593–598.
43. Ennaceur A and Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav Brain Res* 1988; 31:47-59.
44. Ouchi H, Ono K, Murakami Y et al. Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 2013; 238:146– 153.

45. Okuda S, Roozendaal B and McGaugh JL. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 20; 101(3):853–858.
46. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47–60.
47. Vorhees CV and Williams MT. Morris water maze procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006; 1(2):848–858.
48. D'hooge R and De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36:60–90.
49. Netto CA, Hodges H, Sinden JD, et al. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience* 1993; 54(1):69-92.
50. Souza, W. “Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas” 3<sup>a</sup> ed; Rio de Janeiro. Editora da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise (SBMM); 2007.
51. Bonnefont-Rousselot D and Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 2010; 278:55-67.
52. Hardeland R. Antioxidative Protection by Melatonin. Multiplicity of Mechanisms from Radical Detoxification to Radical Avoidance. *Endocrine* 2005; 27 (2):119–130.
53. Liang S, Jin YX, Yuan B et al. Melatonin enhances the developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos by preventing DNA damage induced by oxidative stress. *Sci Rep* 2017; 11; 7(1):11114.
54. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res* 2012; 5:5.

55. Wyse ATS, Bavaresco CS, Reis EA et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus. *Phys & Behav* 2004; 80:475– 479.
56. Dos Reis-Lunardelli EA, Castro CC, Bavaresco C et al. Effects of thyroid hormones on memory and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat brain. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4(3):184-93.
57. Vanzella C, Sanches EF, Odorcyk FK et al. Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus. *Neurochem Res* 2017; 42:1422–1429.
58. Shen YX, Xu SY, Wei W et al. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J Pineal Res* 2002; 32(3):173-8.
59. Soleimani E, Goudarzi I, Abrari K et al. Maternal administration of melatonin prevents spatial learning and memory deficits induced by developmental ethanol and lead co-exposure. *Physiol Behav.* 2017; 173:200-208.
60. Papakostas GI 2009. Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* 2009; 70 (5):18–22.
61. Papakostas GI, Mischoulon MDD, Shyu BAI et al. S-adenosyl methionine (SAmE) augmentation of serotonin reuptake inhibitors for antidepressant nonresponders with major depressive disorder: a double-blind, randomized clinical trial. *Am J Psychiatry* 2010; 167:8.
62. Baydas G, Yasar A, Tuzcu M. Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. *J Pineal Res.* 2005; 39:346–352.



63. Tagliari B, Scherer EB, Machado FR et al. Antioxidants prevent memory deficits provoked by chronic variable stress in rats. *Neurochem Res* 2011; 36(12):2373-80.
64. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M et al. Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. *J Pineal Res* 2008; 44:181–188.
65. Kasahara A and Scorrano L. Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol* 2014; 1081:1-10.
66. Winkelmann ER, Charcansky A, Faccioni-Heuser MC. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion. *Anat Embryol* 2006; 211:423–434.
67. Jou MJ, Peng TI, Yu PZ et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 2007; 43:389–403.
68. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M et al. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005; 135:879–886.
69. Patki G and Lau YS. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharm Biochem and Behav* 2011; 99:704–711.
70. Onaolapo AY, Ainab AO, Onaolapo OJ. Melatonin attenuates behavioural deficits and reduces brain oxidative stress in a rodent model of schizophrenia. *Biomed & Pharmacotherapy* 2017; 92:373–383.

71. Anderson G. Linking the Biological Underpinnings of Depression: Role of Mitochondria Interactions with Melatonin, Inflammation, Sirtuins, Tryptophan Catabolites, DNA Repair and Oxidative and Nitrosative Stress, with Consequences for Classification and Cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 80:255-266.

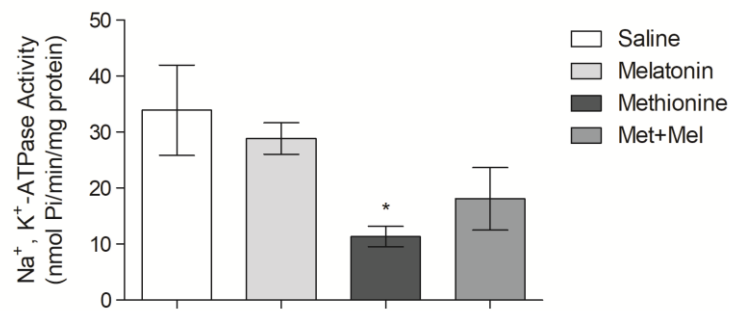
#### TABLE AND TABLE LEGENDS

**Table 1** Effect of chronic gestational administration of methionine, melatonin and methionine plus melatonin on crossing lines, traveled distance and time spent at the central zone of 30 days-of-age rat pups in the open field task.

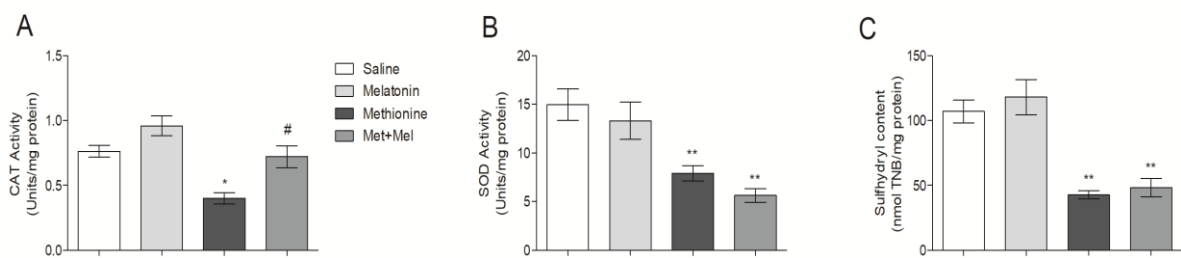
<b>Group</b>	<b>Travelled distance (m)</b>	<b>Lines crossing</b>	<b>Time in central zone (s)</b>
Saline	12.7±2.4	174.7±34.3	10.4±5.1
Melatonin	14.5±3.1	194.4±51.3	8.8±4.2
Methionine	14.4±2.7	187.2±49.9	17.1±6.1*
Met + Mel	14.3±2.9	195.1±59.4	15.3±6

Note: Data are expressed as mean ± SD for 8–12 animals in each group. Different from control \* $p < 0.05$  (One-way ANOVA and Tukey test).

