

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Ester da Costa Rezena Pinto

**EFEITOS DA MELATONINA EM CULTURA DE ASTRÓCITOS DE RATOS WISTAR  
ADULTOS**

Ester da Costa Rezena Pinto

**EFEITOS DA MELATONINA EM CULTURA DE ASTRÓCITOS DE RATOS WISTAR  
ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Quincozes dos Santos

Coorientadora: Dra. Larissa Daniele Bobermin

### CIP - Catalogação na Publicação

Pinto, Ester da Costa Rezena  
EFEITOS DA MELATONINA EM CULTURA DE ASTRÓCITOS DE  
RATOS W1STAR ADULTOS / Ester da Costa Rezena Pinto. --  
2023.

75 f.

Orientador: André Quincozes dos Santos.

Coorientador: Larissa Daniele Bobermin.

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, 2023.

1. astrócitos. 2. córtex. 3. glioproteção. 4.  
melatonina. I. Santos, André Quincozes dos, orient.  
II. Bobermin, Larissa Daniele, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Desde que eu entrei no mundo literário em 2013 eu insistia em me inspirar naqueles personagens fictícios que realizavam sonhos ou objetivos gigantescos sem jamais desistir. Em parte, esse mestrado se tornou isso para mim, um grande objetivo que apesar de diversos percalços e desafios trouxe aprendizados que eu jamais poderia imaginar. Foram extensos dias de estudo, prática, dias de cansaço, experimentos que, às vezes, não resultavam no esperado, mas que no final também eram cheios de alegrias. Todo esse processo só foi possível devido ao suporte da minha família, em especial da minha irmã que sempre me apoiou, do meu namorado que me impulsiona em almejar mais do mundo, dos meus colegas de laboratório e das minhas inspirações. Costumo pensar que ao longo de toda a minha formação sempre existiram pessoas que foram a minha inspiração, durante a iniciação científica eu tive alguns e no mestrado não poderia ser diferente. E, quando eu falo em inspiração, são mais do que orientador e coorientadora, são parte do meu conhecimento após quase dois anos, são pessoas que se preocupam com você, são memórias de felicidade quando você está passando por momentos difíceis. A Lari e o André são essa parte da minha vida, pessoas que vão além de possibilitar uma inspiração profissional, mas também humana. Acredito que, depois de tudo isso, posso me considerar sortuda por esse suporte e por conseguir finalizar este trabalho tendo a certeza do meu amadurecimento científico, este que tem como base uma passagem do livro de Stephen Hawking que diz: “Assim, lembre-se de olhar para as estrelas, não para os próprios pés. Tente compreender o que vê e questione o que faz o universo existir. Seja curioso.

## Sumário

<b>PARTE I</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1. CORTÉX CEREBRAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ASTRÓCITOS</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. FUNÇÕES ASTROCITÁRIAS</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1 DEFESA ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1.2 ASTRÓCITOS E INFLAMAÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2 ASTRÓCITOS E O ENVELHECIMENTO</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS</b> .....	<b>8</b>
<b>3 MELATONINA</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITOS PROTETORES DA MELATONINA</b> .....	<b>10</b>
<b>4 GLIOPROTEÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>PARTE II</b> .....	<b>17</b>
<b>METODOLOGIAS</b> .....	<b>18</b>
<b>ANIMAIS</b> .....	<b>18</b>
<b>CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE ROEDORES ADULTOS</b> .....	<b>18</b>
<b>DESENHO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO COM MELATONINA</b> .....	<b>19</b>
<b>MORFOLOGIA E VIABILIDADE CELULAR</b> .....	<b>20</b>
<b>DETERMINAÇÃO DE LACTATO</b> .....	<b>21</b>
<b>ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)</b> .....	<b>21</b>
<b>EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR QUANTITATIVO</b> .....	<b>21</b>

<b>CONTEÚDO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) .....</b>	<b>22</b>
<b>NÍVEIS DE CITOCINAS .....</b>	<b>22</b>
<b>DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS.....</b>	<b>23</b>
<b>QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>23</b>
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>23</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>EFEITOS DA MELATONINA SOBRE VIABILIDADE CELULAR, MORFOLOGIA E NÍVEIS DE LACTATO .....</b>	<b>24</b>
<b>EFEITOS DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS ASTROGLIAIS.....</b>	<b>27</b>
<b>EFEITOS DA MELATONINA SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....</b>	<b>29</b>
<b>EFEITOS DA MELATONINA NA HOMEOSTASE REDOX.....</b>	<b>32</b>
<b>VIAS DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS AOS POTENCIAIS EFEITOS GLIOPROTETORES DA MELATONINA.....</b>	<b>33</b>
<b>PARTE III .....</b>	<b>35</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>RESUMO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## PARTE I

## RESUMO

O córtex cerebral desempenha diversas funções, estando envolvido nos processos de locomoção, aprendizagem e memória. Esta estrutura também está diretamente relacionada aos mecanismos de diversas doenças neurológicas. Os astrócitos são células da glia com importantes funções, como por exemplo, homeostase dos neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA), respostas antioxidante e anti-inflamatória, bem como formação e manutenção da barreira hematoencefálica (BHE). Contudo, essas funções fisiológicas podem sofrer declínio a longo prazo e contribuir para distúrbios característicos do envelhecimento. Nesse contexto, estudos *in vitro* se concentraram na cultura de roedores neonatos para definir características bioquímicas, celulares e moleculares dos astrócitos. No entanto, devido a imaturidade das conexões celulares em animais jovens, a cultura de astrócitos proveniente de animais adultos representa uma importante ferramenta para investigar o possível impacto da exposição a estratégias glioprotetoras em células maduras. Dentre as diversas moléculas com efeitos benéficos, a melatonina é um hormônio da glândula pineal responsável por controlar o ritmo circadiano, resposta antioxidante, resposta inflamatória, fatores de transcrição e biogênese mitocondrial. Logo, a melatonina pode fornecer respostas glioprotetoras. Neste sentido, glioproteção se refere a um conjunto de estratégias que fornecem proteção ao sistema nervoso central (SNC) através das células gliais. A partir do exposto acima, investigamos os efeitos da melatonina na cultura de astrócitos de córtex de ratos Wistar adultos (90 dias), avaliando a viabilidade e metabolismo celular, parâmetros astrocitários como atividade da enzima glutamina sintetase (GS), conteúdo da glutatona (GSH) e a expressão do RNAm da enzima limitante da síntese de GSH, glutamato cisteína ligase (GCL); liberação de fatores tróficos e vias de sinalização relacionadas aos efeitos da melatonina. Nossos resultados mostram que a melatonina não alterou a viabilidade das culturas de astrócitos, bem como os níveis de lactato extracelular em relação ao controle experimental. Quanto aos parâmetros glutamatérgicos, não houve alteração na GS, GCL ou no conteúdo da GSH. Contudo, a melatonina causou uma significativa redução da expressão dos fatores de transcrição nuclear kappa B (NFκB), ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Os mediadores inflamatórios interleucina 6 (IL-6) e 10 (IL-10) também aumentaram pós tratamento com a melatonina. Adicionalmente, a melatonina causou o aumento do fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e a sirtuína 1 (SIRT1), e reduziu o RNAm da proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e do coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1α). Assim, os resultados sugerem que na cultura de astrócitos de roedores adultos, a melatonina foi capaz de promover ações anti-inflamatórias através da ação direta sobre mediadores inflamatórios e/ou por vias clássicas associadas à neuroinflamação, além de regular mecanismos protetores relacionados a este hormônio, como por exemplo Nrf2/SIRT1. Assim, a presente dissertação mostrou pela primeira vez os potenciais efeitos glioprotetores da melatonina em culturas de animais adultos.

