

Rosana Fátima Dantas Ferreira

Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados – implicações no comportamento alimentar e peso corporal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

Ferreira RFD. Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados – implicações no comportamento alimentar e peso corporal. [tese (Doutorado em Fisiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal durante a noite. Como seus ritmos circulatorios são robustos e previsíveis eles são fortes sincronizadores para a expressão de vários processos fisiológicos, incluindo o metabolismo energético. Porém em animais pinealectomizados a concentração plasmática de melatonina é abolida o que acompanha alterações fisiológicas como resistência à insulina e desequilíbrio entre requerimento e mobilização energética do tecido adiposo. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação de melatonina diretamente no sistema nervoso central, através de injeção intraventricular no terceiro ventrículo. Pretendeu-se estudar a ingestão alimentar, a evolução ponderal e a resposta insulínica periférica. Os resultados obtidos indicam, em primeiro lugar, que a retirada da melatonina por pinealectomia, provoca um aumento do consumo alimentar e um considerável aumento de peso. Mostrou-se, ainda, que a reposição terapêutica de melatonina nestes animais, por via intracerebroventricular, é capaz de provocar a diminuição do consumo alimentar, assim como uma diminuição expressiva do peso corporal. Observou-se, também, que a administração de melatonina nos animais controles regularizam o peso corpóreo, impedindo o aumento de peso próprio do avançar da idade. Coerentemente, observou-se que a melatonina foi um agente importante na redução de gordura corporal, evidenciada na diminuição de gordura nos tecidos adiposos periepipedidimal e retroperitoneal nos animais tratados.

Palavras-chave: Melatonina. Comportamento alimentar. Resistência à insulina. Pinealectomia. Injeção intracerebroventricular.

ABSTRACT

Ferreira RFD. Effects of therapeutic central replacement of melatonin in pinealectomized animals - implications on feeding behavior and body weight. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland during the night. As its circulatory rhythm is robust and predictable it is a strong synchronizer for the expression of several physiological processes, including energy metabolism. But in pinealectomized animals plasma concentration of melatonin is abolished, leading to physiological changes such as insulin resistance and imbalance between energy requirement and mobilization from adipose tissue. The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation of melatonin directly into the central nervous system through intracerebroventricular injection in the third ventricle. It was intended to study the food intake, weight gain and peripheral insulin sensitivity. The results obtained indicate, at first, that the withdrawal of melatonin by pinealectomy causes an increase in food consumption and a considerable weight gain. It was shown furthermore that daily icv melatonin replacement therapy in these animals can counteract both effects. It was observed also that the daily administration of melatonin in control animals regulates body weight, preventing weight gain characteristic of aging. Finally, it was also observed that melatonin-induced decrease in body weight is due to a reduction of fat in retroperitoneal and periepididimal adipose tissues.

Keywords: Melatonin. Feeding Behavior. Insulin Resistance. Pinealectomy. Intracerebroventricular Injection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Glândula Pineal e seu principal hormônio: a Melatonina

A glândula pineal é uma estrutura epitalâmica pequena e única, situada dorsalmente à região caudal do diencéfalo. Deriva-se de células neuroectodérmicas e desenvolve-se a partir de uma evaginação do teto da parede do terceiro ventrículo (Kappers, 1960).

Nos roedores, a glândula pineal apresenta três porções distintas que formam o complexo pineal: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial (figura 1). A pineal profunda, ou lâmina intercalar, está localizada entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular chamada de recesso pineal (RP) (Moller, 1992).