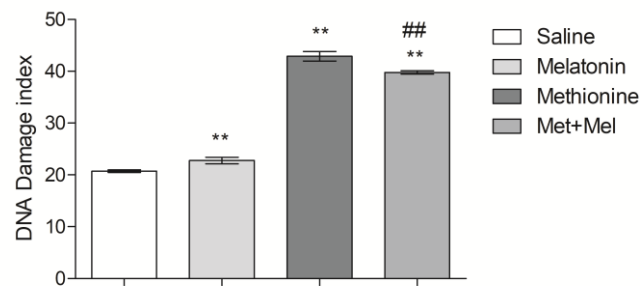
#### FIGURES AND LEGENDS



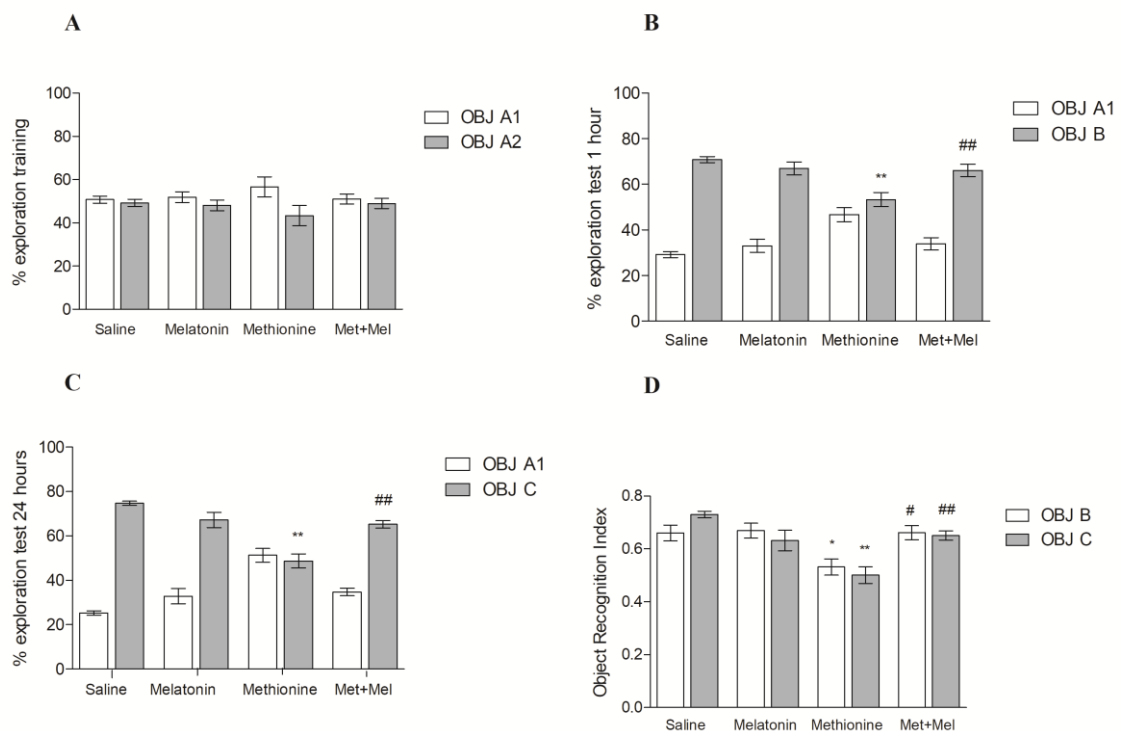
**Fig. 1** Effect of chronic gestational administration of methionine, melatonin and methionine plus melatonin on encephalon Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity of 30 days-of-age rat pups. Results are expressed as means  $\pm$  SD for 4-6 animals in each group. Different from control. \* $p < 0.05$  (One-way ANOVA and Tukey test).



**Fig. 2** Effect of chronic gestational administration of methionine, melatonin and methionine plus melatonin on antioxidant enzyme activities (A) catalase (CAT), (B) superoxide dismutase (SOD) and (C) sulfhydryl content in encephalon of 30 days-of-age rat pups. Data are mean  $\pm$  SD for 4-6 animals in each group. Results in U/mg protein. Different from control and Melaton \*\* $p < 0.01$ ; different from Methionine # $p < 0.05$  (One-way ANOVA and Tukey test).

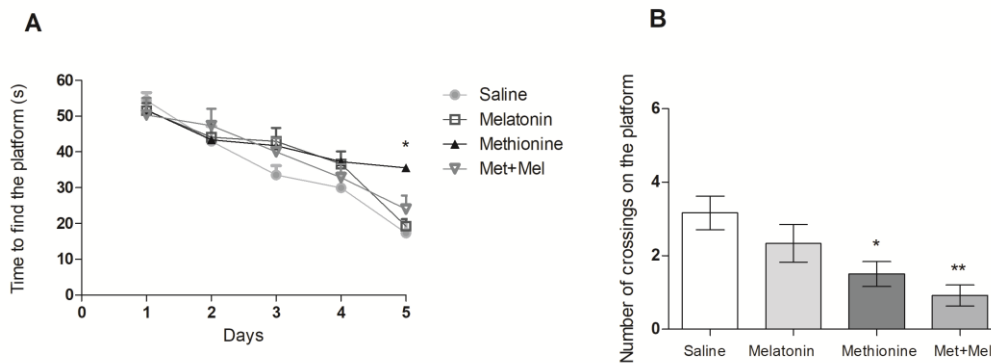


**Fig. 3** Effect of gestational administration of methionine, melatonin and methionine plus melatonin on DNA damage index in encephalon of 30 days-of-age pups. Data are expressed as mean  $\pm$  SD for 4-6 animals in each group, \*\* $p < 0.01$  compared to control group; ## $p < 0.01$  compared to Met group (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

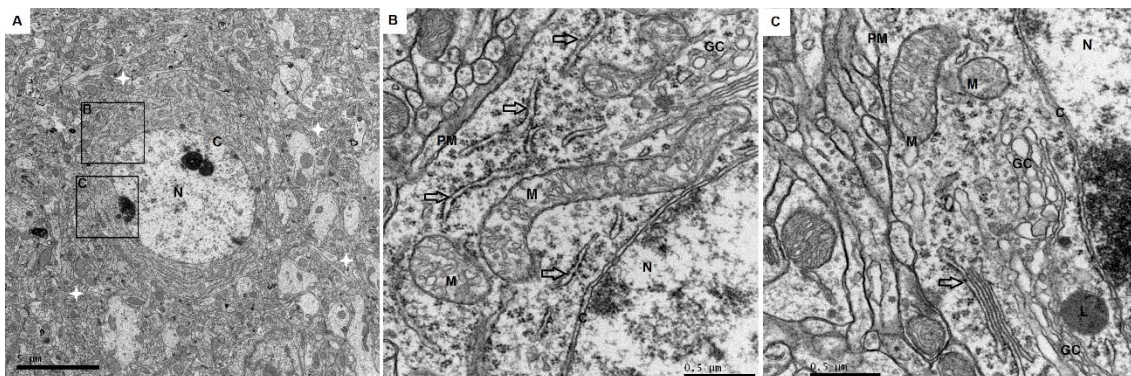


**Fig. 4** Effect of chronic gestational administration of methionine, melatonin and methionine plus melatonin in object recognition test. We analyzed training session (A), % exploration at 1 hour test (B), % exploration at 24 hours test (C), and object recognition

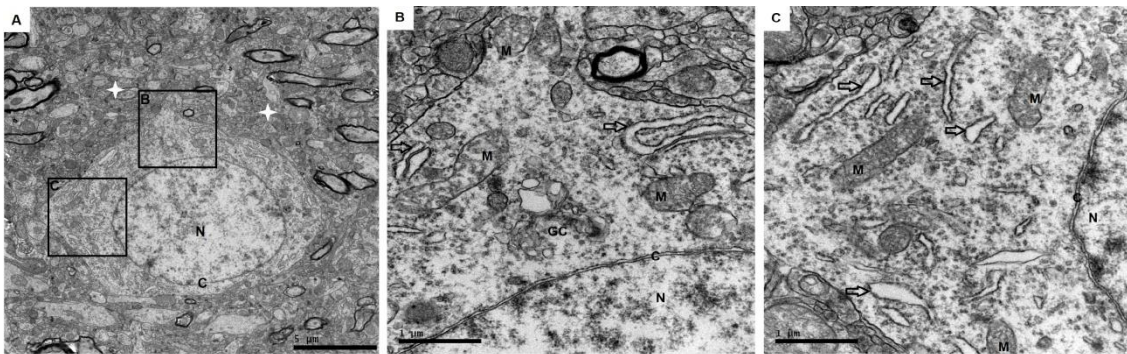
index (D) of 30 days-of-age rat pups. Results are expressed as means  $\pm$  SD for 8-12 animals in each group. Different from control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; different from Methionine # $p < 0.05$  (One-way ANOVA and Tukey test).