**PALAVRAS-CHAVE:** astrócitos, córtex, glioproteção, melatonina.

## ABSTRACT

The cerebral cortex performs several functions, being involved in the processes of locomotion, learning and memory. This structure is also directly related to the mechanisms of several neurological diseases. Astrocytes are glial cells with important functions, such as homeostasis of the neurotransmitters glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA), antioxidant and anti-inflammatory responses, as well as formation and maintenance of the blood-brain barrier (BBB). However, these physiological functions may have a long-term decline and contribute to disorders associated with aging. In this context, *in vitro* studies have focused on astrocyte cultures from neonatal rodents to define biochemical, cellular and molecular characteristics of astrocytes. However, due to the immaturity of cellular connections in young animals, cultured astrocytes from adult animals represent an important tool to investigate the possible impact of exposure to glioprotective strategies on mature cells. Among the various molecules with beneficial effects, melatonin is a pineal gland hormone responsible for controlling the circadian rhythm, antioxidant response, inflammatory response, transcription factors and mitochondrial biogenesis. Therefore, melatonin can provide glioprotective responses. In this sense, glioprotection refers to a set of strategies that provide protection to the central nervous system (CNS) through glial cells. Based on the above, we investigated the effects of melatonin on astrocyte cultures from the cortex of adult Wistar rats (90 days), evaluating cell viability and metabolism, astrocytic parameters such as activity of the enzyme glutamine synthetase (GS), glutathione content (GSH) and the mRNA expression of the rate-limiting enzyme for GSH synthesis, glutamate cysteine ligase (GCL); release of trophic factors and signaling pathways related to the effects of melatonin. Our results show that melatonin did not alter the viability of astrocyte cultures, as well as the levels of extracellular lactate relative to the experimental control. Regarding glutamatergic parameters, there was no change in GS, GCL or GSH content. However, melatonin caused a significant reduction in the expression of nuclear transcription factors kappa B (NFκB), cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). The inflammatory mediators interleukin 6 (IL-6) and 1 (IL-10) also increased after melatonin treatment. Additionally, melatonin caused an increase in the nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and sirtuin 1 (SIRT1) and reduced the mRNA of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α). Thus, these results suggest that, in cultured astrocytes from adult rodents, melatonin was able to promote anti-inflammatory effects through direct action on inflammatory mediators and/or through classical pathways associated with neuroinflammation, in addition to regulating protective mechanisms related to this hormone, such as Nrf2/SIRT1. Thus, the present study showed for the first time the potential glioprotective effects of melatonin in adult animal cultures.

**KEYWORDS:** astrocytes, cortex, glioprotection, melatonin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AANAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP (do inglês “AMP-activated protein kinase”)
ASMT	Acetilserotonina O-metiltransferase
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês “Brain-derived neurotrophic fator”)
BHE	Barreira hematoencefálica
CO	Monóxido de carbono
Cox-2	Ciclooxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EROs	Espécies reativas ao oxigênio (do inglês “Reactive oxygen species”)
GABA	Ácido gama-aminobutírico (do inglês “Gamma-aminobutyric Acid”)
GCL	Glutamato cisteína ligase
GCS	Gânglios cervicais superiores
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês “Glial cell line-derived neurotrophic factor”)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (do inglês “Glial fibrillary acidic protein”)
GLAST	Transportador glutamato-aspartato (do inglês “Glutamate-aspartate transporter”)
GLT-1	Transportador de glutamato 1 (do inglês “Glutamate transporter 1”)

GLUT1	Transportador de glicose 1 (do inglês “glucose transporter type 1”)
GLUTs	Transportadores de glicose (do inglês “Glucose transportes”)
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathiona
HO-1	Heme oxigenase 1
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NAS	N-acetilserotonina
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B (do inglês “Nuclear fator kappa B”)
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (do inglês “Nuclear factor erythroid 2-related factor 2”)
NLRP3	Receptor do tipo NOD contendo um domínio de pirina do tipo 3
PGC-1 $\alpha$	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (do inglês “Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha”)
PPAR $\gamma$	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
SIRT1	Sirtuína 1
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$ (do inglês “Growth transformation factor $\beta$ ”)

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$ (do inglês “Tumor necrosis factor $\alpha$ ”)
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral (do inglês “Tumor necrosis factor receptor 1”)
TNFR2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral (do inglês “Tumor necrosis factor receptor 2”)
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês “Vascular endothelial growth factor”)

## INTRODUÇÃO

O presente trabalho iniciará introduzindo o papel do córtex no sistema nervoso central (SNC), bem como dos neurônios e células gliais. Posteriormente, serão apresentadas funções dos astrócitos, particularmente em relação ao modelo de cultura astrocitária de roedores adultos utilizado neste trabalho. O texto transcorrerá com uma introdução sobre a melatonina, sua síntese e mecanismos de ação desta intervenção de escolha. E para finalizar a introdução, será apresentado o conceito de glioproteção visando dois pontos chave deste trabalho: os astrócitos e a melatonina. Em sequência, será apresentada a justificativa a respeito da melatonina na cultura de astrócitos maduros e os objetivos que nortearam esta pesquisa. As metodologias serão precedidas pelos resultados obtidos e da discussão, baseada na literatura e nos resultados, de maneira a integrar as informações e fornecer possíveis aspectos protetores e mecanismos de ação na cultura de roedores adultos.

### 1. CORTÉX CEREBRAL

O SNC é dividido em encéfalo e medula espinal, sendo o encéfalo subdividido em cérebro, cerebelo e tronco encefálico (BEAR, 2017). O córtex cerebral faz parte do encéfalo e apresenta somente a substância cinzenta, no qual o encéfalo é dividido em dois hemisférios que incluem a camada externa e interna (substância cinzenta e branca, respectivamente) e quatro lobos, sendo eles o lobo frontal, parietal, temporal e occipital (JAWABRI KH, 2023). De maneira geral, o córtex cerebral é um integrador de diversificadas informações, participando de estímulos e respostas relacionadas ao movimento, aprendizagem, visão, audição, memória e entre outros (SILVERTHORN, 2017).