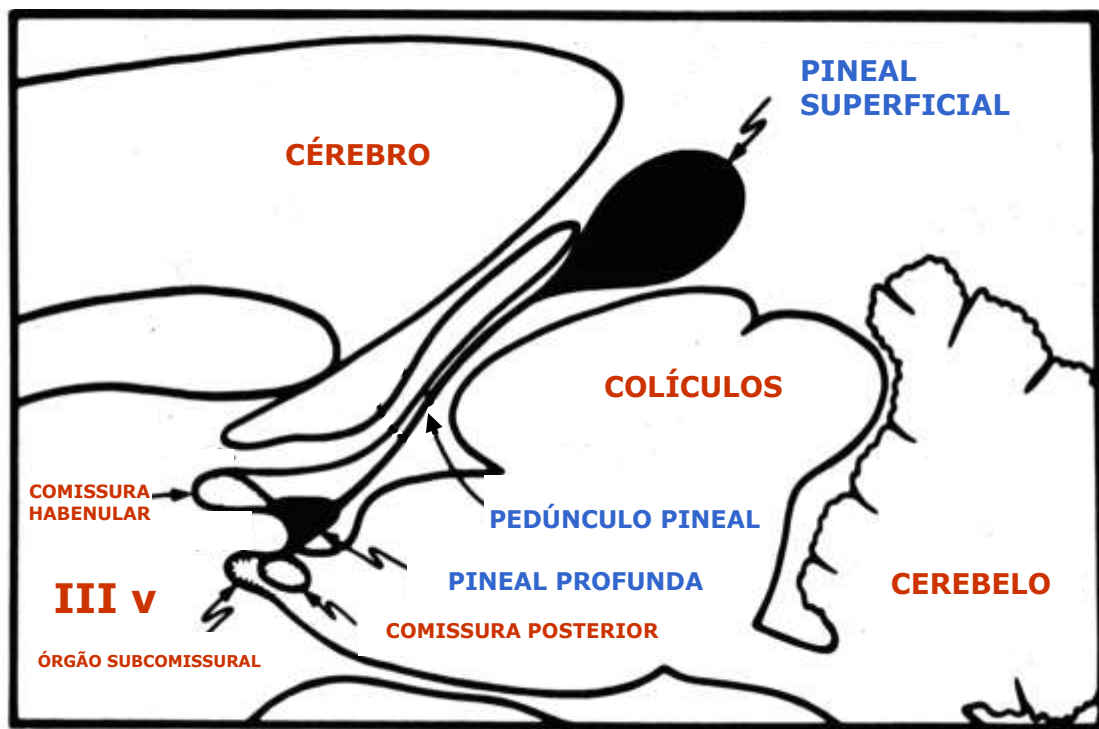


Figura 1. O Complexo pineal.

A glândula pineal apresenta células neuronais modificadas, os pinealócitos, que secretam o hormônio MEL (figura 2) (Simonneaux, Ribelayga, 2003).

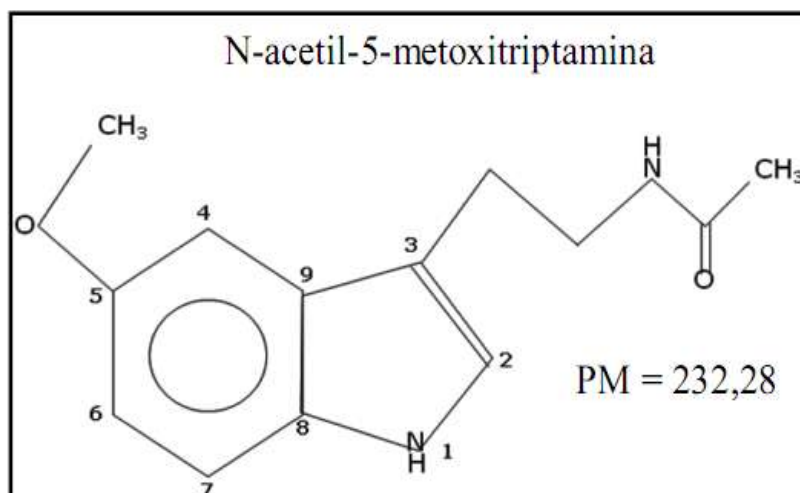


Figura 2. Estrutura molecular da melatonina.

Em todos os vertebrados independentemente se o animal tem hábitos diurnos ou noturnos, a produção de MEL é exclusivamente noturna e a magnitude e duração da sua concentração dependem exclusivamente do período escuro, apresentando assim, uma variação circadiana e sazonal de acordo com a duração do fotoperíodo. (Carneiro et al., 1994).