**Fig. 5** Effect of chronic gestational administration of methionine, melatonin and methionine plus melatonin on performance of spatial memory test of 30 days-of-age rat pups in time spent to find the platform (A) and number of crossings over the platform position (B). Data are expressed as means  $\pm$  SD for 8–12 animals in each group. Were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Tukey test. The standard error mean, shows the mean of standard errors for all groups/ days. Different from control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

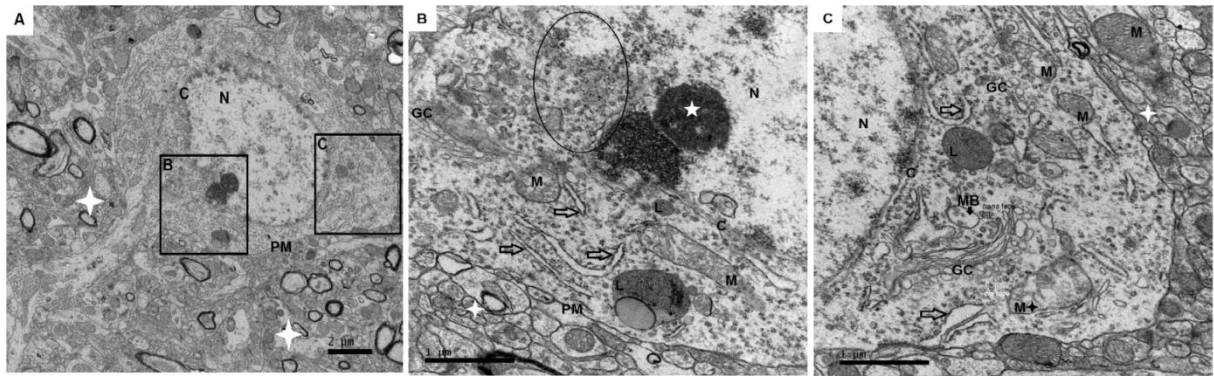


**Fig. 6** Representative images of brain tissue samples from 30-day-old pups from saline treated mothers (n = 3). **A**) We observed a neural cell in the center of the image, surrounded by neuropilo (white cross), showing a good organization, nucleus (N) well defined presenting nucleolus, karyotheca (C) and visible plasma membrane (PM). Magnification 6,000X. **B and C**) We can observe well defined mitochondria (M), with their cristae preserved; Golgi complex (GC) without alterations, and rough endoplasmic reticulum (black arrow) presenting ribosomes throughout its extension. Nucleus (N) delimited by karyotheca (C) where it is possible to see the bilayer membrane. Plasma membrane (PM) also well defined. Magnification 50,000X.

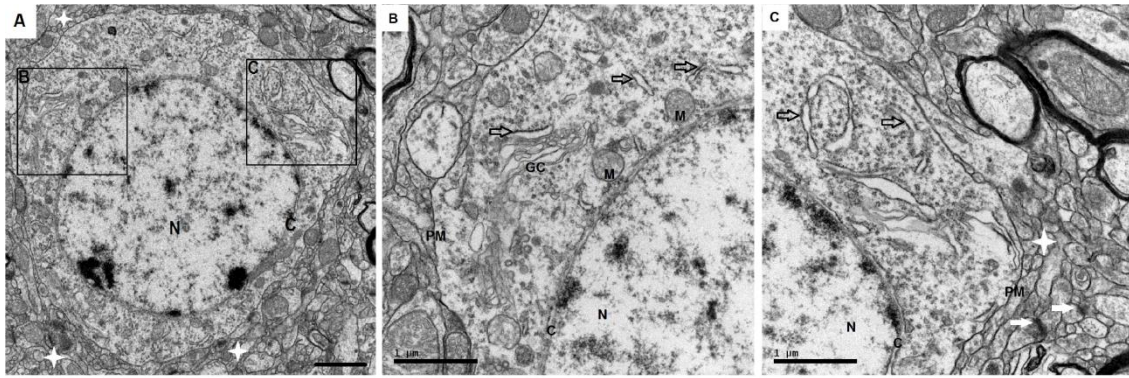


**Fig. 7** Representative images of brain tissue samples from 30-day-old pups from melatonin treated mothers (n = 3). **A**) We observed a neural cell in the center of the image, surrounded by neuropilo (white cross). Neural cells presents good structural organization, nucleus (N) well defined by the karyotheca (C) and apparent plasma membrane (PM). Magnification 6,000X. **B and C**) In the detail we visualize organelles well distributed by the cytoplasm of the neural cells: mitochondria (M) well defined, with their cristae preserved. The Golgi Complex (GC) in deformation, with central cistern with dilation, it is not possible to identify the cis and trans face, and rough endoplasmic reticulum (black arrow) presenting ribosomes throughout its extension, however we do not observe its conformation more frequent, that of large and parallel cisterns. Nucleus

(N) delimited by karyotheca (C) where it is possible to see the bilayer membrane. Plasma membrane (PM) also well defined. Magnification 30,000X.



**Fig.8** Representative images of brain tissue samples from 30-day-old pups from methionine treated mothers (n = 3). **A)** We observed a neural cell in the center of the image, surrounded by neuropilo (white cross). The neural cells presents structural organization, nucleus (N), karyotheca (C) and apparent plasma membrane (PM). Magnification 6,000X. **B and C)** In the detail we visualize organelles distributed by the cytoplasm of the neural cells: mitochondria (M) well defined, however some show rupture of the membrane of their cristae (M + black cross); Golgi complex (GC) apparently some changes in its cisterns, its cis face is facing the RER receiving transfer vesicles (thin black arrows), and the transverse face facing the nucleus (N) where we observe secretory vesicles (arrows thin white) electrodes, very close to a multivesicular body (MB), presents lipofuscin (L). The rough endoplasmic reticulum (black arrow) presenting slightly dilated cisterns, presenting ribosomes throughout its length. Nucleus (N) delimited by karyotheca (C), but in some places is not possible to observe it (black circle). Plasma membrane (PM) also well defined. Magnification 30,000X.



**Fig. 9** Representative images of brain tissue samples from 30-day-old pups from methionine + melatonin treated mothers (n = 3). **A)** We observed a neural cell in the center of the image, surrounded by neuropilo (white cross). The neural cells presents a classical structural organization with core (N) delimited by karyotheca (C), and apparent plasma membrane (PM). Magnification 10,000X. **B and C)** It is possible to visualize mitochondria (M) defined, with preserved cristae; Golgi complex (GC) with slightly dilated cisterns, and rough endoplasmic reticulum (black arrow hollowed out) presenting ribosomes throughout its length, however dilated. The white arrows indicate synaptic density. In both images the nucleus (N) delimited by karyotheca (C) is observed and it is possible to see the bilayer membrane. Plasma membrane (PM) also well defined. Magnification 30,000X.