Considerando todas essas funções essenciais para a manutenção da

homeostasia do SNC, é esperado que os mecanismos de diversos distúrbios neurológicos e doenças neurodegenerativas estejam relacionados ao córtex cerebral (VAN OLST et al., 2021). Portanto, as funções e possíveis danos no córtex cerebral influenciam diversos estudos para entender as causas, mas também para investir estratégias no âmbito de neuroproteção ou glioproteção.

Em termos celulares, o SNC possui dois grupos de células: neurônios e glia, sendo a glia composta pelos oligodendrócitos, microglia e os astrócitos. Os neurônios, de maneira geral, consistem no soma, dendritos e o axônio (BEAR, 2017). Apesar de algumas semelhanças morfológicas, os neurônios diferem na fisiologia e principalmente a nível molecular, que podem influenciar no acometimento de neuropatologias específicas dos neurônios sensoriais ou motores (KANDEL, ÉRICO; SCHWARTZ, JAMES; JESSEL, 2014). As células gliais são compostas por três tipos de células, sendo os oligodendrócitos responsáveis pela formação da bainha de mielina, que facilita a condução do potencial de ação (BEAR, 2017), e a microglia está envolvida na fagocitose e em respostas inflamatórias com base no ambiente cerebral (COLONNA; BUTOVSKY, 2017). Além dos oligodendrócitos e da microglia, o cérebro é dotado de outro tipo de células gliais bastante versáteis: os astrócitos.

## 2. ASTRÓCITOS

Os astrócitos são células da glia com diversificadas funções que vão além do suporte neuronal (GIOVANNONI; QUINTANA, 2020). Quanto à morfologia, os astrócitos possuem uma citoarquitetura estrelada com múltiplos prolongamentos e constituição em termos de citoesqueleto pelas proteínas actina, tubulina, proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e vimentina (MIDDELDORP; HOL, 2011; QUINCOZES-SANTOS et al., 2021). Estas características conferem aos

astrócitos a capacidade de contato com diversas células através da interação com vasos sanguíneos, conectando a periferia corporal ao SNC (QUINCOZES-SANTOS et al., 2021). Além disso, estas células apresentam diferenças funcionais e moleculares dependentes de região, como maior refinamento em processos finos por parte de astrócitos corticais e hipocampais maduros quando comparados ao hipotálamo, bem como nas junções comunicantes que diferem nas regiões cerebrais (MOREL et al., 2017).

## 2.1. FUNÇÕES ASTROCITÁRIAS

Dentre as diversas funções desempenhadas pelos astrócitos, o ciclo glutamato-glutamina reforça a importância das células gliais na cooperação com os neurônios ao proporcionar a manutenção dos neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA), de forma que os astrócitos captam o glutamato da fenda sináptica via transportadores glutamato-aspartato (GLAST) e transportador de glutamato 1 (GLT-1). Posteriormente, através da enzima glutamina sintetase (GS), o glutamato é convertido em glutamina, que é exportada para os neurônios finalizando a reciclagem do glutamato (QUINCOZES-SANTOS et al., 2021; ZHOU et al., 2020). É interessante salientar que, embora esta seja uma das funções e ações mediadas pelos astrócitos, há ainda diversos indicativos que estas células apresentam diferenças funcionais e moleculares dependentes de região em relação a expressão de GLAST/GLT-1 e atividade da GS (MOREL et al., 2017).

Paralelamente a esta função, a desregulação na atividade ou expressão da GS pode resultar no aumento de amônia no SNC e, conseqüentemente, hiperamonemia e encefalopatia, já que a GS está diretamente associada a detoxificação da amônia (HAKVOORT et al., 2017). Além disso, durante doenças cerebrais pode ocorrer a liberação excessiva de glutamato e comprometimento

do ambiente celular, de maneira que nesta situação a GS pode atenuar diversos eventos patológicos (JAYAKUMAR; NORENBORG, 2016).

Além do ciclo glutamato-glutamina, os astrócitos fornecem suporte trófico ao secretar diversos fatores que atuam na neurogênese e são essenciais para a diferenciação, sobrevivência e regeneração neuronal. Dentre eles, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e a proteína S100B (FARINA; ALOISI; MEINL, 2007; QUINCOZES-SANTOS et al., 2021). Concomitantemente, estas células gliais participam da formação e manutenção da barreira hematoencefálica (BHE), plasticidade e suporte metabólico neuronal, metabolismo energético e homeostase iônica (SOUZA et al., 2013a).

É importante salientar que os astrócitos também podem se tornar reativos (ESCARTIN; GUILLEMAUD; CARRILLO-DE SAUVAGE, 2019) sendo observados os subtipos A1 e A2 (KWON; KOH, 2020). O subtipo A1 é descrito como promotor da desregulação de sinapses e como decisivo para a patogênese de diversos distúrbios, por outro lado o subtipo A2 pode exercer funções reparadoras e que estimulam a sobrevivência neuronal (FAN; HUO, 2021). De modo geral, a reatividade astrocitária difere devido a heterogeneidade destas células e das respostas em condições de estresse, sendo expressa através de diminuição da captação e reciclagem de neurotransmissores, aumento da infiltração de células imunes, diminuição do suporte trófico, desregulação dos níveis de cálcio e aumento da resposta inflamatória (PATANI; HARDINGHAM; LIDDELOW, 2023).

### 2.1.1 DEFESA ANTIOXIDANTE

O suporte para a homeostase do SNC advindo dos astrócitos se estende para a proteção antioxidante através da enzima superóxido dismutase (SOD) e do tripeptídeo glutathiona (GSH), que é formado pela combinação dos aminoácidos cisteína e glutamato através da enzima glutamato cisteína ligase (GCL), enzima limitante da via, para formar  $\gamma$ -glutamilcisteína ao qual posteriormente a glicina é adicionada (BOBERMIN et al., 2022b; FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). É importante destacar que a GSH é o principal antioxidante do SNC (QUINCOZES-SANTOS et al., 2021). A classe de enzimas SOD regulam a conversão de radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio em resposta a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (ELEUTHERIO et al., 2021). A SOD1 e a SOD2 são dois subtipos das três presentes na família da SOD, sendo a SOD1 presente no espaço intermembranar mitocondrial, peroxissoma e citosol, enquanto a SOD2 se encontra na matriz mitocondrial (ELEUTHERIO et al., 2021; MIAO; ST. CLAIR, 2009).

Quando se trata de resposta pró-oxidante, os astrócitos podem produzir óxido nítrico (NO), uma vez que expressam isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOSs) (KIKUGAWA et al., 2017). O NO é um importante fator na sinalização celular para vasodilatação, resposta imune e neurotransmissão (CINELLI et al., 2020). A isoforma iNOS (induzível), conhecida pelo seu papel na fisiopatologia da inflamação, depende exclusivamente de indução celular para a sua expressão e, conseqüente, liberação do NO em níveis mais elevados que os outros membros da sua família (ANAVI; TIROSH, 2020; CINELLI et al., 2020).