O padrão circadiano da produção e secreção de MEL é determinada pelos Núcleos Supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQ) (Klein, Moore, 1979). A atividade do NSQ é sincronizada ao ciclo claro-escuro ambiental, pela luz percebida pela retina. O sinal gerado na retina é transmitido para o NSQ pelo trato retino-hipotalâmico (Arendt, Skene, 2005). Células ganglionares retinianas glutamatérgicas projetam-se para o NSQ enviando a transmissão fótica dos sinais luminosos para o NSQ. Fibras GABAérgicas provenientes do NSQ inervam o Núcleo Paraventricular hipotalâmico (NPV). Para controlar a função da pineal, fibras eferentes do NPV contendo vasopressina passam pelo feixe prosencefálico medial e formação reticular e fazem conexão sináptica com células na coluna intermédio-lateral na medula espinhal torácica alta, de onde fibras pré-ganglionares simpáticas se projetam para o gânglio cervical superior (GCS) (Moore, 1996). As fibras pós-ganglionares simpáticas originadas no GCS liberam noradrenalina (NOR) na glândula pineal, primordialmente durante a noite.

Na glândula, o triptofano é captado da corrente sanguínea e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) na mitocôndria dos pinealócitos pela triptofano-hidroxilase do tipo 2 (TPH) (Lovenberg et al., 1967). O 5-HTP é então convertido em serotonina

(5-HT) no citosol dos pinealócitos sob a ação da descarboxilase de L-aminoácido aromáticos (Lovenberg et al., 1962; Snyder, Axelrod, 1964). A concentração de serotonina é maior na glândula pineal do que em qualquer outro tecido do Sistema Nervoso Central (SNC). A serotonina tem uma variação circadiana que determina sua alta concentração durante o dia e baixa concentração durante a noite (Klein et al., 1992, Mefford et al., 1983). Essa baixa concentração da serotonina no período escuro se deve a dois fatores. Primeiro, a noradrenalina liberada no interstício da glândula, estimula os receptores alfa-adrenérgicos nos pinealócitos provocando a liberação da serotonina (Aloyo, Walker, 1988; Olcese, Munger, 1994; Sudgen, Klein, 1984). Em segundo, a serotonina é metabolizada na via de síntese de melatonina como descrito a seguir. A 5-HT é primeiro acetilada pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) em N-acetilserotonina (NAS) (Voisin et al., 1984; Weissbach et al., 1960), então é O-metilada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), dando origem à 5-metoxi-N-acetilriptamina (MEL) (Axelrod, Weissbach, 1960) (figura 3).

A enzima passo limitante da produção de MEL é a AA-NAT, pois se observa um aumento noturno de mais de 150 vezes no RNAm que codifica essa enzima (Roseboom et al., 1996).

Graças às características de solubilidade da sua molécula, a melatonina nos pinealócitos não é armazenada sendo, imediatamente liberada na corrente sanguínea e no terceiro ventrículo (através do recesso pineal) (Reiter, 1991). A melatonina plasmática circula ligada à albumina. Sua meia vida no sangue é relativamente curta (10-40 min) e numa única passagem pelo fígado, 90% da melatonina é metabolizada. A MEL captada pelas células hepáticas é convertida em 6-hidroximelatonina que, após conjugação com sulfatos, forma a 6-sulfatoximelatonina que é excretada na urina (Reiter, 1991). No cérebro a melatonina é degradada via clivagem oxidativa do anel pirrólico dando origem a N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). A AFMK é convertida finalmente a 5-acetil-5-metoxiquinuramina (Zawilska et al., 2009).