## 4 DISCUSSÃO

Embora a metionina seja um aminoácido indispensável ao organismo e exerça funções importantes relacionadas ao metabolismo, crescimento e imunidade (Wu, 2009), o seu excesso pode ser nocivo e causar alterações danosas, como dismorfismo facial, edema cerebral, problemas hepáticos e renais, miopatias, déficits neurológicos caracterizados por prejuízos na aprendizagem e na memória (Benevenga and Steele, 1984; Mudd et al., 2001; Stefanello et al., 2005, 2011; Schweinberger et al., 2015; Schweinberger and Wyse, 2016; Soares et al., 2017).

Alguns mecanismos são propostos para explicar esses efeitos danosos do excesso de Met. Park e colaboradores (2008) mostraram que a suplementação de camundongos com Met gera um aumento significativo de Hcy, induzindo estresse oxidativo no fígado dos animais, aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, uma diminuição nos níveis de glutatona hepática e aumento na expressão de RNAm de enzimas antioxidantes. As atividades de ligação nuclear NFkappaB no fígado foram maiores no grupo Met, quando comparado com animais controle, sugerindo que o excesso desse aminoácido, inclusive na alimentação, possa atuar como um mediador pró-inflamatório e agente oxidante no fígado de camundongos.

Estudos do nosso grupo revelam que a hipermetioninemia gestacional induz estresse oxidativo, diminui a atividade das enzimas cerebrais  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e a  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, e causou uma redução no número de neurônios, a qual foi associada à diminuição dos níveis do fator neurotrófico cerebral. A hipermetioninemia materna também alterou o metabolismo energético da prole, uma vez que reduziu a atividade da succinato desidrogenase e do complexo II na cadeia transportadora elétrons. Também foram encontradas alterações morfológicas no córtex, além de mostrar prejuízo na memória aversiva da prole de ratas hipermetioninêmicas. Esses dados indicam que a

hipermetioninemia materna pode ser um fator predisponente a danos cerebrais durante o desenvolvimento intra-uterino (Schweinberger et al., 2014; 2017a; 2017b). No entanto, não há muitos estudos propondo testar algum composto que evite ou, pelo menos em parte, reduza o dano causado pela hipermetioninemia gestacional nos filhotes. Deste modo, é muito importante reconhecer condições patológicas que podem prejudicar a formação neurológica dos embriões e estratégias para evitar esta condição.

No presente trabalho foi escolhida a melatonina como possível agente neuroprotetor, uma vez que esta molécula apresenta aplicações terapêuticas, principalmente, relacionadas à atividade antioxidante. A literatura demonstra que esta indolamina possui um excelente perfil de biossegurança, ação anfifílica devido à capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica e placentária, desta forma, atingindo diversos compartimentos subcelulares. Em conjunto, essas características tornam a melatonina uma poderosa candidata na proteção ao DNA nuclear e mitocondrial (Reiter et al., 2001; Garcia et al., 2016). Estudos relacionam a melatonina com ação moduladora anti-inflamatória, potente eliminadora de ERO durante o período pré-natal e em algumas condições patológicas relacionadas à memória (Reiter et al., 2014c; Bonnefont-Rousselot and Collin, 2010; Wang et al., 2013).

Considerando o exposto acima, o principal objetivo deste estudo foi verificar se a administração de melatonina durante a gestação de ratas hipermetioninêmicas poderia prevenir as alterações bioquímicas, comportamentais e morfológicas no cérebro da prole. Esse trabalho analisou pela primeira vez o efeito da hipermetioninemia gestacional e/ ou melatonina no índice de dano do DNA no encéfalo dos descendentes.

Os resultados corroboram com estudos anteriores mostrando que a hipermetioninemia gestacional alterou o estado redox da célula no encéfalo da prole. Foi demonstrada uma redução nas atividades das enzimas SOD e CAT, que são responsáveis

pela desintoxicação do ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), respectivamente. O estresse oxidativo ocorre quando há perda do equilíbrio entre produção e eliminação das ERO, esse desbalanço pode levar a danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas constituintes da célula. Além disso, as ERO podem causar alterações no funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2006b). Inclusive observamos uma redução do conteúdo sulfidrilado no encéfalo dos filhotes cujas mães receberam Met, esse resultado sugere que as proteínas contendo grupos tiol podem ter sido alvo da oxidação por ERO. O tratamento com melatonina foi capaz de prevenir apenas a redução da atividade da enzima CAT, mas não melhorou a atividade da enzima SOD e do conteúdo SH dos filhotes expostos à hipermetioninemia materna. A prevenção da redução da CAT pela melatonina revela-se crucial, uma vez que esta enzima pode proteger a célula dos danos causados pelas ERO originadas do excesso de Met (Hardeland, 2005).

Song e colaboradores (2016) encontraram resultados promissores utilizando o tratamento com melatonina na água potável (10 mg/ kg de peso corporal) de camundongos fêmeas por período de 12 meses. Eles demonstraram que a terapia com melatonina reduziu significativamente o envelhecimento dos ovários, aumentou o tamanho das ninhadas, o conjunto dos folículos e comprimento dos telômeros, bem como quantidade e qualidade de oócitos. A melatonina atenuou a disfunção mitocondrial do ovário, devido a diminuição das espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS), evitando a apoptose. *In vitro*, esta indolamina foi capaz de regular SOD2 e CAT através da interação de SIRT3 com FoxO3a em células de granulosa após tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sendo assim, a melatonina exerceu proteção contra o declínio da fertilidade induzida pelo envelhecimento e a manutenção do equilíbrio redox mitocondrial.

Para nosso conhecimento, mostramos pela primeira vez que altos níveis de Met durante a gestação aumentou o índice de dano ao DNA, sugerindo a genotoxicidade desse modelo. O teste cometa avalia o dano ao DNA cromossômico em relação a sua migração, a qual se assemelha ao formato de um cometa e é gerada por rupturas nas moléculas do DNA (Speit and Hartmann, 2005). Observamos que os filhotes ratas hipermetioninêmicas apresentaram um índice de dano ao DNA três vezes maior do que o dos filhotes do grupo controle. Estudo *in vivo* utilizando metionina adicionada à dieta demonstrou que altas concentrações da Met, S-adenosilmetionina e S-Adenosilhomocisteína podem aumentar a produção de mtROS e o dano oxidativo ao DNA mitocondrial, porém no fígado de ratos, oferecendo um mecanismo possível para sua hepatotoxicidade (Gomez et al., 2009). A Mel *per se* teve uma pequena ação no índice de dano ao DNA, mas reduziu parcialmente esse índice da prole das ratas que receberam Met + Mel. Estes resultados concordam com os encontrados por Liang e colaboradores (2017), os quais demonstram que a Mel pode atenuar o efeito do estresse oxidativo sobre o dano do DNA de embriões de transferência nuclear de células somáticas porcina (SCNT) *in vitro*. A ação antioxidante da melatonina é capaz de melhorar a fertilidade e manter o desenvolvimento embrionário normal, conforme observado por Tamura et al (2012).

Em concordância com estudos anteriores (Schweinberger et al., 2014), observamos uma diminuição na atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no encéfalo da prole de ratas hipermetioninêmicas. Devido ao fato desta enzima ser incorporada entre a dupla membrana lipídica torna-se altamente sensível ao insulto dos radicais livres, quando ocorre estresse oxidativo observamos redução da sua atividade enzimática. Outro aspecto importante a ser discutido é a diminuição do conteúdo SH, os quais podem afetar os componentes proteicos desta enzima, tornando sua permeabilidade instável, favorecendo o ambiente materno excitotóxico e gerando sua disfuncionalidade.