### 2.1.2 ASTRÓCITOS E INFLAMAÇÃO

A neuroinflamação é uma característica importante de diversas doenças neurológicas, sendo uma condição desencadeada por uma série de disfunções/falhas em respostas imunes ou pela exacerbada resposta diante de insultos (DIAZ-CASTRO et al., 2021). Essa característica está presente na esclerose múltipla (EM) e na doença de Alzheimer (DA) que são sabidamente neurodegenerativas, de forma que o papel dos astrócitos tem se tornado foco no estudo de neuropatologias devido a sua responsividade inflamatória (LINNENBAUER; WHEELER; QUINTANA, 2020; PATANI; H, ARDINGHAM; LIDDELOW, 2023).

A BHE é essencial para barrar a entrada de patógenos e células imunes provenientes do plasma para o parênquima cerebral, de forma que a sua constituição é voltada para essa seletividade através de células endoteliais cerebrais, como as claudinas, os pericitos, associação com microglia, neurônios e, dentre outros, os astrócitos (KNOX et al., 2022). Os astrócitos atuam na formação e manutenção da BHE, de forma que há um extensivo controle, através de mecanismos moleculares, do tráfego sanguíneo de leucócitos e diversas células envolvidas na resposta imunológica de tecidos adjacentes (SOFRONIEW, 2015). A capacidade de responder a estímulos inflamatórios é uma das funções astrocitárias, uma vez que estas células podem expressar e secretar importantes mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em resposta a insultos (KWON; KOH, 2020). Contudo, os astrócitos também ativam diferentes fatores neurotróficos que podem influenciar na sobrevivência de células circundantes durante a inflamação, como no caso da modulação do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (LINNENBAUER;

ROTHHAMMER, 2020), bem como induzir a neuroproteção por estimular a liberação da interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e do TGF- $\beta$  que são moléculas com características anti-inflamatórias (KWON; KOH, 2020)

Em termos de fatores de transcrição, o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) é um heterodímero constituído de duas subunidades, p65 e p50, no qual ele é amplamente associado a senescência celular, de modo que suas ações são voltadas para estímulos inflamatórios, através do TNF- $\alpha$  e interleucinas, da regulação de genes pró e anti-apoptóticos, além de fatores de crescimento (TILSTRA et al., 2011). Logo, o NF $\kappa$ B é um importante mediador de efeitos neuroinflamatórios, portanto o aumento da sua expressão durante o envelhecimento é um mecanismo crítico que está presente nos astrócitos maduros em processo de senescência (SOUZA et al., 2016a).

## 2.2 ASTRÓCITOS E O ENVELHECIMENTO

Neuroquimicamente, o envelhecimento é caracterizado por diversas alterações na funcionalidade cerebral e, estas alterações, são relacionadas a prejuízos nas sinapses e na comunicação neurônio-glia, através da produção de EROs, disfunção mitocondrial e inflamação crônica (COHEN; TORRES, 2019; SOUZA et al., 2016b). Além disso, o papel dos astrócitos parece ser heterogêneo durante o envelhecimento e neurodegeneração, uma vez que suas respostas diferem nas distintas regiões cerebrais (córtex, hipocampo e cerebelo) em termos de morfologia, reatividade astrocitária, resposta imune e expressão gênica (PLANAS-FONTÁNEZ et al., 2021).

O metabolismo dos astrócitos pode ser afetado durante o envelhecimento e, nesse sentido, o suporte neurotrófico destas células na reciclagem de neurotransmissores e no suporte energético neuronal sofre declínio, podendo

ocorrer redução da translocação dos transportadores de glicose nos neurônios, gerando assim grande demanda energética na produção de lactato por parte dos astrócitos (JIANG; CADENAS, 2014). As características senescentes também podem se manifestar de maneira prematura quando os astrócitos são expostos a desafios estressores, de forma que há a expressão da proteína p21 e aumento da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase (COHEN; TORRES, 2019). Além disso, diversos processos que envolvem funções clássicas e essenciais astrocíticas são alterados ao longo da senescência, como a captação de glicose, expressão do transportador de glicose 1 (GLUT1) e atividade da enzima GS, que sofrem um declínio na cultura de roedores adultos e envelhecidos. Além disso, o conteúdo da GSH no córtex é impactado diretamente pela reserva energética, reciclagem de neurotransmissores e resposta a outros sistemas antioxidantes (SOUZA et al., 2015).

### 2.3 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Várias propriedades astrocíticas foram evidenciadas *in vitro* utilizando culturas de astrócitos obtidas a partir de ratos neonatos como modelo de estudos bioquímicos e morfológicos destas células (SOUZA et al., 2013a). Por outro lado, é importante salientar as diferenças de respostas frente a insultos ou estímulos protetores em células de cérebros imaturos quando comparadas às células provenientes de roedores adultos (BOBERMIN et al., 2020; SOUZA et al., 2013a; XIANG et al., 2020). Diante disso, a cultura de roedores adultos pode oferecer evidências quanto a atividades astrocíticas por apresentar marcadores gliais característicos como a GFAP, a GS, a proteína S100B, a captação de glutamato e os transportadores GLAST e GLT-1 (SOUZA et al., 2013a). Dessa forma, a cultura astrocítica de roedores adultos pode oferecer avaliações mais fidedignas de processos bioquímicos e morfológicos no cérebro maduro, almejados durante

o processo de neurodegeneração quando o objetivo é estudar vias e mecanismos de ação na presença de uma molécula neuroprotetora, como a melatonina.

### 3 MELATONINA

Popularmente conhecida como a “expressão química da escuridão”, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio extremamente versátil produzido em resposta à escuridão e inibido pela exposição à luz, até mesmo através da luz azul artificial (MINICH et al., 2022). Nesse cenário, diante da possível inibição da melatonina à noite devido a exposição à luz artificial e as recentes discussões sobre distúrbios do sono e saúde imunológica durante a pandemia da COVID-19, o estudo deste hormônio se intensificou para entender suas ações na homeostase do SNC (MINICH et al., 2022).

A disponibilidade da melatonina ao longo da vida humana sofre diversas variações começando desde a infância, de modo que somente após três meses de idade há o desenvolvimento da produção de melatonina em bebês, ou seja, só há exposição à melatonina através da amamentação (MINICH et al., 2022). O pico da sua produção ocorre durante a infância e sofre declínio a partir da puberdade, de maneira que ao longo dos anos os níveis de melatonina decrescem e, assim, o envelhecimento apresenta como característica a supressão dos níveis deste hormônio (HARDELAND, 2019; MINICH et al., 2022).