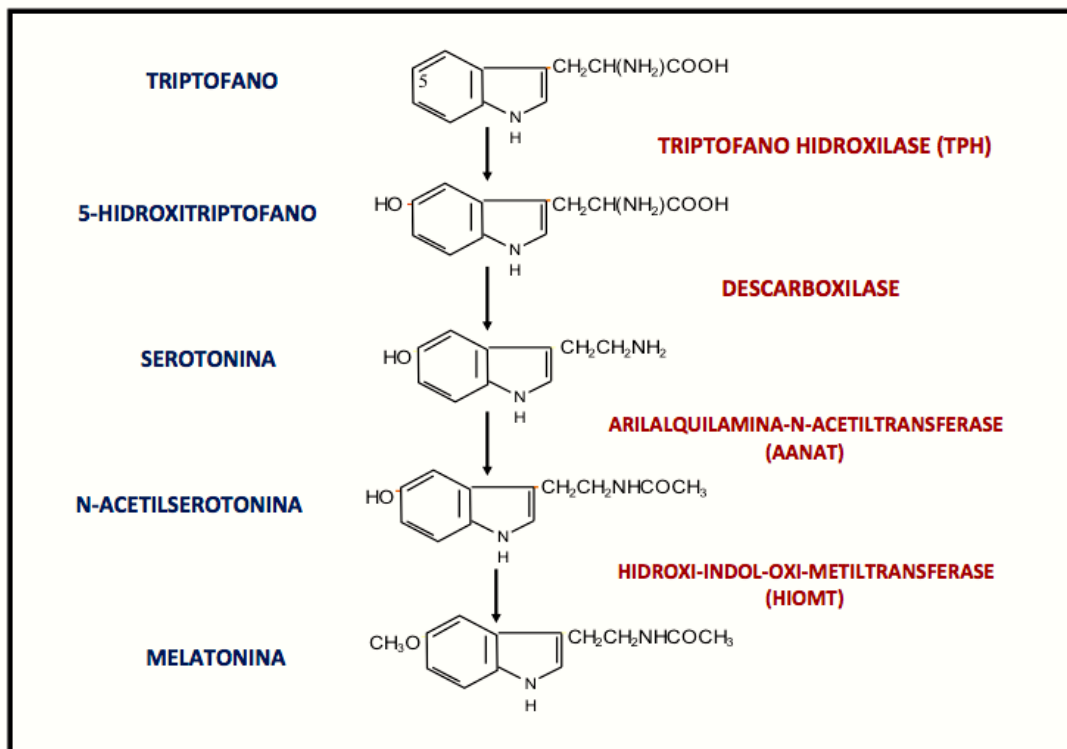


Figura 3. Via de produção da melatonina (Adaptado de CIPOLLA-NETO E AFECHE, 2008).

A melatonina é o principal hormônio produzido pela glândula pineal e apresenta perfil circadiano de concentração plasmática, com produção máxima ocorrendo na fase escura do ciclo claro-escuro (Reiter, 1991). Este hormônio tem portanto, como principal ação sinalizar ao meio interno as alterações ambientais circadianas e sazonais.

Em humanos, o ritmo circadiano de MEL é desenvolvido por volta dos seis meses de vida e alcança seus maiores níveis entre 4 e 7 anos de idade. Na puberdade há uma queda nas concentrações plasmáticas de MEL e depois disso as concentrações diminuem gradualmente com o avançar da idade. Como consequência, em indivíduos idosos a produção de melatonina noturna equivale a 20% da que o indivíduo produzia quando adulto (Karasek, 2004).

Além da melatonina pineal, outras estruturas periféricas como glândula de Harder, fígado, testículos, ovários, sistema vascular, trato gastrintestinal, musculatura lisa, células do sistema imune, células da pele e retina também produzem melatonina, porém somente com ação local, autócrina ou parácrina (Simonneaux, Ribelayga, 2003). Apesar de a melatonina ser produzida em outros tecidos que não a glândula pineal, a contribuição plasmática desse hormônio é estritamente de origem

pineal (Reiter, 1991), ou seja, quando a glândula pineal é retirada cirurgicamente, o aumento na concentração noturna observada no plasma é abolida (Lewy et al., 1980; Ozaki, Lynch, 1976).

1.2 Os mecanismos de ação da Melatonina

A mensagem hormonal da MEL liberada pela glândula pineal durante a noite é distribuída rapidamente a estruturas centrais e periféricas graças a seu baixo peso molecular (PM = 232,28) e característica anfifílica, ou seja, difunde-se tanto em meios hidrofílicos como lipofílicos graças aos grupos benzeno e anel pirrólico, além dos grupamentos metoxi no carbono 5 e acil ligado ao grupamento amina (figura 2) (Cipolla- Neto, Afeche, 2008).

A melatonina pode exercer sua ação tanto diretamente atravessando as membranas e ligando-se a moléculas intracelulares como por intermédio de receptores de membrana e receptores nucleares.

Dois tipos de receptores de membrana acoplados à proteína G foram clonados e caracterizados: MT-1 e MT-2. Estes receptores são amplamente distribuídos no organismo, tanto no sistema nervoso central quanto nos diversos órgãos e tecidos periféricos (Simoneaux, Ribelayga, 2003).