Um grupo de pesquisadores encontrou um possível mecanismo que relaciona o funcionamento da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e dos grupamentos SH. A glutationilação gera uma ligação covalente entre glutatona e grupamentos SH de proteínas devido a produção de "ligação S-S". Este estudo mostrou, *in vitro*, a inativação das subunidades  $\alpha$  1 e  $\alpha$  2 da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pela ação da glutatona oxidada. Glutationilação é considerada um processo de modificação pós-traducional não-enzimática de proteínas e apesar deste estudo analisar tecido cardiovascular, abre perspectivas para investigar este possível mecanismo em tecido cerebral (Xianyu et al., 2014). O adequado funcionamento da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é essencial para a condução do impulso nervoso e a redução da sua atividade está relacionada à diminuição da memória e da capacidade de aprendizado (Wyse et al., 2004; Dos Reis-Lunardelli et al., 2007; Vanzella et al., 2017). Em relação ao nosso estudo, a melatonina preveniu parcialmente a redução de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase cerebral da prole das ratas submetidas a hipermetioninemia gestacional.

Os testes comportamentais foram realizados para verificar se as alterações bioquímicas e o déficit cognitivo observados nos animais hipermetioninêmicos (Stefanello et al., 2007; Schweinberger et al., 2017b) poderiam ser prevenidos pela ação da melatonina. Verificamos que os filhotes das ratas expostos a Met durante a gestação possuem alterações no aprendizado e problemas de memória. O teste de reconhecimento de objetos demonstrou que as memórias de curto (1 hora após treino) e longo (24 horas após treino) prazos foram comprometidas, uma vez que os animais do grupo Met passaram o mesmo tempo explorando o objeto novo e o objeto já conhecido, indicando que eles não reconheceram o objeto familiar. O índice de reconhecimento de objetos também foi diminuído no grupo Met. No que diz respeito à tarefa do labirinto aquático de Morris, os filhotes cujas ratas foram tratadas com Met na gestação apresentaram déficit de aquisição da memória espacial de referência, pois demoravam mais tempo para

encontrar a plataforma durante o treinamento, no teste atravessaram a plataforma menos frequentemente, ademais passaram menos tempo no quadrante alvo e mais tempo no quadrante oposto.

A administração de melatonina durante a gravidez foi capaz de prevenir completamente o dano na memória da tarefa de reconhecimento de objetos. No entanto, a Mel foi menos efetiva para melhorar o desempenho da prole durante a tarefa labirinto aquático de Morris. Esta indolamina melhorou o tempo em que os animais expostos a Met (durante a gestação) levaram para encontrar a plataforma durante os treinamentos, mas não apresentou nenhum efeito sobre as outras análises desse teste. De acordo com Shen et al (2002), a melatonina reduziu as alterações da memória espacial e o dano oxidativo neural em camundongos tratados com D-galactose. Neste contexto, o melhor desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos sugere fortemente que a melatonina aumenta a força associativa, mas não reverte completamente os resultados da memória espacial (Soleimani et al., 2017). É importante ressaltar que a atividade motora não foi afetada, pois a distância percorrida e o número de linhas cruzadas na tarefa de campo aberto não foram afetados por nenhum dos tratamentos. No teste de campo aberto, o único parâmetro alterado foi o tempo gasto na zona central do aparato, a prole de ratas hipermetioninêmicas permaneceu mais tempo na região central, quando comparado aos demais animais. Este efeito pode sugerir um comportamento do tipo ansiolítico, já que a zona central é uma área desprotegida para roedores. A redução da ansiedade basal pode estar relacionada a possível ação da enzima SAM, diminuindo o estado de alerta e a atenção da prole, contribuindo assim para o déficit de aquisição da memória (Papakostas et al., 2009, 2010).

Com a mesma dose de melatonina utilizada em nosso estudo (10 mg/kg de peso corporal), Baydas e colaboradores (2005 a) demonstraram que a exposição crônica ao

álcool prejudicou o desempenho de ratos jovens e idosos na tarefa do labirinto aquático de Morris e a melatonina preveniu este dano, pois evitou a peroxidação lipídica, sugerindo que o estresse oxidativo pode contribuir para a aprendizagem e déficits de memória, como relatado por Tagliari et al (2011). Baydas e colaboradores (2008) relataram uma relevante ação da melatonina na modulação dos níveis de moléculas de adesão celular neural (NCAM), na região hipocampal dos animais. Essas células estão incluídas no circuito neural para informações do processamento cognitivo. Estes resultados mostram que a melatonina modula a plasticidade neuronal que envolve processos de memória e aprendizagem, regulando a expressão de NCAM no cérebro.

Nossos resultados mostraram que a prole de ratas submetidas à hipermetioninemia materna apresentou alterações bioquímicas relevantes no encéfalo, conseqüentemente, observamos dano ao DNA. Os testes comportamentais revelaram prejuízos cognitivos relacionados ao aprendizado e à memória de reconhecimento. Sendo assim, para complementar essas análises, realizamos morfologia do córtex cerebral, da prole de 30 dias de vida, por microscopia eletrônica de transmissão. Os filhotes cujas mães foram tratadas com Met apresentaram alterações em organelas importantes, com arquitetura mitocondrial conturbada, bem como ruptura das suas cristas com inchaço mitocondrial e em algumas partes não é possível definir o núcleo e a carioteca. Outra mudança visível na microscopia foi no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático rugoso, ambos estavam dilatados e com vacúolos. Estes filhotes apresentaram lipofuscina, proveniente do lisossoma com restos indigestíveis de macromoléculas e organelas, com grânulos e vacúolos, indicando que o neurônio estava degradando organelas desnecessárias ou alteradas. As mitocôndrias participam de vias biossintéticas e metabólicas da célula, regulam a homeostase e o equilíbrio redox. Se há mudanças morfológicas como adaptação ou resposta a um certo estresse, as mitocôndrias podem sinalizar a

sobrevivência ou a morte celular dependendo da gravidade do insulto (Kasahara and Scorrano, 2014). Esses dados indicam a extensão do dano causado pela Met excessiva no ambiente materno e concordou com recente estudo de Schweinberger et al., 2017b.

O estudo de um modelo de isquemia e reperfusão demonstrou mudanças morfológicas nas mitocôndrias, dilatação do retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi e ruptura das membranas, as quais parecem estar envolvidas com as fases de apoptose celular (Winkelmann et al., 2006). Esta análise corrobora com o nosso estudo, indicando que os filhotes Met estão no caminho da morte das células neuronais e provavelmente por esta razão apresentaram um déficit cognitivo nos testes comportamentais. Apesar de todas as mudanças observadas, vimos que a melatonina conseguiu melhorar a morfologia da célula afetada com Met materna em excesso. Os filhotes do grupo Met + Mel apresentaram mitocôndrias intactas e composição celular similares aos filhotes controle, provavelmente devido à ação antioxidante da Mel.