Na glândula pineal, especificamente no pinealócito, a síntese de melatonina inicia com o triptofano sendo transformado em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase, seguida da formação da serotonina que será acetilada pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) formando a N-acetilserotonina (NAS), que por sua vez dá origem à melatonina através da

enzima acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT) (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018; REITER; TAN; GALANO, 2014).

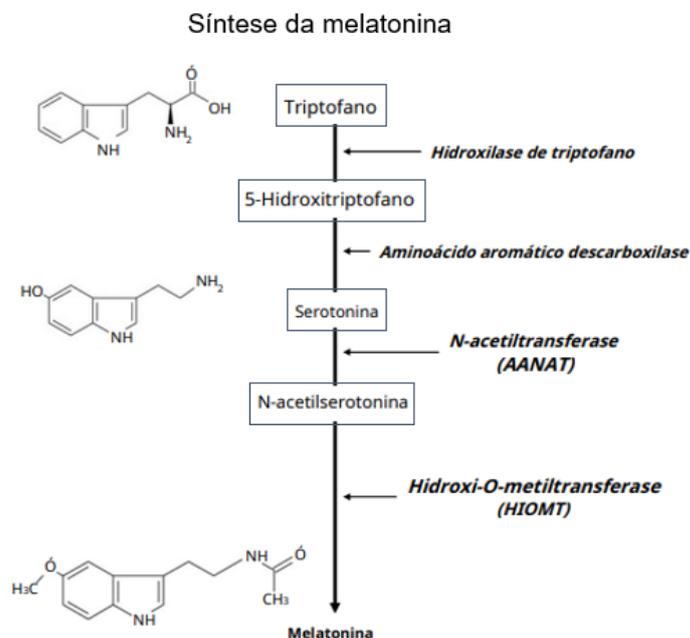


Figura 1. Síntese da melatonina. Adaptada de Russell G. Foster, 2021.(FOSTER, 2021)

### 3.1 MECANISMOS DE AÇÃO E EFEITOS PROTETORES DA MELATONINA

Inicialmente, é importante salientar algumas características que facilitam as ações da melatonina, dentre elas os seus receptores específicos (MT1, MT2 e MT3) presentes em diversos tecidos humanos, tanto no cérebro quanto em tecidos periféricos (MELHUISSH BEAUPRE et al., 2021). Os receptores MT1 e MT2 são membros dos receptores acoplados à proteína G e, enquanto o MT1 está envolvido na inibição da adenilato ciclase de uma célula alvo e amplamente encontrado no cérebro e tecido periférico, o receptor MT2 está envolvido na hidrólise de fosfoinositol em locais restritos como hipotálamo, retina e tecido cardíaco (GUNATA; PARLAKPINAR; ACET, 2020; REITER; TAN; GALANO, 2014). Já o receptor MT3 não é acoplado a proteína G e apresenta semelhança com a enzima quinona redutase 2 (GUNATA; PARLAKPINAR; ACET, 2020).

Além disso, a melatonina atua nas respostas redox combatendo EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) através ou independente de seus receptores, bem como seus metabólitos atuam sobre possíveis danos oxidativos (MINICH et al., 2022). Em relação a vias de sinalização, a literatura descreve a modulação de fatores chaves para a homeostase como a indução da translocação para o núcleo do fator de transcrição nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), responsável por desencadear vias anti-inflamatórias e antioxidantes, supressão do NFkB e ampla associação com a sirtuína 1 (SIRT1), descrita como um mediador dos efeitos da melatonina (HARDELAND, 2019).

Complementar às respostas anti-inflamatórias através da inibição do NFkB, a melatonina já demonstrou que consegue atuar barrando o dano inflamatório por meio do receptor do tipo NOD contendo um domínio de pirina do tipo 3 (NLRP3), envolvido em diversos processos patológicos na lesão ou reperfusão na isquemia cerebral (QIN et al., 2021). E, aliado a isto, este hormônio desempenha a supressão dos níveis da IL-6 e da IL-1β, bem como inibe a ciclooxigenase 2 (COX-2) e o TNF-α (FERLAZZO et al., 2020).

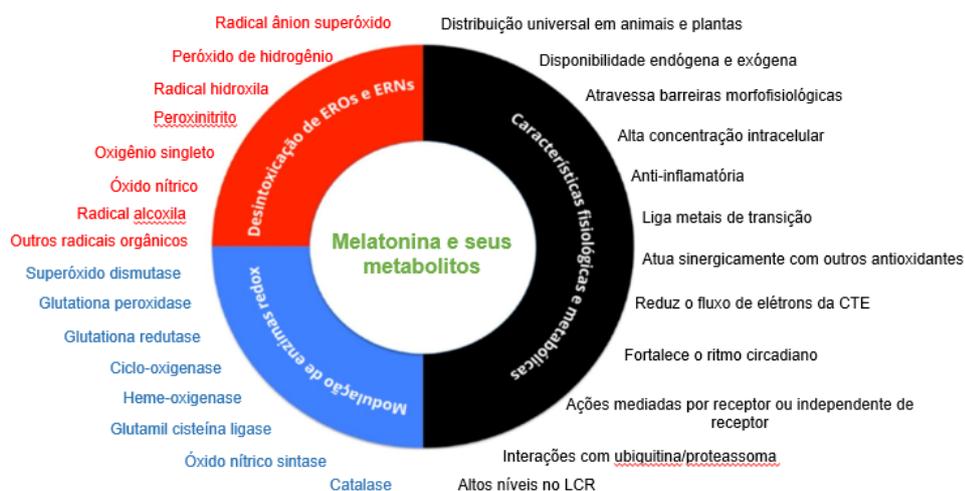


Figura 2. Principais efeitos da melatonina. Espécies reativas ao oxigênio (EROs), espécies reativas ao nitrogênio (ERNs), cadeia transportadora de

elétrons (CTE) e líquido cefalorraquidiano (LCR). Adaptada de Reiter RJ, 2016.(REITER et al., 2016).

Devido a sua característica anfifílica, a melatonina é disposta em muitos tecidos já que consegue atravessar facilmente a BHE ou a partir do sangue e do líquido cefalorraquidiano (LCR) para tecidos alvo (MELHUIISH BEAUPRE et al., 2021). Mas, mesmo com a sua ampla distribuição, o tecido mais afetado por este hormônio é o cérebro, de maneira que a melatonina regula o ritmo circadiano, desenvolvimento da puberdade, afeta os neurônios do hipocampo na formação da memória, sendo usada como tratamento para distúrbios neurológicos como depressão, isquemia cerebral, lesão cerebral, doenças de Alzheimer e Parkinson (AHMAD et al., 2023). Algumas das vantagens da melatonina como tratamento de distúrbios neurológicos foram descritas em modelo animal de Parkinson, no qual este hormônio promoveu a neuroproteção, além de ser descrito como promotor de neurogênese, neuroplasticidade e dendritogênese em diversos modelos animais (WON; NA; KIM, 2021).