A expressão de receptores do tipo MT-1 já foi descrita no sistema cardiovascular (incluindo vasos sanguíneos periféricos, aorta e coração), sistema imune, testículos, ovários, pele, rins, pulmão, glândulas endócrinas (adrenal, tireóide, gônadas, pâncreas endócrino), placenta, mamas, retina, fígado, e baço. No cérebro esse receptor é encontrado predominantemente no hipotálamo (em particular, nos núcleos supraquiasmáticos), na área preóptica, cerebelo, caudado-putamen, tálamo, hipocampo, substância negra e área tegmentar ventral (Slominski et al., 2012). Em 2006, Wu et al., descreveram a distribuição de receptores de melatonina MT1 no hipotálamo de humanos. Esses receptores são expressos no núcleo paraventricular, ventromedial, periventricular, supraóptico, dorsomedial entre outras áreas hipotalâmicas.

O receptor do tipo MT-2 também é largamente distribuído, podendo ser expresso periféricamente no sistema imune, retina, vasos sanguíneos, testículos, rins, trato gastrointestinal, glândulas mamárias, tecido adiposo e pele e centralmente

no hipotálamo, e hipófise (em particular na pars tuberalis hipofisária) (Slominski et al., 2012).

Esses receptores são responsáveis por uma variedade grande de efeitos intracelulares, dependendo do tecido. São receptores ligados às proteínas G_i , G_o , G_q e G_{11} . Sua ligação conduz a uma alteração nas concentrações de nucleotídeos cíclicos intracelulares como AMPc e GMPc e nos níveis de cálcio intracelular, leva à ativação de certos subtipos de proteína quinase C, influencia na localização intracelular de receptores de hormônios esteroides e regula a sinalização da proteína G (Pandi-Perumal et al., 2008). Esses efeitos intracelulares levarão à expressão de vários efeitos fisiológicos importantes como: imunomodulação, regulação de funções endócrinas, da atividade cardiovascular, pigmentação da pele, ação anticarcinogênica entre outros, sendo esses receptores, inclusive, alvos farmacológicos cada vez mais atrativos (Slominski et al., 2012).

A MEL é também ligante para receptores nucleares órfãos relacionados ao ácido retinóico (RZR/ROR α) (Pandi-Perumal, 2008). O significado funcional desses receptores nucleares ainda é questão de debate (Zawilska et al., 2009).

Além disso, a melatonina age através de mecanismos não dependentes de receptor neutralizando a maior parte dos radicais livres tóxicos e ainda estimulando a atividade de várias enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (ações essas mediadas por receptores) apresentando, portanto, uma importante ação antioxidante reduzindo danos oxidativos ao DNA e destruição da membrana lipídica das células (Reiter et al., 1998).

Como se pode imaginar observando a ampla distribuição dos receptores além de suas ações independentes de receptores, a MEL pode levar a uma série incontável de efeitos que vão refletir na sua modulação nos mais diversas funções nos mais diversos tecidos.

Neste trabalho daremos foco ao papel das ações centrais da melatonina na regulação do comportamento alimentar e metabolismo energético.

1.3 Ações da melatonina no comportamento alimentar e metabolismo energético

Um número crescente de estudos tem revelado o complexo papel da melatonina e os efeitos da pinealectomia (retirada da glândula pineal e consequente abolição da melatonina circulante) na modulação do metabolismo energético e comportamento alimentar.

Em 2005, Borges-Silva, et al., demonstraram em estudo com ratos pinealectomizados, que a glândula pineal exerce regulação no metabolismo lipídico e que a remoção da glândula causa uma severa alteração no balanço entre lipogênese e lipólise. Outro trabalho mostrou que ratos pinealectomizados apresentam uma redução de 70% na expressão de GLUT-4 em tecido adiposo branco e que a suplementação de MEL restaura seu conteúdo a níveis de animais controle (Zanquetta et al., 2003). Estudo realizado por Sener (2004), comprovou que o tratamento com melatonina reduziu os altos níveis de colesterol no plasma e fígado de ratos alimentados com dieta com alto nível de colesterol. Embora o mecanismo desta ação hipolipidêmica da melatonina não seja conhecido, este efeito pode estar relacionado com o catabolismo do colesterol a ácidos biliares (Chan et al., 1995) e inibição da síntese de colesterol e atividade do receptor de LDL (Muller-Wieland et al., 1994). Com base nesses dados podemos afirmar que a melatonina regula aspectos da biologia dos adipócitos que influenciam o metabolismo energético, lipidemia e peso corporal como, por exemplo, lipólise, diferenciação dos adipócitos e captação de ácidos graxos (Cipolla-Neto et al., 2014).