A biologia molecular e celular das mitocôndrias no contexto das doenças neurodegenerativas é descrita por diversos trabalhos (Mattson et al., 2008; Lax et al., 2011). O transporte de elétrons mitocondrial gera moléculas de ATP, a qual se revela essencial para a excitabilidade e a sobrevivência dos neurônios. Outra análise mitocondrial de extrema relevância são as reações de fosforilação que medeiam à sinalização sináptica, inclusive com proteínas relacionadas à morte celular. As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas que se fundem, dividem e deslocam dentro dos axônios e dendritos. As principais funções das mitocôndrias nos neurônios incluem a regulação da sinalização de  $Ca^{2+}$ , equilíbrio redox celular, plasticidade sináptica, regulação da sobrevivência e apoptose da célula. O estresse oxidativo mediado pelas mitocôndrias perturba a homeostase de  $Ca^{2+}$  e a morte celular contribuem para a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington,



esclerose lateral amiotrófica, inclusive no quadro do acidente vascular cerebral isquêmico. Portanto, a manutenção da integridade mitocondrial e uso de alternativas antioxidantes para preservar essa organela são essenciais para minimizarmos os danos oxidativos e estruturais encontrados em inúmeras comorbidades cerebrais.

O trabalho realizado por Jou et al (2007) demonstrou que a melatonina protegeu a indução do estresse oxidativo mitocondrial, sugerindo como mecanismo a capacidade de reduzir a despolarização do  $\Delta\psi_m$ , evitando a abertura do MPTP e liberação do citocromo c, deste modo impossibilitando a apoptose. Em 2005(b), Baydas e colaboradores indicaram que a Mel pode bloquear diretamente os estágios da via apoptótica. Esta indolamina atua na regulação negativa da proteína pró-apoptótica Bax, enquanto atua positivamente na regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2, ademais mostrou redução da fragmentação do DNA.

A melatonina também protege contra déficits neurocomportamentais e alterações mitocondriais no modelo da doença de Parkinson (Patki and Lau, 2011); atenua os prejuízos comportamentais e reduz o estresse oxidativo cerebral em um modelo de esquizofrenia (Onaolapo et al., 2017). Uma extensa revisão de Anderson et al (2017) indica que o aumento de ERO, além de citocinas pró-inflamatórias, remove o triptofano da síntese de serotonina e, posteriormente, da melatonina, reduzindo a produção de ambos no organismo. A serotonina tem efeitos significativos nos processos cognitivos, promove positivamente a memória objetiva e os processos de plasticidade sináptica. Esta pesquisa reforça os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da melatonina no contexto das doenças neuropsiquiátricas.

Apesar das inúmeras alterações prejudiciais observadas na prole de ratas hipermetioninêmicas, os resultados do presente estudo revelaram que a administração de melatonina durante a gestação foi capaz de proteger sua prole das alterações em status

oxidativo e na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. O ambiente materno excitotóxico durante o período intra-uterino prejudica o desenvolvimento do SNC e pode provocar alterações comportamentais e morfológicas na prole. As alterações cognitivas são observadas em muitas doenças que afetam o SNC, e a busca de novos tratamentos para curar tais doenças, ou pelo menos, aliviar a disfunção neurocognitiva associada, continua sendo um objetivo importante na ciência atual. Neste contexto, mostramos que a melatonina preveniu o comprometimento do aprendizado no teste do labirinto aquático de Morris e a memória de reconhecimento de objetos em filhotes de ratas hipermetioninêmicas. Além disso, a melatonina melhorou as defesas antioxidantes reparando a atividade da CAT, recuperou parcialmente a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e o dano ao DNA. A melatonina preveniu as alterações na morfologia das células cerebrais, recuperando principalmente a estrutura das mitocôndrias e a organização celular. Embora a melatonina não tenha sido capaz de prevenir completamente todos os danos causados pela hipermetioninemia materna, nossos resultados parecem ser muito promissores, sugerindo a melatonina como possível alvo terapêutico para reduzir desordens neurológicas. Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos de ação da melatonina.

## CONCLUSÕES

- O modelo de hipermetioninemia gestacional causou as seguintes alterações em encéfalo e/ou córtex da prole de 30 dias de vida:
  - ✓ Reduziu atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase;
  - ✓ Reduziu a atividade da enzima Catalase e Superóxido dismutase;
  - ✓ Diminuiu o conteúdo Sulfidril;
  - ✓ Aumentou o índice de dano ao DNA;
  - ✓ Aumentou o tempo da prole na zona central durante o teste campo aberto;
  - ✓ Reduziu o percentual de exploração total dos objetos novos no teste de 1 e 24 horas na tarefa de reconhecimento de objetos;
  - ✓ Tornou maior o tempo para localizar a plataforma no teste do labirinto aquático de Morris;
  - ✓ Reduziu o número de cruzamentos na plataforma e o tempo no quadrante alvo no teste do labirinto aquático Morris;
  - ✓ Causou mudanças morfológicas nos células neurais.
  
- O tratamento com melatonina concomitante com a administração de metionina durante todo período gestacional em encéfalo e/ou córtex da prole de 30 dias de vida preveniu os seguintes parâmetros parcialmente (P) ou totalmente (T):
  - ✓ A redução da atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (P);
  - ✓ A redução da atividade da enzima Catalase (T);
  - ✓ O aumento do índice de dano ao DNA (P);

- ✓ A redução do percentual exploração total dos objetos novos, teste de 1 e 24 horas, na tarefa reconhecimento de objetos (T);
  - ✓ As alterações morfológicas cerebrais (T).
- O tratamento com Melatonina *per se* em encéfalo da prole de 30 dias:
    - ✓ Aumentou o índice de dano ao DNA.

Em conjunto nossos achados mostram que a administração de melatonina durante a gestação (dose 10 mg/Kg de peso corporal) previne alguns danos bioquímicos, morfológicos e comportamentais causados pela hipermetioninemia gestacional nos filhotes, tais como atividade da enzima catalase, dano ao DNA, alterações nas células neurais e no teste reconhecimento de objetos. Contudo, mais estudos em outras estruturas cerebrais e testes bioquímicos diferentes são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais a melatonina exerce seus efeitos neuroprotetores.

## 5 PERSPECTIVAS

- 1) Testar efeito neuroprotetor da melatonina na prole com outras idades (60, 90, 120 dias) de ratas hipermetioninêmicas, sobre:
  - a) parâmetros do metabolismo energético e função mitocondrial;
  - b) parâmetros inflamatórios e a possível ação anti-inflamatória da melatonina;
  
- 2) Verificar efeitos da hipermetioninemia gestacional induzida por alimentação hiperproteica.

## 6 REFERÊNCIAS

Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in experimental Medicin and Biology* 2003; 527: 549-557.

Ai Y , Sun Z, Peng C, Liu L, Xiao X, Li J. Homocysteine Induces Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in High Methionine Diet-Fed Mice. *Nutrients* 2017; 1:9 (4).

Anderson G. Linking the Biological Underpinnings of Depression: Role of Mitochondria Interactions with Melatonin, Inflammation, Sirtuins, Tryptophan Catabolites, DNA Repair and Oxidative and Nitrosative Stress, with Consequences for Classification and Cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017; 80: 255-266.

Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Etem E, Nedzvetsky VS. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *J Pineal Res* 2007; 43(3): 225-31.

Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. *J Pineal Res* 2008; 44:181–188.

Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005b; 135:879–886.

Baydas G, Yasar A, Tuzcu M. Comparison of the impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. *J Pineal Res* 2005a; 39: 346–352.

Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP. Effects of lithium therapy on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 37(1):56-61.

Benevenga NJ, Steele RD. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Annu Rev Nutr* 1984; 4:157–181.

Bonnefont-Rousselot D and Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 2010; 278:55-67.

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Pallás M, Camins A, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Melatonin alters cell death processes in response to age-related oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2009; 46(1):106-14.

Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Wilson WG, Leonard JV, Chou JY. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J Clin Invest* 1996; 98: 1021–1027.

Chen YC, Sheen JM, Tiao MM, Tain YL, Huang LT. Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. *Int J Mol Sci* 2013; 5380-5401.

Cobb CA and Cole MP. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2015; 84: 4-21.

Cooper AJL. Biochemistry of sulfur containing amino acids. *Annu Rev Biochem*, 1983; 52: 187-222

Cornelius F, Habeck M, Kanai R, Toyoshima C, Karlisch SJD. General and specific lipid–protein interactions in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1848(9): 1729-43.

Costa MZ, da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, Scherer EBS, Viau CM, Saffi J, Barschak AG, Wyse ATS, Spanevello RM, Stefanello FM. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem* 2013; 384: 21–28.

De Lores Arnaiz GR, Ordieres MG. Brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 2014; 10:85–102

Dos Reis-Lunardelli EA, Castro CC, Bavaresco C, Coitinho AS, da Trindade LS, Perrenoud MF, Roesler R, Sarkis JJ, Wyse ATS, Izquierdo I. Effects of thyroid

hormones on memory and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat brain. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4(3): 184-93.

Dos Santos TM, Kolling J, Siebert C, Biasibetti H, Bertó CG, Grun LK, Dalmaz C, Barbé-Tuana FM, Wyse ATS. Effects of previous physical exercise to chronic stress on long-term aversive memory and oxidative stress in amygdala and hippocampus of rats. *Int J Devl Neuroscience* 2017; 56: 58–67

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1): 47-95.

Ferreira CS, Maganhin CC, Simões RS, Girão MJBC, Baracat EC, Soares-Jr JM. Melatonina: modulador de morte celular. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(6): 715-8.

Finkelstein JD and Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* 1986; 26: 1582–1587.

Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1694–9.

Ganie SA, Dar TA, Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A. Melatonin: A potential antioxidant therapeutic agent for mitochondrial dysfunctions and related disorders. *Rejuvenation Res* 2016; 19(1): 21-40.

García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, García-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramírez JM, Bernal-Pérez M. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res* 2014; 56: 225–237.

Goldstein I, Levy T, Galili D, Ovadia H, Yirmiya R, Rosen H, Lichtstein D. Involvement of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and endogenous digitalis-Like compounds in depressive disorders. *Biol. Psychiatry* 2006; 60: 491–499.

Gomez J, Caro P, Sanchez I, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, Lopez-Torres M, Pamplona R, Barja G. Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41(3): 309-21.



Gozzelino R. The Pathophysiology of Heme in the Brain. *Curr Alzheimer Res* 2016; 13(2): 174-84.

Gutteridge JMC and Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393: 561–564.

Halliwell B and Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York 2007; 4th ed.

Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed* 2014; 37: 99–105.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012; (70): 257–265.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006 (a); 97:1634–1658.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006 (b); 141: 312–322.

Hardeland R. Antioxidative Protection by Melatonin. Multiplicity of Mechanisms from Radical Detoxification to Radical Avoidance. *Endocrine* 2005; 27 (2):119–130.

Holm TH and Lykke-Hartmann K. Insights in to the pathology of the  $\alpha 3$  Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase on Pumpin Neurological Disorders; Lessons from Animal Models. *Front Physiol* 2016; 7:209.

Illarionova NB, Gunnarson E, Li Y, Brismar H, Bondar A, Zelenin S, Aperia A. Functional and molecular interactions between aquaporins and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase *Neuroscience*. 2010; 168(4): 915-25.

Izquierdo I and Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997; 68: 285–316.

Izquierdo I, Cammarota M, Medina JH and Bevilaqua LRM. Pharmacological Findings on the Biochemical Bases of Memory Processes: A General View. *Neural Plast* 2004; 11(3-4): 159–189.

Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 1999; 50: 271–9.

Jou MJ, Peng TI, Yu PZ, Jou SB, Reiter RJ, Chen JY, Wu HY, Chen CC, Hsu LF. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 2007; 43:389–403.

Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, Tyagi N. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol Neurobiol* 2016; 53(1): 648–661.

Kaplan JH. Biochemistry of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:511–35.

Kasahara A and Scorrano L. Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol* 2014; 24(1):1-10.

Kim G, Weiss SJ, Levine RL. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 901–905.

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse ATS. Homocysteine Induces Oxidative–Nitritative Stress in Heart of Rats: Prevention by Folic Acid. *Cardiovasc Toxicol* 2011; 11(1): 67-73.

Kolling J, Scherer EB, Siebert C, Longoni A, Loureiro S, Weis S, Petenuzzo L, Wyse AT. Severe Hyperhomocysteinemia Decreases Respiratory Enzyme and  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase Activities, and Leads to Mitochondrial Alterations in Rat Amygdala. *Neurotox Res* 2016; 29(3):408-18.

Kotler M, Rodríguez C, Sáinz RM, Antolín I, Menéndez-Peláez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 1998; 24(2): 83-9.

Lax NZ, Turnbull DM, Reeve AK. Mitochondrial mutations: newly discovered players in neuronal degeneration. *Neuroscientist* 2011; 17: 645-658.

Lent R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais. Atheneu: São Paulo, 2002.

Levy HL, Shih VE, Madigan PM, Karolkewicz V, Carr JR, Lum A, Richards AA, Crawford JD, Maccready RA. Hypermethioninemia with other hyperaminoacidemias. Studies in infants on high-protein diets. *Am J Dis Child* 1969; 117:96–103.

Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci* 2013; 16, 14(12): 24438-75.

Liang S, Jin YX, Yuan B, Zhang JB, Kim NH. Melatonin enhances the developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos by preventing DNA damage induced by oxidative stress. *Sci Rep* 2017; 11; 7(1): 11114.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 2004;84(1): 87-136.

Maddineni S, Nichenametla S, Sinha R, Wilson RP, Richie JP. Methionine restriction affects oxidative stress and glutathione related redox pathways in the rat. *Exp Biol Med* 2013; 238(4):392–399.

Massaad CA and Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 2013–2054.

Mato JM, Martínez-Chantar ML and Lu SC. Methionine Metabolism and Liver Disease. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 273–93.

Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 2008; 60(5): 748-66.

Miller E, Morel A, Saso L and Saluk J. Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Applications in Neurodegenerative Disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2015; 15: 163-169.

Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009; 15: 209– 219.

Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB. Deficiency in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPase Alpha Isoform Genes Alters Spatial Learning, Motor Activity, and Anxiety in Mice. *J. Neurosci* 2007; 27: 616–26.

Mudd SH, Jenden DJ, Capdevila A, Roch M, Levy HL, Wagner C. Isolated hypermethioninemia: measurements of S-adenosylmethionine and choline. *Metabolism* 2000; 49: 1542–1547.

Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001; 8th ed.: 2007-2056.

Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. *Am J Med Genet C: Semin Med Genet* 2011; 157:3–32.

Najafi M, Shirazi A, Motevaseli E, Geraily G, Norouzi F, Heidari M, Rezapoor S. The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophys Rev* 2017; 9(2):139-148.

Olsen RKJ, Cornelius N and Gregersen N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *Inherit Metab Dis* 2015; (38): 703–719.

Onaolapo AY, Ainab AO, Onaolapo OJ. Melatonin attenuates behavioural deficits and reduces brain oxidative stress in a rodent model of schizophrenia. *Biomed & Pharmacotherapy* 2017; 92: 373–383.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, Hardeland R, Cardinali DP. Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes. *Neurotox Res* 2013; 23(3): 267-300.