Quanto aos modelos de estudo deste hormônio, embora diversos estudos *in vitro* e *in vivo* descrevam ações neuroprotetoras da melatonina, os estudos clínicos são inconclusivos quanto ao seu papel na neuroproteção (CHITIMUS et al., 2020). Contudo, os trabalhos *in vivo* e *in vitro* estabeleceram diversas possíveis vias de ação da melatonina, dentre elas a inibição da via NFκB/COX-2 e o aumento expressivo de SIRT1 (KUMAR; HALDAR; VERMA, 2021). Além disso, este hormônio versátil nas suas funções já foi referido como protetor de danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e promotor de reparo, ou seja, foi capaz de preservar as funções celulares ao combater o estresse oxidativo

advindo de irradiação ultravioleta (UV) ou por meio de moléculas citotóxicas (TALIB, 2018).

#### 4 GLIOPROTEÇÃO

As funções gliais são amplas e vão desde a participação na sobrevivência neuronal, neurogênese, sinaptogênese, participação da transmissão sináptica, bem como transporte de nutrientes, promovendo a comunicação entre a periferia e cérebro (ARGENTE-ARIZÓN et al., 2017). Todas essas ações mediadas com o objetivo de proteção do SNC, em condições fisiológicas e patológicas, podem ser descritas como glioproteção (QUINCOZES-SANTOS et al., 2021).

Diversas moléculas são estudadas com o objetivo de investigar seu potencial glioprotetor, considerando o papel das células gliais na funcionalidade fisiológica do SNC. Nesse sentido, vários estudos utilizam como estratégias moléculas como o resveratrol e a guanosina (DIAS et al., 2022; QUINCOZES-SANTOS et al., 2014), de forma a entender o papel destas células e seus mecanismos de ação. A variabilidade de moléculas usadas para o tratamento e que demonstraram efeitos benéficos em cultura de astrócitos é amplo, já que diversas substâncias de origem vegetal possuem a versatilidade na promoção da glioproteção envolvendo isoflavonas, curcumina e sulforafano; bem como o uso do composto endógeno ácido lipóico com objetivo de promover um ambiente celular estável para que não desenvolva prejuízos a longo prazo (QUINCOZES-SANTOS et al., 2021).

Nesse sentido, diversas condições patológicas possuem em comum o desequilíbrio de parâmetros oxidantes, inflamatórios, acometimento em recursos metabólicos e excitotoxicidade, os quais envolvem diretamente a participação dos astrócitos (BÉLANGER; MAGISTRETTI, 2009). Logo, a modulação de

parâmetros astrocitários por moléculas como a melatonina pode ser um alvo promissor para a glioproteção.

## JUSTIFICATIVA

A melatonina apresenta diversas funções e mecanismos de ação que têm sido elucidados em cultura celular e *in vivo*, fornecendo a base para entender as contribuições desta molécula para a homeostase de diversos sistemas. Contudo, poucos estudos abordaram os possíveis efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e vias de transdução de sinal que a melatonina pode induzir em um cérebro maduro com conexões bem formadas, particularmente em relação aos astrócitos. Assim, ao considerar os aspectos das conexões celulares previamente estabelecidas no cérebro maduro, a cultura de astrócitos de ratos Wistar adultos pode fornecer respostas mais fidedignas quando comparada a cultura obtida de animais recém-nascidos. Além disso, astrócitos corticais são fundamentais para o entendimento da progressão de doenças cerebrais, que comumente estão associadas ao cérebro maduro. Portanto, o tratamento com melatonina na cultura astrocitária de roedores adultos pode promover a melhor compreensão dos efeitos da melatonina sobre parâmetros astrogliais e seu impacto no processo de envelhecimento.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da melatonina em cultura de astrócitos corticais de ratos Wistar adultos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar na cultura de astrócitos de roedores adultos:

- A morfologia e viabilidade celular após o tratamento com melatonina;
- Os níveis extracelulares de lactato;
- A atividade e expressão da enzima astrocitária GS;
- Os parâmetros redox, como produção de radicais livres pela oxidação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), níveis de GSH e expressão das enzimas GCL, SOD1 e SOD2;
- A liberação e/ou expressão de mediadores inflamatórios: IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e o NLRP3;
- Os potenciais mecanismos associados aos efeitos da melatonina, como a modulação da expressão gênica de NF $\kappa$ B, COX-2, iNOS, Nrf2, heme oxigenase 1 (HO-1), proteína cinase ativada por AMP (AMPK), coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 $\alpha$ ) e SIRT1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. B. et al. Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 6, p. 2437-2458, 8 ago. 2023.
- AMANOLLAHI, M. et al. The Dialogue Between Neuroinflammation and Adult Neurogenesis: Mechanisms Involved and Alterations in Neurological Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 923-959, 16 fev. 2023.
- AMARAL, F. G. DO; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472-479, ago. 2018.
- ANAVI, S.; TIROSH, O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 146, p. 16-35, jan. 2020.
- ARGENTE-ARIZÓN, P. et al. Glial cells and energy balance. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 58, n. 1, p. R59-R71, jan. 2017.
- ARIOZ, B. I. et al. Melatonin Attenuates LPS-Induced Acute Depressive-Like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Through the SIRT1/Nrf2 Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2 jul. 2019.
- ARÚS, B. A. et al. Resveratrol modulates GSH system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 428, n. 1-2, p. 67-77, 1 abr. 2017.
- BEAR, M. F. **Neurociências**. [s.l.] Grupo A, 2017.
- BEARD, E. et al. Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 11 jan. 2022.
- BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 281-295, 30 set. 2009.
- BELLAVER, B. et al. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. **Purinergic Signalling**, v. 11, n. 4, p. 571-580, 2 dez. 2015.
- BJØRKLUND, G. et al. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 120, p. 470-478, jan. 2021.

BLANCO, S. et al. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. **Nitric Oxide**, v. 62, p. 32-43, jan. 2017.

BOBERMIN, L. D. et al. Resveratrol prevents ammonia-induced mitochondrial dysfunction and cellular redox imbalance in C6 astroglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 276-285, 21 abr. 2018.

BOBERMIN, L. D. et al. Ammonia-Induced Glial-Inflammaging. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 8, p. 3552-3567, 15 ago. 2020.

BOBERMIN, L. D. et al. Lipopolysaccharide Induces Gliotoxicity in Hippocampal Astrocytes from Aged Rats: Insights About the Glioprotective Roles of Resveratrol. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1419-1439, 1 mar. 2022a.

BOBERMIN, L. D. et al. Sulforaphane Induces Glioprotection After LPS Challenge. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 3, p. 829-846, 20 abr. 2022b.

BONDY, S. C. et al. Melatonin Alters Age-Related Changes in Transcription Factors and Kinase Activation. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 12, p. 2035-2042, 10 dez. 2010.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. Em: **Free Radical and Antioxidant Protocols**. New Jersey: Humana Press, [s.d.]. p. 347-352.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 2, p. 98-105, abr. 2009.

CHEN, X. et al. Melatonin Prevents Mice Cortical Astrocytes From Hemin-Induced Toxicity Through Activating PKC $\alpha$ /Nrf2/HO-1 Signaling in vitro. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 25 jul. 2019a.

CHITIMUS, D. M. et al. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1211, 20 ago. 2020.

CINELLI, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 13 jan. 2020.

COHEN, J.; TORRES, C. Astrocyte senescence: Evidence and significance. **Aging Cell**, v. 18, n. 3, 27 jun. 2019a.

COLONNA, M.; BUTOVSKY, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. **Annual Review of Immunology**, v. 35, n. 1, p. 441-468, 26 abr. 2017.

DE SOUZA ALMEIDA, R. R. et al. Methylmalonic acid induces inflammatory response and redox homeostasis disruption in C6 astroglial cells: potential glioprotective roles of melatonin and resveratrol. **Amino Acids**, v. 54, n. 11, p. 1505-1517, 4 nov. 2022.

DIAS, F. R. P. et al. Glioprotective Effects of Resveratrol Against BMAA-Induced Astroglial Dysfunctions. **Neurotoxicity Research**, 1 abr. 2022.

DIAZ-CASTRO, B. et al. Molecular and functional properties of cortical astrocytes during peripherally induced neuroinflammation. **Cell Reports**, v. 36, n. 6, p. 109508, ago. 2021.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, n. 2, p. 161-167, 15 set. 2006.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. SOD1, more than just an antioxidant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 697, p. 108701, jan. 2021.

ESCARTIN, C.; GUILLEMAUD, O.; CARRILLO-DE SAUVAGE, M. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. **Glia**, v. 67, n. 12, p. 2221-2247, 19 dez. 2019.

FAN, Y.-Y.; HUO, J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? **Neurochemistry International**, v. 148, p. 105080, set. 2021.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 3, p. 138-145, mar. 2007.

FERLAZZO, N. et al. Is Melatonin the Cornucopia of the 21st Century? **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1088, 5 nov. 2020.

FOSTER, R. G. Melatonin. **Current Biology**, v. 31, n. 22, p. R1456-R1458, nov. 2021.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, fev. 2009.

GHASEMI, M. et al. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 26 nov. 2021.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 805-819, set. 2020.

GONZALEZ, A. Antioxidants and Neuron-Astrocyte Interplay in Brain Physiology: Melatonin, a Neighbor to Rely on. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 1, p. 34-50, 27 jan. 2021.

GRAVANDI, M. M. et al. Flavonoids modulate AMPK/PGC-1 $\alpha$  and interconnected pathways toward potential neuroprotective activities. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 7, p. 1501-1521, 14 out. 2021.

GUNATA, M.; PARLAKPINAR, H.; ACET, H. A. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. **Revue Neurologique**, v. 176, n. 3, p. 148-165, mar. 2020.

HAKVOORT, T. B. M. et al. Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification. **Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 281-293, 12 jan. 2017.

HARDELAND, R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edged blade. **Journal of Pineal Research**, v. 65, n. 4, 12 nov. 2018.

HARDELAND, R. Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1223, 11 mar. 2019.

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 121-135, 4 fev. 2018.

HU, X. et al. Role of Glial Cell-Derived Oxidative Stress in Blood-Brain Barrier Damage after Acute Ischemic Stroke. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1-14, 2 set. 2022.

JANG, D. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. **International Journal of**

**Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2719, 8 mar. 2021.

JAWABRI KH, S. S. **Physiology, Cerebral Cortex Functions**. [s.l.] StatPearls, 2023.

JAYAKUMAR, A. R.; NORENBERG, M. D. Glutamine Synthetase: Role in Neurological Disorders. Em: [s.l: s.n.]. p. 327-350.

JEON, S.-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 7, p. e245-e245, 15 jul. 2016.

JIANG, T.; CADENAS, E. Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. **Aging Cell**, v. 13, n. 6, p. 1059-1067, 19 dez. 2014.

KANDEL, ÉRICO; SCHWARTZ, JAMES; JESSEL, T. E OUTROS. **Princípios de Neurociências**. [s.l: s.n.].

KIKUGAWA, M. et al. Ferulic acid and its water-soluble derivatives inhibit nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in rat primary astrocytes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 8, p. 1607-1611, 3 ago. 2017.

KUMAR, J.; HALDAR, C.; VERMA, R. Melatonin Ameliorates LPS-Induced Testicular Nitro-oxidative Stress (iNOS/TNF $\alpha$ ) and Inflammation (NF-kB/COX-2) via Modulation of SIRT-1. **Reproductive Sciences**, v. 28, n. 12, p. 3417-3430, 30 dez. 2021.

KWON, H. S.; KOH, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 42, 26 dez. 2020.

KWON, K. J. et al. Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: a possible role in neuroprotection. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 2, p. 110-123, 15 mar. 2011.

LEITE SANTOS, C. et al. Age-dependent effects of resveratrol in hypothalamic astrocyte cultures. **NeuroReport**, v. 34, n. 8, p. 419-425, 17 maio 2023.

LENG, F.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p.

157-172, 14 mar. 2021.

LI, X. SIRT1 and energy metabolism. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 1, p. 51-60, 1 jan. 2013.

LI, X. et al. Lactate metabolism in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 305, 1 set. 2022.

LINNERBAUER, M.; ROTHHAMMER, V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 30 set. 2020.

LINNERBAUER, M.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. **Neuron**, v. 108, n. 4, p. 608-622, nov. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.

LOWRY, OLIVERH. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265- 275, nov. 1951.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, maio 2013.

LUSHCHAK, V. I. Interplay between bioenergetics and oxidative stress at normal brain aging. Aging as a result of increasing disbalance in the system oxidative stress-energy provision. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 473, n. 5, p. 713-722, 18 maio 2021.

MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 235-249, 8 abr. 2018.

MASUDA, T. et al. Specification of CNS macrophage subsets occurs postnatally in defined niches. **Nature**, v. 604, n. 7907, p. 740–748, 28 abr. 2022.

MELHUISE BEAUPRE, L. M. et al. Melatonin's neuroprotective role in mitochondria and its potential as a biomarker in aging, cognition and psychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 339, 2 jun. 2021.

MIAO, L.; ST. CLAIR, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes:

Implications in disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 344–356, ago. 2009.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, mar. 2011.

MINICH, D. M. et al. Is Melatonin the “Next Vitamin D”? A Review of Emerging Science, Clinical Uses, Safety, and Dietary Supplements. **Nutrients**, v. 14, n. 19, p. 3934, 22 set. 2022.

MOREL, L. et al. Molecular and Functional Properties of Regional Astrocytes in the Adult Brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 36, p. 8706–8717, 6 set. 2017.

MURALEEDHARAN, R.; DASGUPTA, B. AMMuraleedharan, R., & Dasgupta, B. (2022). AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. *The FEBS Journal*, 289(8), 2247–2262. <https://doi.org/10.1111/febs.16151> PK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 8, p. 2247–2262, 11 abr. 2022.

NAMPOOTHIRI, S. et al. Glial cells as integrators of peripheral and central signals in the regulation of energy homeostasis. **Nature Metabolism**, v. 4, n. 7, p. 813–825, 25 jul. 2022.

PARK, J.-S. et al. Antioxidant mechanism of isoflavone metabolites in hydrogen peroxide-stimulated rat primary astrocytes: critical role of hemeoxygenase-1 and NQO1 expression. **Journal of Neurochemistry**, v. 119, n. 5, p. 909–919, dez. 2011.

PATANI, R.; HARDINGHAM, G. E.; LIDDELOW, S. A. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 19, n. 7, p. 395–409, 12 jul. 2023.

PLANAS-FONTÁNEZ, T. M. et al. Roles of astrocytes in response to aging, Alzheimer’s disease and multiple sclerosis. **Brain Research**, v. 1764, p. 147464, ago. 2021.

QIN, M. et al. Protective effects of melatonin on the white matter damage of neonatal rats by regulating NLRP3 inflammasome activity. **NeuroReport**, v. 32, n. 9, p. 739–747, 9 jun. 2021.

QIN, W. et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by

inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- $\kappa$ B pathway. **Aging**, v. 11, n. 23, p. 11391–11415, 7 dez. 2019.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. The Janus Face of Resveratrol in Astroglial Cells. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 1, p. 30–41, 26 jul. 2009.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64372, 15 maio 2013.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: A putative role of heme oxygenase 1. **Journal of Neurochemistry**, v. 130, n. 1, p. 61–74, 2014.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Gliotoxicity and Glioprotection: the Dual Role of Glial Cells. **Molecular Neurobiology**. Springer, 1 dez. 2021.

RABINOWITZ, J. D.; ENERBÄCK, S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 7, p. 566–571, 20 jul. 2020.

REHMAN, S. et al. Neurological Enhancement Effects of Melatonin against Brain Injury-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration via AMPK/CREB Signaling. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 760, 21 jul. 2019.

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

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–278, out. 2016.

RIBEIRO, R. T. et al. I-2-Hydroxyglutaric Acid Administration to Neonatal Rats Elicits Marked Neurochemical Alterations and Long-Term Neurobehavioral Disabilities Mediated by Oxidative Stress. **Neurotoxicity Research**, v. 41, n. 2, p. 119–140, 29 abr. 2023.

RIUS-PÉREZ, S. et al. PGC-1  $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–20, 9 mar. 2020.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, jan. 2017.

SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O’GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, 6 jan. 2020.

SEVASTRE-BERGHIAN, A. C. et al. Neurotoxicity of Bisphenol A and the Impact of Melatonin Administration on Oxidative Stress, ERK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway, and Behavior in Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 6, p. 1882–1894, 14 dez. 2022.

SHAH, S. A. et al. Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 33–44, jan. 2017.

SHAO, B.-Z. et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 5 nov. 2015.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana**. [s.l.] Grupo A, 2017.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 249–263, 20 maio 2015.

SOUZA, D. G. et al. Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60282, 28 mar. 2013a.

SOUZA, D. G. et al. Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 28 mar. 2013b.

SOUZA, D. G. et al. Astrocytes from adult Wistar rats aged in vitro show changes in glial functions. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 93–97, nov. 2015.

SOUZA, D. G. et al. Anti-aging effects of guanosine in glial cells. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 4, p. 697–706, 1 dez. 2016a.

SOUZA, D. G. et al. Anti-aging effects of guanosine in glial cells. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 4, p. 697–706, 1 dez. 2016b.

SOVRANI, V. et al. Glioprotective effects of resveratrol in hypothalamic astrocyte cultures obtained from interferon receptor knockout (IFN $\alpha$ / $\beta$ R $^{-/-}$ ) mice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, 23 jun. 2023.

SWARNKAR, S. et al. Astrocyte Activation: A Key Step in Rotenone Induced Cytotoxicity and DNA Damage. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 10, p. 2178–2189, 31 out. 2012.

TALIB, W. Melatonin and Cancer Hallmarks. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 518, 26 fev. 2018.

THANGWONG, P. et al. Melatonin suppresses inflammation and blood–brain barrier disruption in rats with vascular dementia possibly by activating the SIRT1/PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\gamma$  signaling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 31, n. 3, p. 1481–1493, 5 jun. 2023.

TILSTRA, J. S. et al. NF- $\kappa$ B in Aging and Disease. **Aging and disease**, v. 2, n. 6, p. 449–65, dez. 2011.

VAN OLST, L. et al. Meningeal inflammation in multiple sclerosis induces phenotypic changes in cortical microglia that differentially associate with neurodegeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 141, n. 6, p. 881–899, 29 jun. 2021.

WON, E.; NA, K.-S.; KIM, Y.-K. Associations between Melatonin, Neuroinflammation, and Brain Alterations in Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 305, 28 dez. 2021.

WONG, S. Y. et al. Andrographolide induces Nrf2 and heme oxygenase 1 in astrocytes by activating p38 MAPK and ERK. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 251, 23 dez. 2016.

XIANG, J. et al. Correction: Melatonin-induced ApoE expression in mouse astrocytes protects endothelial cells from OGD-R induced injuries. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 240, 17 jul. 2020.

XU, W. et al. Melanocortin 1 receptor attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage by controlling mitochondrial metabolism via AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway in rats. **Theranostics**, v. 11, n. 2, p. 522–539, 2021.

YANG, S. et al. Melatonin Receptor Agonist Ramelteon Suppresses LPS-Induced Neuroinflammation in Astrocytes. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 1498–1505, 5 maio 2021.

YAO, C. et al. Melatonin attenuates expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in activated microglia induced by lipopolysaccharide (LPS). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 7, p. 437–446, 3 abr. 2019.

YAZICI-MUTLU, Ç.; KESKIN-AKTAN, A.; AKBULUT, K. G. Effects of curcumin

and melatonin treatment in the cerebral cortex of adult rats. **General physiology and biophysics**, v. 42, n. 01, p. 49–57, 2023.

ZHANG, H.; DAVIES, K. J. A.; FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 314–336, nov. 2015.

ZHOU, Y. et al. Novel aspects of glutamine synthetase in ammonia homeostasis. **Neurochemistry International**, v. 140, p. 104809, nov. 2020.

ZINATIZADEH, M. R. et al. The Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 3, p. 287–297, maio 2021.