Outros estudos têm analisado a modulação do metabolismo dos carboidratos pela melatonina. Lima et al. (1998), demonstraram que 30 dias depois de pinealectomizados, ratos desenvolveram intolerância à glicose, diminuição da resposta de células adiposas à insulina, redução de GLUT 4 em tecido muscular e adiposo, e alteração do ritmo diário da secreção de insulina. Picinato et al. (2002), em investigação de tecidos pancreáticos isolados de ratos, enfatizou o importante papel exercido pela glândula pineal no controle dos ritmos circadianos envolvidos na regulação da homeostase da glicose. Este trabalho demonstrou a presença de um forte ritmo de 24 horas na secreção de insulina. A pinealectomia levou a uma alteração na amplitude e a um avanço de fase deste ritmo. Portanto o pico de ação da insulina deixou de estar sincronizado com os ritmos de sono e vigília e de alimentação desses animais. Sabe-se que MEL age via receptores MT-1 e MT-2 para suprimir neoglicogênese hepática em ratos. Assim, MEL ativa a comunicação

hipotálamo/fígado que contribui para ajustes circadianos da neoglicogênese (Faria et al., 2013). Outro experimento mostrou que a injeção central de melatonina foi mais efetiva que injeção sistêmica nas mudanças nas concentrações de insulina e glucagon plasmáticas e na inibição da hiperglicemia causada pela injeção central de 2-deoxy-d-glucose, sugerindo que o sítio anti-hiperglicêmico da melatonina seja no sistema nervoso central (Shima et al., 1997). Assim, MEL contribui para a homeostase da glicose seja diminuindo a neoglicogênese seja revertendo a resistência à insulina aumentando a captação de glicose em adipócitos e músculo esquelético.

As alterações observadas pela pinealectomia ou diminuição da melatonina circulante em animais idosos levam a um desequilíbrio do balanço energético total resultando em sérios distúrbios metabólicos incluindo obesidade.

O hipotálamo é a região do sistema nervoso central responsável por integrar informações periféricas e centrais sobre o status energético do organismo. A integração desses sinais culminam na geração de respostas fisiológicas que regulam o balanço energético através da modulação do apetite e gasto energético (Schneeberger et al., 2014).

Novas informações sobre circuitos neurais que controlam o consumo alimentar são imprescindíveis para a ampliação do conhecimento sobre homeostase energética. O consumo alimentar é controlado por um processo complexo visto que nos últimos anos uma lista crescente de vias de sinalização tem sido descrita. E cada via descoberta é um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da obesidade (Schwartz et al. 2000).

Além de importante papel na modulação do metabolismo energético existem evidências de que a melatonina poderia influenciar também comportamento alimentar que é o fator que mais influencia o metabolismo energético. Por exemplo, a pineal de roedores recebe densa inervação de áreas hipotalâmicas envolvidas no controle do comportamento alimentar como o núcleo paraventricular e o hipotálamo lateral (Simmoneaux, Ribelayga, 2003). Além disso, em 2006, Wu et al. descreveram a distribuição de receptores de melatonina MT1 no hipotálamo de humanos. Esses receptores são expressos no núcleo paraventricular, ventromedial, periventricular, supraóptico, dorsomedial entre outras áreas hipotalâmicas sendo essas áreas de extrema importância na regulação central do consumo alimentar e termogênese.

Vários trabalhos já demonstraram que a melatonina influencia o consumo

alimentar e a termogênese em mamíferos. Por exemplo, Montano et al. (2010), viram que a suplementação via oral de melatonina por 4 semanas causa saciedade em ratos e que esta mudança está relacionada às mudanças na frequência, tamanho e duração da alimentação levando a uma queda no consumo alimentar total. Já em trabalho do nosso grupo observou-se uma redução do consumo alimentar acompanhada de queda no peso corporal, no tecido adiposo periepídídimo e melhora da resposta à insulina em vários tecidos metabolicamente ativos (Zanuto et al., 2013).

Trabalhos utilizando outros modelos experimentais como peixes, demonstraram que a melatonina administrada na água possui uma ação hipofágica e conseqüentemente de diminuição do peso corporal em várias espécies (de Pedro et al., 2008; Pinillos et al., 2001; Rubio et al., 2004).

Uma série de trabalhos (Puchalski et al., 2003; Rasmussen et al., 1999; Wolden-Hanson et al., 2000) demonstraram que a administração via oral diária de melatonina a ratos Sprague-Dawley de meia idade e idosos (10 – 22 meses), restaurou os perfis plasmáticos de melatonina e leptina a níveis de ratos jovens (4 meses), além de diminuir o peso corporal e gordura visceral, segundo eles, revertendo em partes a síndrome metabólica estabelecida com o avançar da idade. Trabalhos do nosso grupo também mostram definitivamente que o tratamento de animais idosos com melatonina reduz, consideravelmente, o peso corpóreo, além de reestabelecer a sinalização insulínica plena e reestabelecer as adaptações metabólicas associadas ao exercício físico aeróbio (Mendes et al., 2013; Zanuto et al., 2013).

Esses trabalhos em conjunto demonstram a grande influência da melatonina em modular, de forma geral, o resultado final do balanço energético que é o peso corpóreo.

7 CONCLUSÃO

Portanto, o presente trabalho mostra que a melatonina tem um efeito antiobesogênico evidente, não só pela sua ação periférica já amplamente demonstrada (Cipolla-Neto et al., 2014) mas, também, pela sua ação central anorexigênica discreta e, possivelmente, ativadora do catabolismo por intensificação do metabolismo do TAM. Além disso, a ampla distribuição de receptores de melatonina no SNC fornecem bases neurobiológicas para a participação da melatonina na regulação de funções hipotalâmicas como o comportamento alimentar e possivelmente na termogênese.

REFERÊNCIAS¹

- Aloyo VJ, Walker, RF. Alpha-adrenergic control of serotonin release from rat pineal glands. *Neuroendocrinology*. 1988;48:61-6.
- Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. 2005;9:25-39.
- Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131:1312.
- Berthold HR, Lenard NR, Shin AC. Food reward, hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R1266:R1277.
- Borges-Silva C, Takada J, Alonso-Vale M, Peres, SB, Fonseca-Alanis, MH, Andreotti S, Cipolla-Neto J, Pithon-Curi T, Lima, FB. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. *J Pineal Res*. 2007;43: 96-103.
- Carneiro RC, Toffoleto O, Cipolla-Neto J, Markus RP. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *Eur J Pharmacol*. 1996;12:257(1-2):73-7.
- Chan TY, Tang PL. Effect Of Melatonin On The Maintenance Of Cholesterol Homeostasis In The Rat. *Endocrinol Res*. 1995;21:681-96.
- Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. 2014;56:371-81.
- Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal. In: Aires MM, editor. *Fisiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008. p. 981-90.
- Faria JA, Kinote A, Ignacio-Souza LM, Araújo TM, Razolli DS, Doneda DL, Paschoal LB, Lellis-Santos C, Bortolini GL, Velloso LA, Bordin S, Anê GF. Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305:230-242.
- Garcia RAP, Afeche SC, Scialfa JH, Amaral FG, Santos SHJ, Lima FB, Young ME, Cipolla Neto J. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sciences*. 2008;82:108-114.
- Ginter E, Simko V. Brown adipose tissue – a potencial target to combat obesity. *Bratisl Lek Listy*. 2012;113(1):52-6.
- Kappers JA. The development, topographical relations and innervations of epiphysis cerebri in albin rat. *Zeitschrift fur Zellforschung*. 1960;52:163-215.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Experimental Gerontology*. 2004;39:1723-9.

Klein DC, Moore RY. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 1979;174:245-62.

Klein DC, Schaad NL, Namboodiri MAA, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem Soc Trans*. 1992;20(2):299-304.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DK, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*. 1980;210(4475):1267-9.

Lima FB, Machado UF, Bartol I. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol*. 1998;275:934-41.

Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend, S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem*. 1962;237:89-92.

Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation, measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. *Science*. 1967;155:217-19.

Mefford IN, Chag P, Klein DC, Namboodiri MA, Sudgen D, Barchas J. Reciprocal day/night relationships between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. *Endocrinology*. 1983;113(5):1582-6.

Moller M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the pineal gland. *Microsc Res Tech*. 1992;12(3):188-204.

Montano ME, Molpeceres V, Mauriz JL, Garzo E, Cruz IB, González P, Barrio JP. Effects of melatonin on food and water intake in streptozotocin- diabetic and non-diabetic male wistar rats. *Nutr Hosp*. 2010;25(6):931-8.

Moore RY. Neural control of pineal gland. *Behav. Brain Res*. 1996;73:125-130.

Muller-Wieland D, Behnke B, Koopmann K. Melatonin inhibits ldl receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leucocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1994;202:416-21.

Olcese J, Münker M. Extracellular serotonin promotes melatonin release from cultured rat pinealocytes: evidence for an S₂-type receptor-mediated autocrine feedback. *Brain Res*. 1994;643(1-2):150-4.

Ozaki YJ. Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology*. 1976;99(2):641-4.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*. 2008;85:335-53.

Pandi-Perumal SR, Zisapel N, Srinivasan V, Cardinali DP. Melatonin and sleep in aging population. *Experimental Gerontology*. 2005;40:911-25.

Peliciari-Garcia RA, Marçal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, Afeche SC, Cipolla-Neto J, Carvalho CRO. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci*. 2010;87(5-6):169-74.

Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AC, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res*. 2002;33:172-77.

Reiter RJ, Tan DX, Qi WB. Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1998;19(6):575-81.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *The Endocrine Society*. 1991;12:151-80.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 1993;49:654-64.

Roseboom PH, Coon SL, Baler R, Mccune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*. 1996;137(7):3033-44.

Rosenstein RE, Cardinali DP. Central gabaergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain. *Neurochem Int*. 1990;17(3):373-9.

Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2002;404:661-71.

Sener G, Balkan J, Cevikbas U, Keyer-Uysal M, Uysal M. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. *J Pineal Res*. 2004;36(6):212-16.

Shimaa T, Chuna SJ, Nijimab A, Bizot-Espiardc J, Guardiola-Lemaitrec B, Hosokawaa M, Nagai K. Melatonin suppresses hyperglycemia caused by intracerebroventricular injection of 2-deoxy-d-glucose in rats. *Neuroscience Letters*. 1997;119-22.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev*. 2003;55:325-95.

Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;351:152-66.

Snyder SH, Axelrod J. A sensitive assay for 5-hydroxytryptophan decarboxylase. *Biochem Pharmacol*. 1964;13:805-6.

Stakov E, Fraschini F, Reiter RJ. Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Rev*. 1991;16:245-56.

Sugden D, Klein DC. Rat pineal alpha 1-adrenoreceptors: identification and characterization using [125I]iodo-2-[beta-(4-hydroxyphenyl)-ethylaminomethyl] tetralone. *Endocrinology*. 1984;114:435-40.

Tan DX, Machester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter, RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev*. 2011;12(3):167-88.

Toubin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4350-4.

Voisin P, Namboodiri MAA, Klein DC. Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem*. 1984;259:10913-18.

Wang F, Li J, Wu C, Yang J, Xu F, Zhao Q. The GABA receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. *Pharm Biochem Behav*. 2003;74:573-8.

Weissbach H, Redfield BG, Axelrod, J. Biosynthesis of melatonin: enzymatic conversion of serotonin to N-acetyl-serotonin. *Biochem Biophys Acta*. 1960;43:352-53.

Wu YH, Zhou JN, Baselar R, Unmihopa U, Bao A, Jockers R, Heerikhuizen JV, Swaab DF. Distribution Of MT1 Melatonin Receptor Immunoreactivity In The Human Hypothalamus And Pituitary Gland: Colocalization Of MT1 With Vasopressin, Oxytocin And Corticotrophin- Releasing Hormone. *The Journal of Comparative Neurology*. 2006;499:897-910.

Zanquetta MM, Seraphim PM, Sumida DM., Cipolla-Neto J, Mechado UF. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res*. 2003;35(3):141-8.

Zanuto R, Siqueira-Filho MA, Caperuto LC, Bacurau RFP, Hirata E, Peliciari-Garcia RA, Amaral FG, Marçal AC, Ribeiro LM, Camporez JPG, Carpinelli AF, Bordin S, Cipolla-Neto J, Carvalho CRO. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *J Pineal Res*. 2013;55(2):156-65.

Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports*. 2009;61:383-410.