Papakostas GI 2009. Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* 2009; 70 (5):18–22.

Papakostas GI, Mischoulon D, Shyu I, Alpert JE, Fava M. S-adenosyl methionine (SAME) augmentation of serotonin reuptake inhibitors for antidepressant nonresponders with major depressive disorder: a double-blind, randomized clinical trial. *Am J Psychiatry* 2010; 167:8.

Park CM, Cho CW, Rosenfeld ME, Song YS. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J Med Food* 2008; 11(4): 667-74.

Patki G and Lau YS. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Pharm Biochem and Behav* 2011; 99: 704–711.

Pirkov I, Norbeck J, Gustafsson L, Albers E. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J* 2008; 275(16):4111–4120.

Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 939:200-15.

Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan D, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang S and Xu K. Melatonin, a full service anti-cancer agent: inhibition of initiation, progression and metastasis. *Int J Mol Sci* 2017; 18(4).

Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu XY. Melatonin and the circadian system contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril* 2014b; 102 (2):0015-0282.

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

Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Human Reprod Update* 2014c; 20(2): 293–307.

Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 2007; (54): 1-9.

Schweinberger BM and Wyse ATS. Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino Acids* 2016; 48(11):2479-2489.

Schweinberger BM, Rodrigues AF, Dos Santos TM, Rohden F, Barbosa S, da Luz Soster PR, Partata WA, Faccioni-Heuser MC, Wyse ATS. Methionine administration in pregnant rats causes memory deficit in the offspring and alters ultrastructure in brain

tissue. *Neurotox Res* 2017; Oct 30. doi: 10.1007/s12640-017-9830-x. [Epub ahead of print]

Schweinberger BM, Rodrigues AF, Turcatel E, Pierozan P, Pettenuzzo LF, Grings M, Scaini G, Parisi MM, Leipnitz G, Streck EL, Barbé-Tuana FM, Wyse ATS. Maternal hypermethioninemia affects neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression content in brain of rat offspring. *Mol Neurobiol* 2017; Jan 13. doi: 10.1007/s12035-017-0383-z. [Epub ahead of print]

Schweinberger BM, Schwieder L, Scherer E, Sitta A, Vargas CR, Wyse ATS. Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase/ Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity and oxidative status of the offspring. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 153–60.

Schweinberger BM, Turcatel E, Rodrigues AF, Wyse ATS. Gestational hypermethioninaemia alters oxidative/nitrative status in skeletal muscle and biomarkers of muscular injury and inflammation in serum of rat offspring. *Int J Exp Pathol* 2015; 96 (5): 277-84.

Shen YX, Xu SY, Wei W, Sun XX, Yang J, Liu LH, Dong C. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J Pineal Res* 2002; 32(3): 173-8.

Soares MS, Oliveira PS, Debom GN, da Silveira Mattos B, Polachini CR, Baldissarelli J, Morsch VM, Schetinger MR, Tavares RG, Stefanello FM, Spanevello RM (2017) Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. *Amino Acids* 49(1): 129–138.

Soleimani E, Goudarzi I, Abrari K, Lashkarbolouki T. Maternal administration of melatonin prevents spatial learning and memory deficits induced by developmental ethanol and lead co-exposure. *Physiol Behav* 2017; 173: 200-208.

Song C, Peng W, Yin S, Zhao J, Fu B, Zhang J, Mao T, Wu H, Zhang Y. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Sci Rep* 2016; 12(6):35165.

Speit G and Hartmann, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol* 2005; 291: 85–95.

Stefanello FM, Chiarani F, Kurek AG, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse ATS. Methionine alters Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidant defenses in rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 651–656.

Stefanello FM, Ferreira AG, Pereira TC, da Cunha MJ, Bonan CD, Bogo MR, Wyse ATS. Acute and chronic hypermethioninemia alter Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus: prevention by antioxidants. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 483–488.

Stefanello FM, Matté C, Scherer EB, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse ATS. Chemically induced model of hypermethioninemia in rats. *J Neurosci Methods* 2007 (a); 160: 1–4.

Stefanello FM, Monteiro SC, Matté C, Scherer EB, Netto CA, Wyse ATS. Hypermethioninemia increases cerebral acetylcholinesterase activity and impairs memory in rats. *Neurochem Res* 2007 (b); 32: 1868–1874.

Tagliari B, Scherer EB, Machado FR, Ferreira AG, Dalmaz C, Wyse AT. Antioxidants prevent memory deficits provoked by chronic variable stress in rats. *Neurochem Res* 2011; 36(12): 2373-80.

Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res* 2012; 5:5.

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; 42:28–42

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000; 9(3-4):137-59.

Tomás-Zapico C and Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005; 32 (2): 99-104.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and down-stream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009; 7(1):65–74.

Vanzella C, Sanches EF, Odorczyk FK, Nicola F, Kolling J, Longoni A, dos Santos TM, Wyse ATS, Netto CA. Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus. *Neurochem Res* 2017; 42:1422–1429.

Vitvitsky VM, Garg SK, Keep RF, Albin RL, Banerjee R. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(11):1671-81.

Voiculescu SE, Zygouropoulos N, Zahi CD and Zagrean AM. Role of melatonin in embryo fetal development. *J Med Life* 2014; 7(4): 488–492.

Wang Z, Liu D, Zhan J, Xie K, Wang X, Xian X, Gu J, Chen W, Hao A. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. *Pharmacol Res* 2013; 76:84-97.

Wilhelm EA, Jesse CR, Bortolatto CF, Nogueira CW. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonin. *Eur J Pharmacol* 2013; 701: 65–72.

Winkelmann ER, Charcansky A, Faccioni-Heuser MC. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion. *Anat Embryol* 2006; 211:423–434.

Wu G (2009) Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37:1–17.

Wyse ATS, Bavaresco CS, Reis EA, Zugno AI, Tagliari B, Calcagnotto T, Netto CA. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav* 2004; 80:475–479.

Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 2000; 25: 971–975.



Xianyu M, Petrushanko IY, Klimanova EA, Dergousova EA, Lopina OD. Glutathionylation of the alpha-subunit of Na,K-ATPase from rat heart by oxidized glutathione inhibits the enzyme. *Biochemistry (Mosc)* 2014; 79(2): 158-64.

Zanatta A, Viegas CM, Hickmann FH, de Oliveira Monteiro W, Sitta A, de Moura Coelho D, Vargas CR, Leipnitz G, Wajner M. Ornithine In Vivo Administration Disrupts Redox Homeostasis and Decreases Synaptic Na(+), K (+)-ATPase Activity in Cerebellum of Adolescent Rats: Implications for the Pathogenesis of Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria (HHH) Syndrome. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35(6):797-806.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo I - Carta de aprovação do comitê de ética



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 31251

**Título:** Suplementação de melatonina como terapia preventiva a danos neurológicos causados pela indução da hipermetioninemia em ratas Wistar e sua prole

**Vigência:** 29/04/2016 à 28/04/2018

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ANGELA TEREZINHA DE SOUZA WYSE - coordenador desde 29/04/2016  
Paula Woltmann Figueiró - Aluno de Mestrado desde 29/04/2016

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 01/08/2016 - SALA 330 DO ANEXO I - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de de 120 ratos Wistar (96 fêmeas e 24 machos), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 12 de Agosto de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética