RICARDO ZANUTO PEREIRA

A suplementação com melatonina promove melhora nas etapas iniciais da sinalização insulínica no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em ratos velhos e obesos, precedendo a perda de peso

> São Paulo 2009

RICARDO ZANUTO PEREIRA

A suplementação com melatonina promove melhora nas etapas iniciais da sinalização insulínica no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em ratos velhos e obesos, precedendo a perda de peso

> Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Carla Roberta de O. Carvalho

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zanuto, Ricardo.

A suplementação com melatonina promove melhora nas etapas iniciais da sinalização insulínica no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em ratos velhos e obesos, precedendo a perda de peso / Ricardo Zanuto. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Mecanismos intracelulares da ação insulínica e interação com outros hormônios.

Versão do título para o inglês: Melatonin supplementation to obese and aged rats induces up-regulation of the insulin intracellular signaling pathway in the hypothalamus, liver, skeletal muscle and adipose tissue preceding weight loss.

Descritores: 1. Melatonina 2. Insulina 3. Envelhecimento 4. Obesidade 5. Sinalização 6. Intracelular I. Carvalho, Carla Roberta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0125/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Ricardo Zanuto.
Título da Tese:	A suplementação com melatonina promove melhora nas etapas iniciais da sinalização insulínica no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em ratos velhos e obesos, precedendo a perda de peso.
Orientador(a):	Carla Roberta de Oliveira Carvalho.
A Comissão Julgadora	dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salies Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br

COMESÃO DE ÉTICA EM E-PEPIZABITAÇÃO ALIMAL

Decl. CEEA.034.07

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 79/04/CEEA, datado de 16.12.04 e por solicitação da Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho, autorizo a inclusão do aluno Ricardo Zanuto Pereira ao projeto de pesquisa "O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: papel, obesidade, diabetes e envelhecimento" uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 22 de novembro de 2007.

Lottmar.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEEA- ICB/USP



Este trabalho é dedicado àqueles que incondicionalmente estiveram presentes ao meu lado ao longo desta jornada: Deus; minha avó Luiza, pelas orações; ao meu pai Ailton, imprescindível nas decisões; à minha mãe Izabel, pelo incansável apoio; à meus irmãos, Renato e Kelly, por tornarem minha vida mais leve; à minha esposa Clarissa, por seu sorriso nas horas difíceis; aos meus filhos Lucas e Henrique, razão de minha existência. Amo vocês.

Agradecimento especial: À minha orientadora e amiga Carla Roberta de Oliveira Carvalho, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis de minha vida. Obrigado pelo ser humano inestimável que és.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A minha maravilhosa família que sempre acreditou e apostou em mim, compreendendo minhas ausências.

Aos seres que involuntariamente me cederam à vida em prol do conhecimento científico.

À Prof^a Dr^a Emiko Hirata pelo invariável apoio em todos os momentos desta jornada e pela amizade que muito estimo.

Ao Prof^o Dr. José Cipolla Neto pelo auxílio e ensinamentos em suas disciplinas que muito contribuíram para minha formação.

Ao Prof^o Dr. Ângelo Carpinelli pela amizade e uso de seu laboratório.

Ao Prof^o Dr. Reury Frank Bacurau pela amizade, incentivo constante e apoio elementar no desenvolvimento do trabalho.

À Prof^a Dr^a Silvana Bordin e aos seus orientandos pelo carinho e dedicação.

À Prof^a Dr^a Maria Tereza Nunes inesquecível por suas disciplinas e carinho.

Ao Prof^o Dr. Fábio Bessa Lima e aos seus orientados pelo constante auxílio durante o desenvolvimento desta tese. Agradeço em especial à Sandra pela força nos momentos de correria.

Aos meus grandes amigos do laboratório pela afeição e apoio que sempre encontrei: Mário Filho, por ser um dos meus mais novos amigos de infância, por sua dedicação, carinho e apoio; Teca, por ter bom gosto inestimável ao escolher seu time de futebol e pelo bom humor; Anderson, pela força, paciência e auxílio em vários momentos; Ao João Paulo pelo apoio, dedicação e contribuição, que me foram de extrema importância; a Luciana Catunda pela amizade, força e auxílio nos momentos delicados. Agradecimento especial aos meus grandes amigos José Peralta, Aline e Waldecir de Paula por acompanharem esta trajetória e sempre acreditarem em mim.

À coordenação, secretaria e biblioteca da pós-graduação do programa de Fisiologia Humana do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos colegas, professores, funcionários e alunos do Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Ciências Biomédicas, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

"Quem acredita sempre alcança...". Flávio Venturini e Renato Russo

RESUMO

Zanuto R. Regulação das vias de transmissão do sinal intracelular da insulina em hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de ratos adultos: efeito do envelhecimento e da suplementação com melatonina [Tese (Doutorado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Com o avanço da idade há várias modificações consideradas fisiológicas como a redução na biossíntese e concentração plasmática da melatonina, aumento da resistência periférica à insulina com hiperinsulinemia compensatória. Concomitante a essas modificações há aumento da prevalência de várias doenças como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, obesidade entre outras. A insulina por sua vez, um hormônio central no metabolismo dos carboidratos, tem ações também no crescimento celular e no controle da ingestão alimentar. Nesse estudo avaliamos o efeito da reposição com melatonina a ratos envelhecidos e obesos sobre a sensibilidade e ação insulínica nos tecidos alvos clássicos e no hipotálamo desses animais. A reposição com melatonina por 8 semanas consecutivas resultou em aumento da sensibilidade à insulina com modificações nas etapas iniciais da ação insulínica nos tecidos estudados, sem, no entanto, modificar o peso dos animais. A expressão do receptor de insulina e de seus substratos IRS-1 (com exceção do tecido adiposo) e IRS-2 em fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e hipotálamo foi semelhante entre os grupos. Por outro lado, a resposta na intensidade da fosforilação dos substratos, IRS-1 e IRS-2, em hipotálamo dos ratos com melatonina após estímulo agudo com insulina é pelo menos o dobro do que o determinado nos ratos controles. Foi detectado aumento da fosforilação/ativação da proteína localizada a jusante aos IRS-1 e IRS-2, proteína AKT/PKB. Devido às características tecido-específicas dos efeitos do envelhecimento sobre a cascata da insulina, o grau de fosforilação do receptor de insulina (IR) e do IRS-2 no tecido hepático dos animais tratados também sofreram aumentos significativos, assim como também foi detectado aumento tanto da associação do IRS-1 e 2 com a PI 3-cinase com concomitante aumento na fosforilação da proteína AKT/PKB. De maneira semelhante, na musculatura esquelética dos animais, detectamos diferenças significativas quanto ao grau de fosforilação do IR e IRS-2 no protocolo de 8 semanas de reposição, porém este efeito pareceu não perdurar com o avanço do tratamento por mais um mês, embora houve aumento significativo, em ambos os protocolos, do grau de associação do IRS-2 com a PI 3-cinase e ativação das ERKS 1 e 2. No tecido adiposo dos animais, foi verificado implemento significativo tanto na fosforilação do IR como do IRS-1, e aumento na associação dos IRS-1 com a PI 3-cinase e proteínas SHP2 com consequente aumento significativo das ERKs 1 e 2. Ademais, a reposição por mais quatro semanas, ou seja, 12 semanas consecutivas, além de manter as alterações detectadas às 8 semanas de tratamento, foi acompanhada de redução significativa do peso corporal dos ratos e diminuição da ingestão alimentar. Em síntese, esses dados mostram que a reposição com melatonina a ratos com 12 meses de idade induz melhora da ação insulínica tanto nos tecidos alvos clássicos quanto no hipotálamo precedendo a redução de peso corporal e a ingestão alimentar. Assim, é possível considerar que a redução da produção de melatonina, que acompanha o processo de envelhecimento, é um dos fatores causais da resistência à insulina detectada com o avançar da idade e que a obesidade seja secundária à resistência à insulina.

Palavras-chave: Melatonina. Insulina. Envelhecimento. Obesidade.

ABSTRACT

Zanuto R. Regulation of pathways of intracellular signal transmission of insulin in the hypothalamus, liver, skeletal muscle and adipose tissue of adult rats: effects of aging and supplementation with melatonin [thesis (Doctoral)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

In the aging process there are several physiological changes such as insulin resistance accompanied of hyperinsulinemia, increased adiposity, reduced GH and melatonin plasma levels. There are also increased prevalence of type 2 diabetes and hypertension. Insulin is a pivotal hormone in the control of energetic homeostasis; it also mediates cellular growth and food intake. In the present study we evaluated the effect of melatonin supplementation upon insulin sensitivity and intracellular pathways in some target tissues (i.e. liver, skeletal muscle, adipose tissue, and hypothalamus) from aged and obese male Wistar rats. Eight consecutive weeks of melatonin supplementation throughout the tap water had no impact in the body weight of the rats; however, it improves the insulin sensitivity and the early steps of insulin signaling pathways in the tissues analyzed. The expression of insulin receptor and its substrate IRS-1 (except for adipose tissue) and IRS-2 in liver, skeletal muscle, adipose tissue and hypothalamus was similar between treated and control groups. Moreover, the response in the degree of IRS-1 and IRS-2 phosphorylation in hypothalamus of rats treated with melatonin after acute stimulation with insulin was, at least, twice as that observed in control rats. The phosphorylation/activation of the downstream protein, AKT / PKB, was also increased. Melatonin treatment induced tissue-specific modifications in the insulin intracellular cascade. The tyrosyl phosphorylation degree of insulin receptor (IR) and IRS-2 were enhanced, as well as, there were increased association of IRS-1 and 2 with PI 3-kinase with concomitant increase in serine phosphorylation of AKT / PKB in the liver of rats. In the skeletal muscle there were differences in the phosphorylation degree of the IR and the IRS-2 proteins at 8 weeks of treatment, which was not detected with further treatment. On the other hand, there was increased association of IRS-2 with PI 3-kinase and increased activation of ERKS 1 and 2 at 8 and 12 weeks of melatonin supplementation. In perigonadal adipose tissue there was increased tyrosyl phosphorylation of the IR and the IRS-1, with increase association of IRS-1 with PI 3kinase and IRS-1 with SHP2 protein, and subsequent improved in the ERKs 1 and 2 phosphorylation status. Furthermore, the additional treatment with melatonin for one month was accompanied by significant reduction in body weight and decrease food intake. In summary, our data show that melatonin supplementation to12-months-old obese rats improves insulin sensitivity and induces modulation in some of the early steps of insulin intracellular action in target tissues; these effects were observed even before body weight and food intake reduction. Thus, it is possible to consider that the physiological reduced melatonin production could be involved in the pathogenesis of the insulin resistance detected with aging and that obesity is secondary to insulin resistance.

Keywords: Melatonin. Insulin. Aging. Obesity. Insulin signaling pathway.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAIS	26
3.1.2 Soluções Utilizadas	26
3.2 ANIMAIS	28
3.3 MÉTODO	28
3.3.1 Suplementação com Melatonina	28
3.3.2 Experimentos para determinação do pico máximo de fosforilação induzida pela	
insulina dos IR, IRS-1, IRS-2, AKT, ERK-1 e 2, pJNK, pSHP2 e p70 ^{s6k} em hipotálamo,	
fígado, músculo esquelético e tecido adiposo	29
3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
3.3.4 Análise protéica por <i>immunoblotting</i>	30
3.3.5 Consumo Alimentar e Hídrico	31
3.3.6 Constante de Decaimento de Glicose (K _{ITT})	31
3.3.7 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	33
4.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL	33
4.2 INGESTÃO ALIMENTAR	34
4.3 CONSUMO HÍDRICO	35
4.4 CARACTERISTÍCAS GERAIS DOS RATOS	37
4.5 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS	
INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO HIPOTÁLAMO	38
4.5.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina e Substratos IRS-1 e 2	38
4.5.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina, dos Substratos do	
Receptor de Insulina (IRS-1 e 2) e Associação com a Proteína PI 3-cinase	39
4.5.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina, das Proteínas	
AKT/PKB, pERK 1 e 2 e pJNK	41
4.6 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS	
INICIAIS DA AÇAO INSULINICA NO FIGADO	43
4.6.1 Conteŭdo Proteico do Receptor de Insulina e Substratos IRS-1 e 2	43
4.6.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina, dos Substratos do	
Receptor de Insulina (IRS-1 e 2), da Associação com a ProteinaPI 3-cinase e SHP2	44
463 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido nela Insulina, das Proteínas	r-T
AKT/PKB, pERK 1 e 2, p70 ^{s6k} e pJNK	46
4.7 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS	
INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	48
4.7.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina e Substratos IRS-1 e 2	48
4.7.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina, dos Substratos do	
Receptor de Insulina (IRS-1 e 2) e da Associação com a Proteína PI 3-cinase	49

4.7.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina, das Proteínas AKT/PKB e pERK 1 e 2	51
4.8 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS	01
INICIAIS DA ACÃO INSULÍNICA NO TECIDO ADIPOSO	53
4.8.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina e do Substrato IRS-1	53
4.8.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina, dos Substratos do	
Receptor de Insulina (IRS-1 e 2) e da Associação com a Proteína PI 3-cinase e	
SHP2	54
4.8.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina, das Proteínas	
AKT/PKB, pERK 1 e 2 e pJNK	56
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	
APÊNDICE A – Manuscrito para Publicação I	
Melatonin supplementation to obese and aged rats induces up-regulation of the insulin	
intracellular signaling pathway in the hypothalamus preceding weight loss	86
APÊNDICE B – Manuscrito para Publicação II	
Regulation of insulin signalling transduction pathways in liver and skeletal muscle	
tissues from adult rats: effect of aging and melatonin supplementation	110
APÊNDICE C – Manuscrito para Publicação III	
Melatonin supplementation to obese and aged rats induces up-regulation of the insulin	
intracellular signaling pathway in visceral fat tissue preceding weight loss	136

1 INTRODUÇÃO

A glândula pineal, comum a todos os animais vertebrados, é uma estrutura epitalâmica pequena e única, situada dorsalmente às regiões caudais do diencéfalo, derivada de células neuroectodérmicas, desenvolvendo-se a partir de uma evaginação do teto da parede do terceiro ventrículo, de maneira similar à retina (Kappers et al., 1960). Em mamíferos é considerada um órgão endócrino, responsável pela síntese e secreção do hormônio melatonina, ao qual se atribuem os principais efeitos biológicos regulados pela glândula.

A Melatonina (5-metoxi-N-acetiltriptamina) é sintetizada e secretada pela glândula pineal em um ritmo circadiano. A produção de melatonina ocorre exclusivamente à noite e o tempo de duração de sua secreção é proporcional ao comprimento do período de escuridão (Armstrong, 1989; Cipolla-Neto et al., 1992; Cagnacci, 1996). A ritmicidade circadiana da síntese de melatonina é dependente de uma via neural que se inicia por neurônios da retina, que enviam as informações da luminosidade ambiental através de projeções diretas da via retino-hipotalâmica (VRH) para o núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ) (Speh et al., 1993). Os NSQ projetam-se para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPV) que apresentam projeções diretas ou indiretas para a região torácica da medula espinhal, na coluna intermédio-lateral (CIL), sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos, que por sua vez, enviam seus axônios aos gânglios cervicais superiores (GCS), os quais, pelos ramos carotídeos internos e nervos coronários (NC), projetam-se até a pineal (Vollrath, 1981; Cipolla-Neto; Afeche, 1999). Assim, durante o período noturno, o circuito neural acima descrito é acionado, promovendo a liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos que inervam a glândula pineal (Figura 1).



Figura 1. Representação esquemática da circuitaria de controle da síntese e secreção de melatonina pela glândula pineal de ratos. Via retino-hipotalâmica (VRH), Núcleo supraquiasmático (NSQ), núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV), Coluna intermédio-lateral (CIL), Gânglios cervicais superiores (GCS) e Nervos Coronários (NC) (Richter et al., 2004).

A noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos que inervam a glândula pineal estimula simultaneamente os receptores $\beta_1 e \alpha_1$ adrenérgicos, desencadeando uma cascata intracelular de sinalização nos pinealócitos, culminando na ativação da enzima passo-limitante da síntese de melatonina, conhecida como arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) (Klein et al., 1970, 1992).

A síntese de melatonina inicia-se a partir do aminoácido essencial triptofano que sofre ação enzimática da triptofano-hidroxilase, sendo convertido em 5-hidroxitriptofano. Este, por sua vez, sob a ação da descarboxilase de l-aminoácidos aromáticos é convertido em serotonina. Por ação da AANAT, a molécula de serotonina é acetilada sendo convertida em N-acetilserotonina. Por fim, a N-acetilserotonina é oximetilada pela enzima hidroxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT), dando origem a 5-metoxi-N-acetiltriptamina (melatonina) (Sugden, 1989; Klein et al., 1992).

A melatonina apresenta meia-vida na circulação de aproximadamente dez minutos, sendo essencialmente lipofilica com características hidrofilicas, tornando-a altamente solúvel, sendo imediatamente difundida para o meio, atravessando as membranas celulares, tendo acesso a todos os líquidos orgânicos (Vanecek, 1998). A liberação de melatonina do pinealócito não parece necessitar de qualquer mecanismo especializado, assim, a concentração de melatonina na circulação sanguínea reflete as mudanças da concentração de melatonina na pineal (Wilkison et al., 1977; Illnerová et

al., 1978). Dessa maneira, a glândula pineal apresenta o papel de sinalizar para o meio interno (pela presença ou ausência diária de melatonina circulante) se é dia ou noite no meio exterior, e através da variação de seu perfil plasmático de acordo com o tamanho das noites, qual a estação do ano (Maronde; Stehle, 2007). Assim, a melatonina age como um transdutor neuroendócrino de informações sobre o fotoperíodo sazonal e ritmo circadiano. Em mamíferos, as funções fisiológicas da melatonina estão relacionadas à regulação do relógio circadiano no núcleo hipotalâmico supraquiasmático, a reprodução sazonal e a inibição da liberação de dopamina pela retina (Vanecek, 1998; Morgan et al., 1994).

Distintos trabalhos demonstram que a melatonina tem um papel no gasto energético, no ritmo circadiano da glicemia, na regulação da massa corporal e sobre a secreção e ação da insulina periférica (Margraf; Lynch, 1993; Lima et al., 1994, 1998; La Fleur et al., 1999, 2001; Picinato et al., 2002).

A administração noturna de melatonina a ratos maduros (10 meses de idade) suprime características relacionadas ao envelhecimento, como aumento da adiposidade, queda dos níveis de insulina e leptina, preservando outras características associadas a esta faixa etária como queda dos níveis de testosterona, T3 ou IGF1 plasmástico (Rasmussen et al., 1999). Esta mesma suplementação, por período prolongado de 12 semanas, melhora a atividade física, reduz o peso corporal e os níveis de insulina e leptina sanguíneos sem alterar a quantidade de alimento ingerido (Wolden-Hanson et al., 2000; Rasmussen et al., 2001).

A melatonina exerce seus efeitos biológicos, pelo menos em parte, através da ligação a receptores de membrana pertencentes à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR). Em mamíferos foram clonados 2 subtipos de receptores de membrana e denominados MT1 ou Mel 1a, e MT2 ou Mel 1b (Reppert et al., 1994, 1995, 1996; Barret et al., 1999). Ambos receptores de melatonina inibem a adenilil ciclase. O receptor MT1 está localizado no hipotálamo e na *pars tuberalis* hipofisária. O MT2 está localizado difusamente pelo SNC e na retina (Reppert et al., 1995; Willians et al., 1995).

No processo fisiológico de envelhecimento a biossíntese de melatonina pela glândula pineal diminui, bem como os níveis noturnos do hormônio são significativamente menores na meia-idade (Pang et al., 1990). Dessa maneira, a diminuição dos níveis circulantes de melatonina pode induzir a uma variedade de mudanças fisiológicas associadas com a idade (Grad et al., 1993; Rasmussen et al.,

1999). Em espécies aos quais as mudanças no fotoperíodo induzem adaptações fisiológicas severas, como na hibernação e migração, a melatonina tem a capacidade de regular o balanço energético e a distribuição de gordura (Nelson et al., 1997). Embora a reprodução e atividade física em ratos e humanos não exibir uma sazonalidade específica, a quantidade de tecido adiposo tende a aumentar com o avanço da idade (Shimokata et al., 1989; Barzilai et al., 1998), de maneira oposta às concentrações plasmáticas de melatonina que diminuem. Este fato por si sugere que a diminuição na concentração plasmática de melatonina pode apresentar uma relação direta com o acumulo de gordura visceral associado ao envelhecimento.

Com o avanço da idade há um aumento da adiposidade, especialmente visceral, e dos níveis plasmáticos de insulina e leptina (Bjorntorp, 1995) e estas mudanças são freqüentemente associadas com alterações metabólicas como a intolerância à glicose, resistência insulínica, diabetes, dislipidemias e hipertensão (Bjorntorp, 1995; Bodkin et al., 1996; Buemann et al., 1996).

O tecido adiposo expressa e secreta diversos hormônios, fatores de crescimento e citocinas, como a leptina, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6, angiotensinogênio, adipisina, entre outros (Ahima et al., 2000; Fruhbeck et al., 2001). Além disso, é um importante tecido-alvo de diversos hormônios incluindo a melatonina que age diretamente nos adipócitos através dos receptores MT₁ e MT₂ (Brydon et al., 2001; Alonso-Vale et al., 2005). A melatonina é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina em adipócitos isolados em cultura primária (Lima et al., 1994). Há evidências demonstrando que a melatonina é capaz de reduzir a massa de gordura em ratos velhos com obesidade induzida por dieta hipercalórica (Wolden-Hanson et al., 2000; Prunet-Marcassus et al., 2003). Adipócitos isolados de ratos pinealectomizados, mostraram diminuição da responsividade à insulina, interpretada como uma perda da habilidade dos adipócitos em transportar maximamente a glicose sob estimulação da insulina, devido à redução total da expressão gênica do GLUT-4 nestas células (Seraphim et al., 1997; Lima et al., 1998).

Estudos com animais pinealectomizados, apresentam níveis baixíssimos de melatonina, cursando com prejuízos na adaptação do tecido adiposo no jejum gerando um balanço inadequado entre a demanda energética e a mobilização de substratos ao longo do dia (Alonso-Vale et al., 2004), mostrando efeito da glândula pineal tanto no desenvolvimento como na modulação da atividade biológica do tecido adiposo. Ademais, um estudo realizado por Borges-Silva et al. (2005) demonstrou redução da

lipólise e aumento da lipogênese no tecido adiposo de ratos pinealectomizados submetidos a um programa de exercício físico aeróbio.

A importância do estudo da ação da insulina é dada pela prevalência da resistência à insulina e/ou hiperinsulinemia na associação a diversas doenças, incluindo obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, doença cardiovascular e hipercortisolismo.

A ação da insulina, ao nível celular, inicia-se através da sua união ao seu receptor de membrana citoplasmática (Freytchet et al., 1971; Cuatrecasas, 1972; Kahn, 1985), constituído por 2 subunidades α e duas subunidades β (Kahn, 1985) com atividade cinase (Kasuga et al., 1982). A grande maioria das evidências do mecanismo de transmissão do sinal insulínico intracelular descreve um modelo no qual está envolvida uma cascata de fosforilações, onde a insulina induz a ativação da capacidade cinase do receptor, que se autofosforila e implementa esta capacidade em direção a substratos endógenos. Os substratos endógenos do receptor de insulina são rápida e diretamente fosforilados em tirosina pela ativação do receptor (Bernier et al., 1987). O primeiro substrato endógeno descrito foi denominado pp185 (White et al., 1985). Em 1991, Sun e colegas identificaram o maior componente da pp185, a proteína denominada substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). Além disso, foi demonstrada uma associação entre a enzima fosfatidilinositol 3'-cinase (PI 3-cinase) com IRS-1 após estímulo com insulina (Folli et al., 1992).

A PI 3-cinase desempenha um papel central nas ações metabólicas e mitogênicas da insulina. A associação/ativação da PI 3-cinase pela insulina pode transmitir múltiplos sinais intracelulares, que podem alterar a atividade de localização intracelular de diferentes moléculas sinalizadoras com domínios *plecstrin* (PH) (Lietze et al., 2000); interagir, através de sua atividade serina cinase, com outras proteínas sinalizadoras regulando a família das proteínas serina/treonina cinases AGC, família das GTPases Rho e a família de tirosinas cinases TEC; ativar a via mTOR/FRAP aumentando o ácido fosfatídico e diacilglicerol (DAG); além de ativar a uma das cinases AGC mais importantes que é a PDK-1, que ativa a serina/treonina cinase AKT/PKB, importante proteína na transmissão do sinal insulínico, através da fosforilação da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), de fatores de transcrição denominados *forkhead* e da proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (Cross et al., 1994; Nakae et al., 1999).

Além da PI 3-cinase, outras proteínas com porção SH2 associam-se ao IRS-1: Syp, Nck e GRB-2 (Cheatham; Kahn, 1995). A proteína Syp (SHP2) é uma fosfotirosina fosfatase que quando se liga ao IRS-1 ativa a fosfatase que parece exercer um importante papel no crescimento celular induzido pela insulina. A Nck é fosforilada em resposta a diversos fatores de crescimento, provavelmente conectando o IRS-1 a vias metabólicas envolvidas no crescimento celular. A GRB-2 é uma proteína citoplasmática que age como uma molécula adaptadora que liga o fator permutador de guanina para a p21 ras, chamado mSOS (son-of-sevenless), a fosfoproteínas como o receptor do EGF e o IRS-1. O complexo GRB/mSOS ativa a p21ras, estimulando a ligação de GTP. Por analogia, a interação do complexo GRB/mSOS ao IRS-1 pode mediar a estimulação da p21ras pela insulina. A proteína ras se liga a Raf-1, a qual fosforila e ativa a MAP cinase cinase (MAPKK), que finalmente ativará a MAP cinase (também conhecida como ERK) (Saltiel; Kahn, 2001).

Há pelo menos nove substratos do receptor de insulina descritos. Quatro destes substratos compreendem a família de proteínas que apresentam homologia entre si e são denominadas IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4 (White, 1998). Embora as proteínas IRSs apresentem uma grande homologia, estudos recentes utilizando animais *knockouts* e linhagens celulares indicam que estas diferentes proteínas devem desempenhar papéis intracelulares maiores antes no sentido da complementaridade na via de transmissão do sinal insulínico e ainda do IGF-1, do que da redundância.

Os camundongos sem IRS-1 apresentam um retardo de crescimento intra-uterino e pós-natal associado à resistência à insulina e intolerância à glicose (Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994). Por outro lado, o camundongo knockout para IRS-2 apresenta fenótipo com algumas características semelhantes e outras distintas ao camundongo knockout para IRS-1. Este segundo modelo animal além de apresentar resistência à insulina como o camundongo sem IRS-1, apresenta um defeito de crescimento somente em alguns órgãos, incluindo certas regiões do cérebro, ilhotas pancreáticas e retina (Kido et al., 2000; Whiters et al., 1998). E, diferentemente dos camundongos sem IRS-1, nestes camundongos sem IRS-2, a reduzida massa de células B pancreáticas leva ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (Whiters et al., 1998). Por outro lado, para os demais membros da família IRS, ou seja, IRS-3 e IRS-4, os artigos publicados sobre estudos com camundongos knockout descrevem que o metabolismo intermediário e crescimento destes animais são quase normais (Fantin et al., 2000). Assim, as distintas proteínas IRSs parecem, portanto, servir a diferentes funções ao nível celular, provavelmente devido a diferenças na distribuição tecidual, localização intracelular e atividade intrínseca das proteínas.

Além da fosforilação em resíduos tirosina, tanto o receptor de insulina quanto seus substratos, IRSs, são passíveis de serem fosforilados em resíduos serina, os quais podem atenuar a transmissão do sinal, por diminuir a fosforilação em tirosina induzida pela insulina e promover interação com as proteínas denominadas 14-3-3 (Hotamisligil et al., 1996; Craparo et al., 1997).



Figura 2. Etapas iniciais da ação insulínica. Representação da ação da insulina dividida em três níveis. Nível 1: Aclopamento da insulina ao receptor. Nível 2: Representa fenômenos bioquímicos relacionados à atividade tirosina-cinase do receptor de insulina. Nível 3: Efeitos biológicos finais (Saltiel; Kahn, 2001).

Receptores de insulina estão presentes em abundância em várias regiões cerebrais específicas, em particular em áreas envolvidas na regulação da atividade autonômica central, incluindo os núcleos hipotalâmicos, tais como núcleos arqueado e paraventricular, a amígdala, o hipocampo e áreas autonômicas como o núcleo do trato solitário (revisado por Unger; Betz, 1998). Estes achados, em conjunto com dados experimentais em animais, indicaram um papel endócrino da insulina no sistema nervoso central de adultos, através da inibição hipotalâmica do neuropeptídeo Y (Schwartz et al., 1992).

Há dois caminhos potenciais de passagem da insulina através da barreira hemato-encefálica. O primeiro refere-se a um mecanismo de transporte mediado por receptor saturável, configurando um processo de transcitose através das células endoteliais capilares para compartimento extracelular cerebral (King; Johnson, 1985; Pardrige, 1986). Ainda referente a este caminho, Manin e colaboradores, 1990, descrevem a possibilidade de que a insulina no parênquima cerebral pode advir de modificações do clearance deste hormônio no líquor através do plexo coróide. O segundo caminho potencial é dado pela captação da insulina mediada por receptores presentes em axônios terminais nos órgãos circunventriculares e transporte axonal para neurônios alvos, como o núcleo arqueado hipotalâmico (revisado por Unger; Betz, 1998).

Um importante passo adiante na compreensão do papel da insulina no sistema nervoso central foi dado pela identificação dos substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) e da PI 3-cinase em vários neurônios hipotalâmicos e células da adenohipófise, que continham receptores de insulina (Folli et al., 1994; Baskin et al., 1993; Burks et al., 2000). Estes dados indicam que neurônios específicos e células neurosecretórias possuem a maquinaria necessária para a transmissão do sinal insulínico.

Assim, há vários estudos sugerindo um papel da sinalização insulínica no sistema nervoso central (SNC), na regulação da ingestão alimentar, no crescimento e diferenciação neuronal, na liberação de neurotransmissores e na plasticidade neuronal (Baskin et al., 1999; Schwartz et al., 1992; Heidenreich, 1993; Robinson et al., 1994; Jonas et al., 1997; Plitzko et al., 2001). A alteração da sinalização insulínica no SNC tem sido ligada à patogênese de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (Takahashi et al., 1996; Frolich et al., 1999).

Bruning et al., 2000, utilizando o NIRKO, *neuron-specific IR knockout mice*, demonstraram que apesar da inativação do receptor de insulina não ter qualquer impacto no desenvolvimento cerebral ou sobrevivência neuronal, apresenta dismorfísmo sexual quanto ao comportamento alimentar e obesidade sensível à dieta. Enquanto as fêmeas NIRKO apresentam hiperfagia, ambos, fêmeas e machos, desenvolvem obesidade sensível à dieta, com aumento na adiposidade corporal e níveis plasmáticos de leptina, insulina e triglicérides.

Outros estudos com animais *knockouts* para um dos substratos do IR forneceram mais evidências ligando a insulina à regulação neuroendócrina. Camundongos *knockouts* para o IRS-2 em todos os tecidos, IRS-2 ^{-/-}, tem fenótipo de diabetes mellitus com falência das células B das ilhotas pancreáticas (Whiters et al., 1998; Kido et al., 2000; Brunning et al., 2000).

23

Em animais como <u>Drosophila</u> e <u>Caenorhabditis elegans</u>, as vias intracelulares homólogas dos receptores de insulina e IGF-1 regulam o desenvolvimento, reprodução e longevidade, em resposta a sinais ambientais como a disponibilidade de alimento (Tissenbaum; Ruvkun, 1998).

Niswender et al., 2003, demonstraram que a inibição da PI3-cinase, por injeção intracerebroventricularmente de Wortmannin e LY294002, é capaz de inibir o efeito anorético da uma única dose de insulina em ratos. Além disto, este mesmo artigo demonstrou que PI 3,4,5-trifosfato, o principal produto da ativação da PI 3-cinase, aparece preferencialmente nas mesmas células que expressam o IRS-2.

A insulina é considerada um sinalizador lipostático do SNC e evidências apontam que o processo de envelhecimento apresenta associação direta com adiposidade e resistência à insulina (García-San et al., 2007). Em ratos de 8 e 24 meses de idade a infusão de insulina intracerebroventricularmente durante uma semana foi capaz de alterar a cascata de transdução do sinal insulínico, reduzindo a fosforilação da GSK3, AKT e da p70^{s6k}, com concomitante aumento da fosforilação em serina do IR e IRS-2, principalmente nos ratos de 24 meses, porém quando submetidos à restrição alimentar crônica com perda significativa de peso, houve aumento tanto na responsividade quanto na sinalização intracelular da insulina (García-San et al., 2007). O fato de a restrição alimentar melhorar a resposta central à insulina indica que a adiposidade como um fator central na resistência à insulina (García-San et al., 2007; Serrano et al., 2009).

Serrano et al., 2009, realizaram um estudo comparativo dos mecanismos celulares do sinal insulínico após infusão aguda com o hormônio no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético em animais de 24 meses de idade, constatando que no tecido adiposo houve diminuição marcante na fosforilação em tirosina do receptor de insulina e do substrato 1 do receptor (IRS-1), além de prejuízos na ativação da AKT/PKB e translocação do GLUT-4. Por outro lado, no músculo esquelético houve apenas redução da translocação do GLUT-4 sem alteração na cascata de sinalização, enquanto que no figado nenhuma alteração foi detectada. Estes achados sugerem que resistência insulínica do tecido adiposo precede o desenvolvimento da resistência no músculo esquelético e figado, com o avanço da idade.

Relações entre a glândula pineal, melatonina, pâncreas endócrino, e regulação do metabolismo energético têm sido sugeridas tanto em humanos como em ratos (Lima et al., 1998; La Fleur et al., 1999; Peschke et al., 2007). A melatonina possui efeitos

modulatórios positivos sobre a secreção (Iizuka, 1996) e ação da insulina (Lima et al., 1994; Peschke et al., 2007). Além disso, um estudo recente apontou que a insulina tem a capacidade de potencializar a síntese de melatonina mediada pela noradrenalina em cultura de glândula pineal de ratos, possivelmente através de mecanismos póstranscricionais (Garcia et al., 2008).

Nosso laboratório demonstrou que a melatonina, tanto infundida endovenosamente quanto através de cânulas de localização intracerebroventricular, é capaz de induzir a autofosforilação do receptor de insulina em hipotálamo de ratos jovens de maneira tempo e dose dependentes e que a ativação dessa via intracelular possa representar parte do mecanismo celular pelo qual a melatonina module a homeostase energética (Anhê et al., 2004).

Devido às ações diretas de ambos os hormônios sobre o metabolismo energético e que no processo de envelhecimento os animais cursam com redução do nível sérico de melatonina, resistência à insulínica e conseqüente aumento da adiposidade, consideramos a hipótese de que a reposição crônica de melatonina a ratos com 12 meses de idade, obesos e em processo de envelhecimento, possa reverter à resistência à insulina que apresentam, independentemente da perda de peso e adiposidade.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da reposição com melatonina a ratos com 12 meses de idade, em processo de envelhecimento e obesos, sobre a sensibilidade a insulina e as etapas iniciais da ação intracelular da insulina no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo desses ratos.

Para isto foram avaliados:

(1) Evolução do peso corporal, ingestão alimentar e hídrica durante o período de suplementação com melatonina (8 e 12 semanas consecutivas);

(2) A constante de decaimento de glicose (K_{ITT}) ao final de 8 e 12 semanas de tratamento com melatonina para inferir efeito sobre a resistência insulínica nos animais; (3) Os níveis protéicos do receptor de insulina e de seus substratos 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) no tecido nervoso (hipotálamo), hepático, músculo esquelético e adiposo de ratos velhos suplementados com melatonina por 8 e 12 semanas consecutivas;

(4) As etapas a jusante a ativação do IR como a associação do fosfatidilinositol 3'quinase (PI 3-cinase) com os IRS-1 e IRS-2; a Proteína Kinase-B (PKB/AKT), proteína fosfatase SHP2, a proteína p70 ribossomal S6 kinase (pp70^{s6k}) e a proteína c-Jun Nterminal kinases (JNK), no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de CA). poliacrilamida (SDS-PAGE) são da Bio-Rad (Richmond, Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditiotreitol (DTT), são fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Insulina regular fabricada pela Biobrás (Minas Gerais, Brasil). A proteína A-Sepharose 6MB foi fornecida pela Pharmacia (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (0,45µm) foi fornecida pela Bio-Rad (Richmond, Ca). O kit de revelação por quimiluminescência para detecção de proteínas foram fornecidos pela Amersham (UK). Os ratos Wistar foram cedidos pelo Biotério do ICB1-USP. A melatonina foi fornecida pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). Os anticorpos específicos foram fornecidos pela Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca), anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-p42/44MAPK (também conhecido como ERK 1 and 2), anti-SHP2, anti-pp70^{s6k}, antifosfoserina e antifosfotirosina. O anticorpo anti PI 3-quinase foi fornecido pela Upstate Biotechnology Incorp. (USA). Anticorpos antifosfo-Akt (Ser⁴⁷³), antifosfo-Akt (Thr³⁰⁸) e antifosfo-JNK foram fornecidos pela Cell Signaling (Beverly, MA).

3.1.2 Soluções Utilizadas

- Solução tampão de extração (para imunoprecipitado e extrato total): utilizada para extração de proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirosfosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 1% e 0,01mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4 °C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescido no momento do uso.

- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e triton X-100 0,5%.

Tampão de Laemmli (5X): usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), contém: trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%.
Para uso, a solução foi diluída 1:4.

- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose; contém: trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4 °C.

Solução tampão para SDS-PAGE – Gel de resolução (*resolving*): tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

- Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de empilhamento (*stacking*) das proteínas: contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

- Solução Basal: solução utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, *tween* 20 0,02%.

Solução Bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificaram as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,03% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo antifosfotirosina (1:400), anticorpo antisubunidade β do receptor de insulina (anti-IR) (1:400), anti-IRS-1(1:400), anti-IRS-2 (1:400), anti-subunidade regulatória de 85 kDa da PI 3-cinase (anti-PI 3-cinase) (1:2000), anti-pERK 1 e 2 (1:1000), anti-SHP2 (1:1000), anti-pAKT Ser e Thr (1:1000), anti-pJNK (1:1000) e anti-pp70^{s6k} (1:1000).

3.2 ANIMAIS

Os ratos da linhagem Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-1) da Universidade de São Paulo (USP), com 8 semanas de idade. Os animais foram acondicionados no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia do ICB-1/USP, em condições controladas de luz (ciclo de 12/12 horas de claro-6:00 / escuro-18:00) e temperatura (25 ± 2 °C). Os ratos tiveram livre acesso à ração comercial (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A) e a água. Os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo nº 84/98) foram observados.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Suplementação de Melatonina

Ao completarem 12 meses de idade os ratos foram pesados e acondicionados 1 rato por caixa e divididos em dois grupos (controle e melatonina). Seguindo o protocolo descrito por Wolden-Hanson et al., 2000, com pequenas modificações, o grupo melatonina recebeu na água de beber (torneira) 0,4 microg/ml de melatonina dissolvida em etanol 0,01%. Esta solução foi colocada 30 minutos antes do início do ciclo escuro dos ratos e retirada 30 minutos a 1 hora após o início do ciclo claro por 12 semanas. As garrafas foram cobertas por uma folha de papel alumínio. Os controles velhos receberam água de torneira com 0,01% de etanol. Após o período de 08 ou 12 semanas de tratamento, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com pentobarbital sódico e após confirmação do efeito anestésico, tiveram a cavidade abdominal aberta e recebam injeção em bolo pela veia porta de 60 microg de insulina. Foi retirado um fragmento de figado 30 segundos após a injeção, um fragmento de tecido adiposo visceral após 60 segundos de injeção, um fragmento do músculo esquelético após 90 segundos da injeção e finalmente após 10 minutos da injeção o rato foi decapitado e teve retirado seu hipotálamo observando os limites anatômicos rostralmente aos corpos mamilares e caudalmente o quiasma óptico, lateralmente pelos tratos ópticos e superiormente pelo terceiro ventrículo. Os tecidos foram imediatamente homogeneizados e utilizados para imunoprecipitações com anticorpos específicos descritos a seguir. Estes tempos de coleta dos tecidos correspondem aos picos de fosforilação do receptor de insulina e seus substratos IRS-1 e IRS-2, já definidos em estudos anteriores (Carvalho et al., 1996, 1997; Carvalheira et al., 2001; Niswender et al., 2003) e confirmados no nosso laboratório.

3.3.2 Experimentos para determinação da quantidade e fosforilação induzida pela insulina dos IR, IRS-1 e IRS-2, AKT, ERKs 1 e 2, pJNK, pSHP2 e pp70^{s6k} em hipotálamo, fígado, musculatura esquelética e tecido adiposo

No dia do experimento os animais foram anestesiados com tiopental sódico (25mg/kg intraperitonial). A cavidade abdominal foi aberta e a veia porta exposta, recebendo injeção em bolo de 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,9%) com ou sem insulina regular (60 µg).

Após 30 segundos para o figado, 90 segundos para o músculo esquelético e 10 minutos para o hipotálamo os ratos tiveram coletados amostras destes tecidos e os mesmos foram homogeneizados em tampão gelado (Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01mg/ml), com um polytron PTA 20S (*Brinkmann Instruments* modelo *PT* 10/35). Estas amostras tiveram dois caminhos, um foi à realização prévia de imunoprecipitação com anticorpos específicos e posterior eletroforese; outro foi o tratamento como extrato total tecidual seguido diretamente da eletroforese.

Os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (*Bio-Rad*) e tiveram dois caminhos: 1- foram tratados com tampão de Laemmli, contendo 100 mM de DTT e 100 µg de proteína total foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (denominado extrato total); ou 2- foram utilizados para imunoprecipitação com anticorpos específicos e proteína A Sepharose 6MB. Os imuno-complexos foram lavados com a solução específica, após incubação noturna em geladeira e sob agitação contínua, por 3 vezes, intercaladas com centrifugação de 12.000 rpm a 4 °C. Os sobrenadantes foram totalmente desprezados, e aos precipitados foi acrescido 25 µl do mesmo tampão de Laemmli, porém, diluídos em água destilada

1:1. Em seguida foram aquecidos em água fervente por 4 minutos e subsequentemente submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6 a 10%) no aparelho para minigel (*Mini-Protean*).

3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Cem microgramas de extrato tecidual total, por amostra, foram aplicados no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6 a 10%), de 1,5 mM de espessura, no aparelho para minigel (*Mini-Protean*). Os imunoprecipitados já com Laemmli foram também submetidos SDS-PAGE (6 a 8%). Em cada gel havia um marcador de peso molecular padrão com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa), β-galactosidade (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa). O SDS-PAGE foi submetido a 30 volts por 2 horas e depois a 120 volts por mais 2 a 3 horas. A seguir, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

3.3.4 Análise protéica por *i mMunoblotting*

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio-Rad* por 2 horas a 120 volts, como descrito por Towbin et al., 1979. No tampão usado para a transferência foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com a solução bloqueadora a 4 °C *overnight* ou por 2 horas na temperatura ambiente. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos antifosfotirosina, anti-receptor de insulina (IR) ou anti-IRS-1 ou anti-IRS-2 ou anti-PI3-cinase ou anti-pAKT ou anti-ERKs 1 e 2 ou anti-pJNK ou anti-pp70^{s6k} ou anti-SHP2 diluídos em solução para anticorpos, mantidos assim a 4 °C durante a noite ou 4 horas à temperatura ambiente e lavados com solução basal, por 30 minutos.

Para visualização das bandas foi utilizado o método de quimioluminescência, que consiste nos seguintes passos: após a incubação com o anticorpo as membranas de nitrocelulose foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (1:10.000). Após terem sido lavadas com solução basal, as membranas foram incubadas com a somatória de 1ml de cada um dos dois reagentes do kit por 1 minuto, e expostas a filmes de raio-X comuns. Esta exposição durou entre meio a cinco minutos. O filme foi revelado de forma convencional manual. Após a revelação das auto-radiografias e visualização das bandas, estas foram escaneadas e analisadas utilizando o programa de análise de densitometria óptica *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via Internet.

3.3.5 Consumo alimentar e hídrico

Com o objetivo de observar os consumos alimentar e hídrico os ratos controles e melatonina foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais. Foi estabelecido quantidades padrões de ração (100 gramas) e água (100 ml) que foram aferidas duas vezes ao dia. No início do período claro, entre 6:00 - 7:00 h foram pesadas a quantidade de ração restante e aferido o volume restante de água nas garrafas individuais. Estes valores foram subtraídos dos valores padrões, resultando na quantidade ingerida de ração e água. O mesmo procedimento foi realizado no início do período escuro, por volta das 17:00 - 18:00 h.

3.3.6 Constante de Decaimento de Glicose (K_{ITT})

Os animais foram submetidos a jejum de 2 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg), e receberam uma injeção de insulina diretamente na veia peniana (0,75 U/kg peso corporal). A glicose plasmática foi medida a partir de amostras de sangue obtidas da veia caudal utilizando-se um glicosímetro (Accucheck, Roche) nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção em bolo de insulina. Os valores de glicemia dos minutos 4 a 16 foram utilizados para calcular a constante de queda da glicose plasmática (K_{ITT}) de acordo com a descrição de Bonora et al., 1989. Este teste foi realizado após 08 e 12 semanas de tratamento crônico com melatonina.

3.3.7 Análise estatística

Quando comparados os diferentes tratamentos em cada ponto temporal, utilizamos a análise de variância (ANOVA) utilizando Bonferroni como pós-teste, sempre que alguma diferença foi detectada. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (M \pm EPM).

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

Ambos os grupos controle e melatonina apresentaram evolução ponderal semelhante da primeira até a 8^a semana de tratamento. A partir da 9^a semana foi observado incremento no ganho de peso dos ratos sem suplementação em relação aos que continuavam a receber o hormônio (Figura 3A). A análise da área sob a curva da evolução ponderal durante o período de 2 meses de suplementação com melatonina não mostrou diferenças significativas [08 sem. Cont = 3127 ± 345 (g*08semanas), n=9 vs Mela = 2980 ± 388 (g*08semanas), n=9], porém no protocolo de 3 meses a área sob a curva mostrou-se significativamente menor para o grupo suplementado [12 sem. Cont = 4911 ± 129 (g*12semanas), n=9 vs Mela = 4498 ± 165 (g*12semanas), n=9; p<0,05] (Figura 3B e C, respectivamente).



Figuras 3A-C. Efeito da suplementação com melatonina na evolução de peso corporal e área sob a curva da evolução ponderal durante 08 e 12 semanas de suplementação com melatonina. O peso corporal foi aferido uma vez por semana desde o início até o fim do tratamento. Valores expressos em grama representam a Média ± EPM. * *p*<0,05.

4.2 INGESTÃO ALIMENTAR

A ingestão de ração foi aferida a cada três dias durante o período de 3 meses de suplementação com melatonina. A Figura 4A demonstra que o grupo controle apresentou consumo maior de ração que o grupo melatonina nos dias iniciais da oferta de melatonina e a partir do final do segundo mês da suplementação com o hormônio. A análise da área sob a curva da ingestão alimentar mostra que durante os primeiros 2 meses o consumo de ração foi semelhante entre o grupo controle e o suplementado [08 sem. Cont = 1221 ± 38 (g*60 dias), n=9 vs Mela = 1148 ± 57 (g*60 dias), n=9]. No entanto, a análise da área total referente aos 3 meses de tratamento mostrou que os ratos suplementados ingeriram menos ração do que os controles [12 sem. Cont = 1942 ± 21 (g*90 dias), n=9 vs Mela = 1629 ± 68 (g*90 dias), n=9; p<0,05] (Figura 4B e C, respectivamente).



Figuras 4A-C. Efeito da suplementação com melatonina sobre a ingestão de ração e área sob a curva da ingestão alimentar em 08 e 12 semanas de suplementação com melatonina. A ingestão alimentar foi aferida de três em três dias desde o primeiro até o último dia do protocolo experimental. Valores diários em grama representam a Média ± EPM. * p<0,05.

O consumo hídrico foi aferido durante todos os dias do protocolo experimental, duas vezes ao dia: pela manhã, entre 07h-08h para aferir a ingestão de água no período noturno e novamente ao final da tarde entre 17h 30min-18h 30min para conferir a ingestão de água durante o dia. A Figura 5A mostra o consumo hídrico durante o dia, ou seja, o aferido no final da tarde de ambos os grupos. A análise da área sob a curva do consumo hídrico durante o dia entre os grupos controle e melatonina foi semelhante entre os tratamentos de 08 e 12 semanas, respectivamente [08 sem. Cont = 635 ± 68 (ml*60dias), n=9 vs Mela = 594 ± 52 (ml*60dias), n=9] e [12 sem. Cont = 889 ± 83 (ml*90dias), n=9 vs Mela = 800 ± 61 (ml*90dias), n=9] (Figuras 5B e C, respectivamente). Não obstante, a Figura 5D mostra o consumo hídrico durante o período da noite, ou seja, o aferido no intervalo das 07h00-08h00 de ambos os grupos. A análise da área sob a curva do consumo hídrico durante a noite entre os grupos controle e melatonina não apresentaram diferenças significativas em ambos os protocolos, respectivamente [08 sem. Cont = 1803 ± 212 ml/60dias, n=9 vs Mela = 1644 ± 174 ml/60dias, n=9] e [12 sem. Cont = 2848 ± 220 ml/90dias, n=9 vs Mela = 2344 ± 155 ml/90dias, n=9] (Figuras 5E e F, respectivamente).



Figura 5A-C. Efeito da suplementação com melatonina sobre o consumo hídrico e área sob a curva do consumo hídrico em 08 e 12 semanas de suplementação com melatonina durante o período diurno. O consumo hídrico foi aferido diariamente desde o primeiro até o último dia do protocolo experimental.



Figura 5D-F. Efeito da suplementação com melatonina sobre o consumo hídrico e área sob a curva do consumo hídrico em 08 e 12 semanas de suplementação com melatonina durante o o período noturno. O consumo hídrico foi aferido diariamente desde o primeiro até o último dia do protocolo experimental.

A Figura 5G mostra o gráfico da análise da área sob a curva do período diurno comparado com o período noturno. Ambos os grupos, controle (Cont Diurno = 889 ± 83 ml/90dias, n=9 vs Cont Noturno = 2848 ± 220 ml/90dias, n=9; p<0,05) e melatonina (Mela Diurno = 800 ± 61 ml/90dias, n=9 vs Cont Noturno = 2344 ± 155 ml/90dias, n=9; p<0,05) apresentaram consumo hídrico significativamente maior durante o período noturno.



Figura 5G. Efeito da suplementação com melatonina sobre o consumo hídrico nos diferentes períodos do dia. O consumo hídrico foi aferido diariamente desde o primeiro até o último dia do protocolo experimental. Valores diários em mililitros representam a Média ± EPM. * p<0,05.</p>
4.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS RATOS

A Tabela 1 apresenta o resumo das características gerais dos animais controles e submetidos ao tratamento com suplementação de melatonina. Ao término do tratamento de 12 semanas com melatonina houve redução significativa no peso final dos animais em torno de 2% de seu peso inicial quando comparados com ratos controles, porém, esta alteração não foi detectada no protocolo de 8 semanas. De maneira semelhante também detectamos alteração do peso do tecido adiposo visceral com significativa redução no consumo de ração no tratamento com 12 semanas, respectivamente (12 sem. Cont = $3,94 \pm 0,65$ g n=9 vs Mela = $2,58 \pm 0,18$ g, n=9 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $23 \pm 1,2$ g/dia, n=18 vs Mela = $19\pm 0,3$ g/dia, n=18 ; p<0,05), porém não houve alterações no protocolo de 08 semanas. Não obstante, o teste de tolerância à insulina (K_{ITT}) em ambos protocolos foram capazes de aumentar significativamente a sensibilidade insulínica (08 sem. Cont = $2,84 \pm 0,6$ %/min n=6 vs Mela = $5,96 \pm 0,2$ %/min, n=6 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $3,39 \pm 0,4$ %/min, n=6 vs Mela = $7,11\pm 0,17$ %/min, n=6 ; p<0,05).

	08 semanas		12 semanas	
	Controle (n)	Tratados (n)	Controle (n)	Tratados (n)
Peso Inicial (g)	387 ± 15 (14)	383 ± 18 (14)	394 ± 11 (21)	391 ± 16 (21)
Peso Final (g)	$405 \pm 10 \; (14)$	388 ± 11 (14)	424 ± 17 (21)	383 ± 9 (21) *
Ganho de peso no período (%)	+4	+1	+7	-2 *
Tecido Adiposo Visceral (g)	3,13 ± 0,78 (7)	2,76 ± 0,65 (7)	3,94 ± 0,17 (9)	2,58 ± 0,18 (9) *
Consumo de Ração (g/dia)	20 ± 0.8 (7)	19±0,8 (7)	23 ± 1,2 (18)	19±0,3 (18) *
Consumo Hídrico Diurno (ml/dia)	11 ± 1,4 (7)	10,1 ± 0,6 (7)	10±0,5 (18)	9,1 ± 0,7 (18)
Consumo Hídrico Noturno (ml/dia)	28 ± 1 (7)	30 ± 1,5 (7)	31 ± 1 (18)	27 ± 2 (18)
K _{ITT} - Constante de decaimento	2,84 ± 0,6 (6)	5,96 ± 0,2 (6) *	3,39 ± 0,40 (6)	7,11 ± 0,17 (6) *
de glicose (%/min)				

Tabela 1 - Características gerais dos ratos controles e suplementados com melatonina.

Os resultados são expressos em Média \pm EPM e a significância expressa como * p < 0.05. O número de animais é mostrado entre parênteses.

4.5 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO HIPOTÁLAMO

4.5.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina (IR) e Substratos IRS 1 e 2

Os *immunoblottings* com os anticorpos anti-IR, IRS-1 e IRS-2 demonstraram que o nível protéico do receptor de insulina (08 sem. Cont = $100 \pm 17\%$, n=4 vs Mela = $101 \pm 3\%$, n=5) e (12 sem. Cont = $100 \pm 19\%$; Mela = $119 \pm 4\%$, n=5), IRS-1 (08 sem. Cont = $100 \pm 23\%$, n=4 vs Mela = $129 \pm 20\%$, n=5) e (12 sem.Cont = $100 \pm 14\%$; Mela = $93 \pm 23\%$) e IRS-2 (08 sem. Cont = $100 \pm 16\%$, n=4 vs Mela = $137 \pm 22\%$, n=5) e (12 sem. Cont = $100 \pm 10\%$; Mela = $98 \pm 13\%$) no hipotálamo dos ratos suplementados com melatonina foi semelhante ao dos ratos controles no tratamento de 08 e 12 semanas (Figuras 6A, B e C, respectivamente).



Figuras 6A-C. Avaliação dos níveis protéicos induzido pela insulina da subunidade beta do receptor de insulina e dos substratos 1 e 2 em hipotálamo de ratos tratados cronicamente com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e denominadas de extrato total como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida foi realizado *imunoblotting* (IB) típico com anticorpo anti-IR (A), anti-IRS-1 (B) e anti-IRS-2 (C). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 5 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média ± EPM.

4.5.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina (IR), dos Substratos do Receptor de Insulina (IRS 1 e 2) e Associação com a Proteína PI 3-cinase

Embora não encontramos aumento significativo na fosforilação do receptor de insulina (Figura 6D), nossos achados mostram que houve um aumento significativo da fosforilação do IRS 1 e 2 sem estímulo agudo com insulina no protocolo de 08 semanas (08 sem. Cont = $60 \pm 5\%$, n=4 vs Mela = $174 \pm 5\%$, n=4 ; p < 0,05) e (08 sem. Cont = $62 \pm 2\%$, n=4 vs Mela = $130 \pm 5\%$, n=4 ; p < 0,05) e de maneira similar, em ambos os protocolos, após estímulo agudo com insulina houve aumento significativo da fosforilação do IRS 1 e 2 nos animais tratados com melatonina quando comparados com os animais controles, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 27\%$, n=4 vs Mela = $285 \pm 16\%$, n=4 ; p < 0,05); (08 sem. Cont = $100 \pm 4\%$, n=4 vs Mela = $169 \pm 3\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 15\%$, n=4 vs Mela = $233 \pm 41\%$, n=4 ; p < 0,05); (08 sem. Cont = $100 \pm 12\%$, n=4 vs Mela = $210 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 13\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 28\%$, n=4 vs Mela = $207 \pm 25\%$, n=4 ; p < 0,05) (Figuras 7E e G, respectivamente). Além disso, não identificamos aumento na associação entre IRS 1 e 2 com a PI3-K após estímulo agudo com insulina em ambos protocolos (Figuras 6F e H, respectivamente).



Figuras 6D-H. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina do IR, IRS 1 e 2 e análise da associação dos substratos 1 e 2 com a PI 3-cinase em hipotálamo de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas em tampão para imunoprecipitação com anticorpo anti-IR (D); anti-IRS-1 (E) e anti-IRS-2 (G) e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo antifosfotirosina (D, E e G) e com anticorpo anti-PI 3-cinase (F e H). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 5 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média \pm EPM. (§ = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Controle (+); & = P < 0,05 - Comparando-se Tratado (-) versus Tratado (+); # = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+) versus Tratado (+)).

4.5.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina das Proteínas AKT/PKB Serina e Treonina, pERK 1 e 2 e pJNK

O tratamento crônico com melatonina não induziu alterações no grau de fosforilação das proteínas pERK 1 e 2 em ambos tratamentos (Figura 6I), porém, o protocolo de tratamento de 08 e 12 semanas foi capaz de aumentar significativamente o grau de fosforilação/ativação da proteína AKT/PKB Serina tanto no estado basal como após estímulo agudo com insulina, respectivamente (08 sem. Cont = $74 \pm 13\%$, n=4 vs Mela = $130 \pm 23\%$, n=4 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $69 \pm 14\%$, n=4 vs Mela = $110 \pm 12\%$, n=4 ; p<0,05); (08 sem. Cont = $100 \pm 11\%$, n=4 vs Mela = $179 \pm 21\%$, n=4 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 11\%$, n=5 vs Mela = $134 \pm 8\%$, n=5 ; p<0,05) (Figura 6J). Além disso, o protocolo de tratamento de 12 semanas ainda foi capaz de induzir aumento significativo na fosforilação da proteína AKT/PKB no resíduo treonina (12 sem. Cont = $100 \pm 6\%$, n=4 vs Mela = $130 \pm 10\%$, n=4 ; p<0,05) (Figura 5K). O *immunoblotting* com o anticorpo anti-pJNK demonstrou aumento significativo em sua fosforilação basal no protocolo de 12 semanas (12 sem. Cont = $100 \pm 10\%$, n=4 vs Mela = $140 \pm 13\%$, n=5; p<0,05) 4 (Figura 6L).



Figuras 6I-L. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina das proteínas pERKs 1 e 2 e da AKT/PKB Ser e Thr e do grau de fosforilação da pJNK sem estímulo agudo com insulina (estado basal) em hipotálamo de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo anti-pERK 1e 2 (I), anti-pAKT Ser (J), anti-pAKT Thr (K) e com anticorpo anti-pJNK (L). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 5 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média \pm EPM. (& = P < 0,05 - Comparando-se Tratado (-) versus Tratado (+); # = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Tratado (-); * = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+) versus Tratado (+)).

4.6 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO FÍGADO

4.6.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina (IR) e Substratos IRS 1 e 2

Os *immunoblottings* com os anticorpos anti-IR, IRS-1 e IRS-2 demonstraram que o nível protéico do receptor de insulina, do IRS 1 e 2 no fígado dos ratos suplementados com melatonina foi semelhante ao dos ratos controles no tratamento de 08 e 12 semanas (Figuras 7A, B e C).



Figuras 7A-C. Avaliação dos níveis protéicos induzido pela insulina da subunidade beta do receptor de insulina e de seus substratos 1 e 2 em fígado de ratos tratados cronicamente com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e denominadas de extrato total como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida foi realizado *imunoblotting* (IB) típico com anticorpo anti-IR (A), anti-IRS-1 (B) e anti-IRS-2 (C). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 5 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média ± EPM.

4.6.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina (IR), dos Substratos do Receptor de Insulina (IRS 1 e 2), da Associação com a Proteína PI 3-cinase e SHP2

A análise do grau de fosforilação em resíduos tirosil do receptor de insulina e do substrato do receptor de insulina 1 e 2 foi avaliada através do *immunoblotting* com o anticorpo antifosfotirosina nas amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, anti IRS-1 e 2. No tratamento de 08 semanas houve aumento significativo da fosforilação do IR após estímulo agudo com insulina (08 sem. Cont = $100 \pm 6\%$, n=4 vs Mela = $167 \pm 19\%$, n=5; p < 0.05), porém, no tratamento de 12 semanas este resultado foi diferente, onde detectamos aumento significativo somente na fosforilação basal do receptor de insulina (12 sem. Cont = 20 \pm 2%, n=5 vs Mela = 33 \pm 5%, n=5 ; p<0,05) (Figura 7D). De maneira semelhante ao nível protéico, o estímulo agudo com insulina endovenoso manteve a fosforilação do IRS-1 semelhante em ambos os grupos nos dois protocolos (Figura 7E). Ao analisarmos o grau de fosforilação do IRS-2 encontramos diferença significativa entre ambos os grupos nos protocolos de 08 e 12 semanas, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 6\%$, n=4 vs Mela = 143 \pm 7%, n=4 ; p<0.05) e (12 sem. Cont = 100 \pm 15%, n=4 vs Mela = 147 \pm 4%, n=4 ; p<0.05) (Figura 7F). Com o objetivo de avaliarmos o grau de fosforilação das proteínas cascata abaixo, não foi detectada alterações na associação entre o IRS-1 e a PI3-K após estímulo agudo com insulina no tratamento de 08 semanas, porém verificamos aumento significativo da associação com o IRS-1 a PI3-K após estímulo agudo com insulina no protocolo de 12 semanas (12 sem. Cont = $100 \pm 9\%$, n=7 vs Mela = $132 \pm 2\%$, n=7; p<0,05) (Figuras 7G). Não obstante, houve aumento no incremento da associação do IRS-2 com a PI3-K após estímulo agudo com insulina em ambos protocolos de tratamento, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 3\%$, n=7 vs Mela = $198 \pm 16\%$, n=7 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 8\%$, n=5 vs Mela = $153 \pm 2\%$, n=5 ; p < 0.05) (Figura 7H). Além disso, houve aumento significativo da associação do IRS-1 com a proteína SHP2 em ambos os protocolos de tratamento, tanto no estado basal, respectivamente (08 sem. Cont = $68 \pm 25\%$, n=3 vs Mela = $178 \pm 21\%$, n=3; p<0,05) e (12 sem. Cont = $67 \pm 3\%$, n=3 vs Mela = $102 \pm 12\%$, n=3; p<0,05), como após estímulo agudo com insulina, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 5\%$, n=3 vs Mela = $272 \pm 19\%$, n=3; p < 0.05) e (12 sem. Cont = 100 ± 4%, n=3 vs Mela = 152 ± 2%, n=3; p < 0.05) (Figura 7I). Entretanto, não houve diferenças na associação IRS-2 / SHP2 em ambos os protocolos (Figura 7J).



Figuras 7D-J. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina do IR, IRS 1 e 2 e análise da associação dos substratos 1 e 2 com a PI 3-cinase e com a proteína SHP2 em fígado de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas em tampão para imunoprecipitação com anticorpo anti-IR (D); anti-IRS-1 (E) e anti-IRS-2 (G) e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo antifosfotirosina (D, E e F) e com anticorpo anti-PI 3-cinase (G e H) e anticorpo anti-SHP-2 (I e J). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média \pm EPM. (§ = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Controle (+); & = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Tratado (-); * = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+)).

4.6.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina das Proteínas AKT/PKB Serina e Treonina, pERK 1 e 2, pp70^{s6k} e pJNK

Objetivando avaliar as proteínas à jusante da PI 3-cinase, a análise de quatro experimentos distintos apontou para o aumento significativo da fosforilação da AKT/PKB Serina após estímulo agudo com insulina em ambos os protocolos de tratamento, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 8\%$, n=4 vs Mela = $187 \pm 20\%$, n=4; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 5\%$, n=4 vs Mela = $138 \pm 9\%$, n=4; p<0,05) (Figura 7K), enquanto que no protocolo de 12 semanas não houve incremento no grau de fosforilação em resíduos treonina da proteína AKT/PKB (Figura 7L). O estímulo agudo com insulina também foi capaz de aumentar o grau de fosforilação das ERKs 1 e 2 no protocolo de 08 semanas (08 sem. Cont = $100 \pm 2\%$, n=4 vs Mela = $161 \pm 10\%$, n=4 ; p<0,05), entretanto não houve alterações no grau de fosforilação das proteínas ERKs 1 e 2 no tratamento de 12 semanas (Figura 7M). De maneira similar, ao analisarmos o grau de fosforilação da pp70^{s6k} em ambos os protocolos também não encontramos diferenças significativas (Figura 7N), assim como no grau de fosforilação basal da pJNK no protocolo de 12 semanas (Figura 7O).



Figuras 7K-O. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina das proteínas AKT/PKB Ser e Thr, pERKs 1 e 2, pp70^{s6k} e do grau de fosforilação da pJNK sem estímulo agudo com insulina (estado basal) em fígado de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo anti-pAKT Ser (K), anti-pAKT Thr (L), anti-pERK 1e 2 (M), anti-pp70^{s6k} (N) e com anticorpo anti-pJNK (O). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média ± EPM. (§ = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Controle (+); & = P < 0,05 - Comparando-se Tratado (-) versus Tratado (+); # = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Tratado (+)).

4.7 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

4.7.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina (IR) e Substratos IRS 1 e 2

As imunoprecipitações com o anticorpo anti-IR, anti IRS-1 e 2 seguidas pelo *immunoblotting* com o mesmo anticorpo demonstraram que o nível protéico do receptor de insulina, do IRS 1 e 2 no músculo gastrocnêmio dos ratos suplementados com melatonina foi semelhante ao dos ratos controles nos protocolos de 08 e 12 semanas (Figuras 8A, B e C).



Figuras 8A-C. Avaliação dos níveis protéicos induzido pela insulina da subunidade beta do receptor de insulina e de seus substratos 1 e 2 em músculo esquelético de ratos controles e suplementados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e denominadas de extrato total como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida foi realizado *imunoblotting* (IB) típico com anticorpo anti-IR (A), anti-IRS-1 (B) e anti-IRS-2 (C). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 5 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média ± EPM.

4.7.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina (IR), dos Substratos do Receptor de Insulina (IRS 1 e 2) e da Associação com a Proteína PI 3-cinase

A análise do grau de fosforilação em resíduos tirosil do receptor de insulina denotou um aumento significativo induzido por estímulo agudo com insulina em ambos os protocolos de tratamento (08 sem. Cont = $100 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $138 \pm 6\%$, n=4 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $145 \pm 10\%$, n=4 ; p<0,05) (Figura 8D), entretanto não detectamos aumento no grau de fosforilação do substrato 1 da insulina, assim como da associação do IRS-1 com a PI 3-cinase em ambos tratamentos (Figuras 8E e F). Porém, a análise do grau de fosforilação induzida pela insulina do substrato do receptor 2 avaliada através do *immunoblotting* com o anticorpo antifosfotirosina nas amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IRS-2 mostraram que de maneira semelhante ao receptor de insulina, o estímulo agudo com o hormônio foi capaz de induzir um aumento significativo na fosforilação do IRS-2 no protocolo de 08 semanas (08 sem. Cont = $100 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $164 \pm 19\%$, n=4 ; p<0,05), assim como na associação do IRS-2 com a PI 3-cinase no protocolo de 08 e 12 semanas, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 12\%$, n=5 vs Mela = $162 \pm 24\%$, n=5 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 3\%$, n=5 vs Mela = $168 \pm 18\%$, n=5 ; p<0,05) (Figuras 8G e H).



Figuras 8D-H. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina do IR, IRS 1 e 2 e análise da associação dos substratos 1 e 2 com a PI 3-cinase em músculo esquelético de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas em tampão para imunoprecipitação com anticorpo anti-IR (D); anti-IRS-1 (E) e anti-IRS-2 (G) e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo antifosfotirosina (D, E e G) e com anticorpo anti-PI 3-cinase (F e H). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média \pm EPM. (§ = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Controle (+); & = P < 0,05 - Comparando-se Tratado (-) versus Tratado (+);* = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+) versus Tratado (+)).

4.7.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina das Proteínas AKT/PKB Serina e Treonina e pERK 1 e 2

A proteína AKT/PKB Serina/Treonina tem sido sugerida como uma importante proteína na transmissão do sinal insulínico, assim a análise de quatro experimentos distintos apontaram para o aumento significativo da fosforilação da AKT/PKB em Serina no protocolo de 08 semanas após estímulo agudo com insulina (08 sem. Cont = $100 \pm 4\%$, n=4 vs Mela = $161 \pm 7\%$, n=4 ; p<0,05), contudo não houve foi detectado aumento no grau de fosforilação/ativação da proteínas AKT/PKB em serina e treonina no protocolo de 12 semanas (Figuras 8I e J). A análise das proteínas ERKs 1 e 2 mostraram aumento significativo de sua fosforilação tanto basal, quanto após estimulo agudo com insulina, em ambos os protocolos de tratamento, respectivamente (08 sem. Cont = $78 \pm 14\%$, n=4 vs Mela = $140 \pm 11\%$, n=4 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $96 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $174 \pm 10\%$, n=4 ; p<0,05); (08 sem. Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $178 \pm 21\%$, n=4 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 10\%$, n=5 vs Mela = $220 \pm 19\%$, n=5 ; p<0,05) (Figura 8K).



Figuras 8I-K. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina das proteínas AKT/PKB e pERKs 1 e 2 em músculo esquelético de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo anti-pAKT Serina (I), anti-pAKT Thr (J) e anti-pERK 1 e 2 (K). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média \pm EPM. (# = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Tratado (-); * = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+) versus Tratado (+)).

4.8 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA INDUZIDA NAS ETAPAS INICIAIS DA AÇÃO INSULÍNICA NO TECIDO ADIPOSO

4.8.1 Conteúdo Protéico do Receptor de Insulina (IR) e do Substrato IRS 1

As imunoprecipitações com o anticorpo anti-IR seguidas pelo *immunoblotting* com o mesmo anticorpo demonstraram que o nível protéico do receptor de insulina no tecido adiposo dos ratos suplementados com melatonina foi semelhante ao dos ratos controles no tratamento de 08 e 12 semanas (Figura 9A). Entretanto, quando avaliado o nível protéico do IRS-1 houve aumento significativo em ambos os protocolos, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $268 \pm 16\%$, n=4 ; p < 0.05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 4\%$, n=4 vs Mela = $197 \pm 6\%$, n=4 ; p < 0.05) (Figura 9B).



Figuras 9A-B. Avaliação dos níveis protéicos induzido pela insulina da subunidade beta do receptor de insulina e de seu substrato IRS-1 no tecido adiposo de ratos controles e suplementados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e denominadas de extrato total como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida foi realizado *imunoblotting* (IB) típico com anticorpo anti-IR (A) e anti-IRS-1 (B). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média ± EPM. * = P < 0,05 - Comparando-se Controle versus Tratado.</p>

4.8.2 Avaliação do Grau de Fosforilação do Receptor de Insulina (IR), dos Substratos do Receptor de Insulina (IRS 1 e 2), da Associação com a Proteína PI 3-cinase e SHP2

A análise do grau de fosforilação em resíduos tirosil do receptor de insulina e do substrato do receptor de insulina 1 e 2 foi avaliada através do *immunoblotting* com o anticorpo antifosfotirosina nas amostras previamente imunoprecipitadas com anticorpo anti-IR, anti IRS-1 e anti IRS-2. O estímulo agudo com insulina foi capaz de induzir aumento significativo no grau de fosforilação do receptor de insulina em ambos protocolos de tratamento (08 sem. Cont = 100 \pm 3%, n=4 vs Mela = 237 \pm 17%, n=4 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = 100 \pm 9%, n=4 vs Mela = $142 \pm 8\%$, n=4; p<0.05), respectivamente (Figura 9C). A análise do incremento no grau de fosforilação do IRS-1 após estímulo agudo com insulina em ambos os protocolos também apresentou diferenças significativas, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 10\%$, n=5 vs Mela $= 262 \pm 34\%$, n=5; p<0,05) e (12 sem. Cont = 100 ± 13\%, n=5 vs Mela = 161 ± 5\%, n=5; p < 0.05), com aumento na fosforilação do IRS-1 no estado basal no protocolo de 12 semanas (12 sem. Cont = $74 \pm 3\%$, n=5 vs Mela = $145 \pm 5\%$, n=5 ; p<0,05) (Figura 9D). Concomitante a estes achados, em ambos os tratamentos, houve aumento significativo na associação do IRS-1 com a PI 3-cinase tanto no estado basal (08 sem. Cont = $47 \pm 3\%$, n=5 vs Mela = $83 \pm 5\%$, n=5; p < 0.05) e (12 sem. Cont = 101 ± 2%, n=5 vs Mela = 150 ± 6%, n=5; p < 0.05) quanto após estímulo agudo com insulina, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 2\%$, n=5 vs Mela = $154 \pm$ 5%, n=5 ; p < 0.05) e (12 sem. Cont = 100 ± 2%, n=5 vs Mela = 239 ± 24%, n=5 ; p < 0.05) (Figura 9E). Além destes achados, também houve aumento na associação do IRS-1 com a proteína SHP2 após estímulo agudo com insulina em ambos os protocolos de tratamento, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 2\%$, n=5 vs Mela = $176 \pm 8\%$, n=5 ; p<0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 7\%$, n=5 vs Mela = $170 \pm 12\%$, n=5 ; p<0,05) (Figura 9F). Não houve diferenças significativas no incremento do grau de fosforilação do IRS-2 após estímulo agudo com insulina no protocolo de 08 semanas (Figura 9G).



Figuras 9C-G. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina do IR, IRS 1 e 2 e análise da associação do substrato 1 com a PI 3-cinase e com a proteína SHP2 em tecido adiposo de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas em tampão para imunoprecipitação com anticorpo anti-IR (C); anti-IRS-1 (D) e anti-IRS-2 (G) e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo antifosfotirosina (C, D e G) e com anticorpo anti-PI 3-cinase (E) e anticorpo anti-SHP-2 (F). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média \pm EPM. (§ = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Tratado (-); * = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+) versus Tratado (+)).

4.8.3 Avaliação do Grau de Fosforilação Induzido pela Insulina das Proteínas AKT/PKB Serina, pERK 1 e 2 e da pJNK

O estímulo agudo com insulina nos animais tratados cronicamente com melatonina foi capaz de induzir aumento na fosforilação/ativação das proteínas AKT/PKB Serina no protocolo de 08 e 12 semanas, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 8\%$, n=4 vs Mela = $187 \pm 2\%$, n=4; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $128 \pm 5\%$, n=4; p < 0,05) (Figura 9H). Além destes achados, no protocolo de 08 semanas, houve aumento significativo na fosforilação basal das proteínas ERKs 1 e 2 (08 sem. Cont = $122 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $195 \pm 15\%$, n=4 ; p < 0,05) com concomitante aumento após estímulo agudo com insulina em ambos os protocolos, respectivamente (08 sem. Cont = $100 \pm 20\%$, n=4 vs Mela = $196 \pm 12\%$, n=4 ; p < 0,05) e (12 sem. Cont = $100 \pm 20\%$, n=5 vs Mela = $124 \pm 3\%$, n=5 ; p < 0,05) (Figura 9I). Não foram encontradas diferenças significativas no grau de fosforilação da pJNK no protocolo de 12 semanas (Figura 9J).



Figuras 9H-J. Avaliação do grau de fosforilação induzido pela insulina das proteínas AKT/PKB Serina e pERKs 1 e 2 e do grau de fosforilação da pJNK sem estímulo agudo com insulina (estado basal) em tecido adiposo de ratos tratados com melatonina por 08 e 12 semanas. As proteínas foram extraídas e tratadas com tampão de Laemmli e o *immunoblotting* foi feito com anticorpo anti-pAKT Serina (H), anti-pERK 1 e 2 (I) e anti-pJNK (J). A representação gráfica da densitometria óptica realizada em auto-radiografias de 4 experimentos diferentes está representada no gráfico de barras. Os valores são expressos como porcentagem da média ± EPM. (# = P < 0,05 - Comparando-se Controle (-) versus Tratado (-); * = P < 0,05 - Comparando-se Controle (+) versus Tratado (+)).

5 DISCUSSÃO

Nos vertebrados, a melatonina é secretada pela glândula pineal durante o período escuro com diminuição ou ausência de sua secreção durante o dia. Com o envelhecimento a biossíntese de melatonina pela pineal diminui resultando em níveis mais baixos do hormônio no período escuro (Pang et al., 1990; Reiter, 1992). Este fenômeno leva a hipótese de que a administração de melatonina poderia contrabalancear as mudanças induzidas pela idade (Grad; Rozencwaig, 1993) e de fato, como ficou demonstrado posteriormente, a melatonina pode restaurar parcialmente os perfis bioquímicos e comportamentais dos animais mais velhos (Reiter et al., 1998). A melatonina também poderia anular os efeitos adversos de algumas patologias, tais como obesidade e diabetes. Hussein et al. (2007) demonstraram que a melatonina foi capaz de minimizar várias alterações metabólicas e morfológicas em coelhos com obesidade induzida por uma dieta com elevado teor lipídico, enquanto Sudnikovich et al. (2007), relataram que a melatonina pode promover benefícios contra complicações vasculares em ratos com diabetes induzida por streptozotocina. Porém, o(s) mecanismo(s) subjacente(s) a estas ações da melatonina ainda não são claros, embora, algumas evidências sugerem o envolvimento de uma interação putativa entre insulina e melatonina. Especificamente, Alonso-Vale et al. (2005) demonstraram, in vitro, que a melatonina exerce ação sinérgica com a insulina na fosforilação em tirosina da subunidade-ß de seu receptor. Além disso, estudos in vivo realizados por nosso laboratório (Anhê et al., 2004), propuseram a existência de um cross-talk entre insulina e melatonina, pela capacidade da melatonina em fosforilar em tirosina a subunidade-β do receptor de insulina no hipotálamo de ratos. Assim, com o objetivo de investigar se os efeitos que a melatonina exerce em ratos velhos podem ser justificados por uma interação funcional entre ambos os hormônios, realizamos a suplementação crônica de melatonina durante 08 e 12 semanas em ratos Wistar com 12 meses de idade. Após o tratamento, foi realizado um estímulo agudo in vivo com insulina para verificar as possíveis alterações nas etapas iniciais do hormônio no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo seguidos por imunoprecipitação e imunobloting dos tecidos com anticorpos específicos.

Como esperado, a suplementação com melatonina melhorou a sensibilidade da insulina por aumento na constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) nos grupos

suplementados cronicamente com hormônio por 08 e 12 semanas de tratamento, além de reduzir significativamente a gordura visceral no grupo tratado por 12 semanas consecutivas. Além disso, um fato muito relevante do presente estudo foi a detecção do aumento na fosforilação de diversos elementos da cascata de sinalização insulínica nos tecidos avaliados em uma fase que precedeu a perda significativa de peso, evidenciado no tratamento de 8 semanas e se manteve após diminuição significativa de massa de gordura visceral como mostrado no tratamento de 12 semanas. Devido à redução da sensibilidade da insulina em vários tecidos (Nishimura et al., 1988; Watve; Yajnik, 2007) ser a principal causa do aumento a resistência insulínica relacionada à idade (Popovich et al., 2005), os mecanismos subjacentes às ações da melatonina podem ser mais bem compreendidos pela avaliação de diferentes tecidos. Outro fato reforça esta afirmação, pois os efeitos do envelhecimento sobre a cascata da insulina são tecidos específicos para os tecidos avaliados (Carvalho et al., 1996; Huang et al., 2005). Em ratos velhos obesos hiperinsulinêmicos foi detectado diminuição na associação IRS-1/PI 3-cinase em figado e músculo esquelético, porém a associação entre IRS-2/PI 3-cinase foi preservado no tecido hepático daqueles animais (Carvalho et al., 1996, 2000). Estes dados corroboram nossos achados, pois, nos diversos tecidos estudados, ao avaliarmos o nível protéico do receptor de insulina e de seus substratos não houve alterações significativas com exceção do nível protéico do IRS-1 no tecido adiposo. Concomitante a estes achados houve aumento significativo no grau de fosforilação do receptor de insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, porém nenhuma alteração foi detectada no tecido hipotalâmico, justificando os efeitos tecido-específicos do hormônio.

O hipotálamo é considerado uma estrutura chave envolvida na homeostase energética (Coppola; Diano, 2007), além de controlar a maioria das funções vegetativas e endócrinas do corpo, assim como muitos aspectos do comportamento emocional, sendo fundamental na iniciação do comportamento alimentar. Inúmeros estudos apontam que lesões bilaterais do núcleo ventromedial do hipotálamo levam o animal a ficar hiperfágico, enquanto que lesões da área hipotalâmica lateral provocam hipofagia, ou até mesmo afagia (Hetherington et al., 1983; Bernardis et al., 1992; Vettor et al., 2001, 2003). Diversas pesquisas têm identificado funções pleiotrópicas aos receptores de insulina (IR) no cérebro (Havrankova et al., 1978; Baskin et al., 1987), e essas evidências experimentais sugerem uma importante função deste hormônio na regulação central do metabolismo energético (Baskin et al., 1987). Estudos liderados por Obici et al. (2002), identificaram que a diminuição seletiva nos receptores de insulina hipotalâmicos foi acompanhada de hiperfagia com rápido aumento de massa gorda corporal.

Os efeitos do envelhecimento sobre o metabolismo da insulina são amplamente investigados no sistema nervoso central (SNC) (Brüning et al., 2000; Niswender et al., 2003). Estudos apontam que o envelhecimento está associado com reduções no número de seus receptores neste tecido (Frölich et al., 1999) e de maneira semelhante, tanto a biossíntese, quanto a secreção de melatonina pela glândula pineal sofrem declínio com o avanço da idade (Pang et al., 1990; Reiter, 1992; Rasmussen et al., 1999). García-San Frutos et al. (2007) demonstraram que ratos velhos Wistar apresentam uma diminuição da sensibilidade central à insulina e que a restrição alimentar melhorou a resposta insulínica e sua sinalização nestes animais. Outros estudos (Rasmussen et al., 1999, 2001; Wolden-Hanson et al., 2000), demonstraram que a suplementação crônica com melatonina em ratos de meia-idade foi capaz de diminuiu a concentração plasmática de insulina e adiposidade visceral.

No hipotálamo, a melatonina promoveu um aumento da fosforilação do IRS-1 e 2 e de suas proteínas cascata abaixo como a AKT/PKB após estímulo agudo com insulina em ambos os protocolos de tratamento. É importante ressaltar que este aumento foi evidenciado no tratamento de 08 semanas onde ainda não havia diminuição significativa no peso corporal ou na ingestão alimentar dos animais podendo especular que esta melhora na sensibilidade do hormônio foi decorrente da ação central da melatonina neste tecido. Não obstante, no protocolo crônico de 12 semanas, o aumento da sensibilidade à insulina foi acompanhado de uma redução da ingestão alimentar entre os ratos velhos tratados com melatonina. A melhoria da transdução da sinalização alimentar está em concordância com o efeito anoréxico da insulina no sistema nervoso central (Niswender et al., 2003) e com o fato de que a interrupção das vias da sinalização da insulina implicarem em hiperfagia e/ou aumento do peso corporal, como pode ser observado em camundongos *knockouts* para receptores de insulina em neurônios (Brüning et al., 2000) e *knockouts* para IRS-2 (Masaki et al., 2004).

O hipotálamo dos ratos tratados cronicamente por 12 semanas com melatonina também apresentou um aumento na fosforilação basal da c - Jun N - terminais Kinase (JNK). Diversos estudos sugerem que a JNK desempenha um papel crítico na regulação dos vários componentes da apoptose celular (Papa et al., 2006). Estudos prévios

demonstram que a ativação da JNK pela insulina em fibroblastos de ratos estava aparentemente relacionada com a resposta mitogênica do hormônio e não diretamente com a morte celular (Miller et al., 1996). Morisco et al. (2007) demonstraram que os efeitos de proteção celular da insulina contra hipóxia grave eram dependentes de fosforilação da JNK em cardiomiócitos neonatais. Além disso, o aumento da resistência insulínica decorrente do envelhecimento poderia estar relacionado com a ruptura da ritmicidade dos relógicos biológicos (Kreier et al., 2007) e a fosforilação da JNK pode contribuir para a definição da duração dos períodos no ritmo circadiano de mamíferos (Chansard et al., 2007). Além disso, o envelhecimento cerebral é caracterizado por um aumento da disfunção mitocondrial (Bondy; Sharman, 2007) e os resultados de Newbern et al. (2007) sugerem que JNK participa da integridade do motoneurônio por manter o potencial de membrana mitocondrial. Além disso, mesmo as sustentações crônicas de baixos níveis de atividade inflamatória também podem estar relacionadas com os efeitos adversos do envelhecimento sobre o sistema nervoso central. Assim, é tentador especular que o aumento da fosforilação basal da JNK no hipotálamo pelo em ratos tratados com melatonina poderiam estar associados com a habilidade da melatonina em diminuir os efeitos do envelhecimento sobre o sistema nervoso central.

O tecido adiposo é mais um importante tecido que aumenta a resistência à insulina decorrente do envelhecimento e muitas evidências sustentam a hipótese de que o tecido adiposo é um dos primeiros locais que sofrem desordens metabólicas levando ao desenvolvimento intolerância à glicose (Serrano et al., 2009). Estudos in vitro demonstraram que adipócitos isolados de ratos velhos apresentam diminuição na ativação dos receptores de insulina (Carrascosa et al., 1989; Ruiz et al., 1992). Em concordância com estes achados, em ratos Wistar velhos, a diminuição da sensibilidade insulínica acima dos oito meses de idade ocorre paralelamente a um aumento significativo no percentual de gordura total, sobretudo a gordura visceral (Escrivá et al., 2007). A alta correlação entre distúrbios do metabolismo do tecido adiposo, como a obesidade e a lipodistrofia, e a manifestação de resistência à insulina indicam um papel importante do tecido adiposo na homeostase glicêmica (Kahn; Flier, 2000). Em ratos velhos, deficiências marcantes na cascata intracelular da sinalização da insulina estão presentes no tecido adiposo após estímulo agudo com insulina, ocorrendo diminuição na fosforilação do IR e ativação da AKT/PKB com concomitante redução da translocação do GLUT-4 para a membrana do adipócito (Smith, 2002; Serrano et al., 2009). Camundongos knockouts para o gene do GLUT-4 especificamente no tecido adiposo,

apresentam intolerância à glicose (Abel et al., 2001). Paradoxalmente, Blüher et al. (2003), utilizando o FIRKO, *fat-specific IR knockout mice*, demonstraram que estes animais vivem por mais tempo do que os animais controles normais, evidenciando uma proteção contra a obesidade e intolerância à glicose relacionada ao envelhecimento, além disso, este modelo animal manteve sua massa adiposa em torno de 50-70% inferior ao longo da vida. Não obstante, diversos estudos apontam que o acréscimo de tecido adiposo é um dos principais responsáveis pela resistência à insulina ao longo da idade (Gabriely et al., 2002; Escrivá et al., 2007). Assim, a diminuição da sensibilidade insulínica no tecido adiposo decorrente do envelhecimento poderia ser vista como uma proteção contra os efeitos deletérios do aumento da massa de gordura. Porém, é importante ressaltar que a resistência insulínica persistente no tecido adiposo poderia levar, em longo prazo, à desregulação da homeostase do metabolismo lipídico e acúmulo de gordura ectópica em tecidos periféricos, o que eventualmente poderia resultar no desenvolvimento de intolerância à glicose e diabetes mellitus do tipo 2 (Serrano et al., 2009).

Neste tecido, o tratamento com melatonina aumentou a fosforilação do receptor de insulina, assim como houve aumento no grau de fosforilação do IRS-1, em ambos protocolos crônicos de tratamento, e de sua associação com as proteínas a jusante na cascata de sinalização, a PI 3-cinase, proteína SHP-2, AKT/PKB e ERKs 1 e 2. O aumento da fosforilação do IRS-1 parece ser importante para as ações metabólicas da insulina no tecido adiposo (Kaburagi et al., 1997, Fasshauer et al., 2000). Estudos de Quon, (2002) mostraram que a superexpressão do IRS-1 em cultura de adipócitos foi capaz de aumentar os níveis de translocação do GLUT4 para a membrana, mesmo na ausência de insulina, mostrando o importante papel do IRS-1 nestas células para a captação de glicose. Em contrapartida, duas técnicas alternativas de abolir o IRS-1 nos adipócitos, através de uma microinjeção de anticorpo específico para IRS-1 (Morris et al., 1996) ou através de peptídeos que interferem diretamente na interação IR / IRS-1 (Sharma et al., 1997), não demonstraram prejuízos na captação de glicose estimulada pela insulina. Ainda, microinjeções de anticorpo anti-IRS-1 em fibroblastos foram capazes de reduzir o crescimento celular e síntese de DNA estimulado pela insulina (Rose et al., 1994). Estes resultados apontam para uma disparidade consensual sobre os efeitos mitogênicos e metabólicos da ativação do IRS-1 neste tecido. Não obstante, estudos realizados com camundongos knockouts para SHP-2 sugerem que esta proteína é um potencializador fisiológico da ação da insulina, sendo essencial sua atividade para a manutenção da homeostase glicídica durante o envelhecimento (Duan et al., 2004). Dessa maneira, os efeitos do tratamento com melatonina no tecido adiposo podem apoiar a melhoria na sensibilidade à insulina. Entretanto, no presente estudo, embora a sensibilidade à insulina aumentasse, houve redução da massa de gordura visceral. Porém, como a diminuição da gordura corporal somente pode ser resultado crônico de um balanço negativo de lipídeos (Schutz, 2004), a redução da ingestão alimentar promovida pela melatonina também pode explicar este achado. Contudo, a redução da ingestão alimentar por si não justifica a redução da gordura corporal. A suplementação com melatonina também diminui a eficiência alimentar em ratos velhos, promovendo a redução da gordura visceral de outra maneira. Wolden - Hanson et al. (2000) também observaram que a melatonina reduz a eficiência alimentar em ratos de meias-idades. Outra possível explicação para a redução da gordura visceral é o aumento da atividade física espontânea. Envelhecimento é acompanhado de uma diminuição da atividade muscular (Altun et al., 2007) e a melatonina foi capaz de aumentar a atividade física espontânea em 19% com concomitante redução de 20% no percentual de gordura visceral em ratos Sprague Dawley de meia-idade (Wolden - Hanson et al., 2000). A melatonina também é capaz de aumentar a resposta comportamental em ratos de meiasidades (Rasmussen et al., 2001). No entanto, no presente estudo, nós não avaliamos o gasto energético pela atividade espontânea em nossos animais. É importante notar que alguns estudos anteriores mostraram que o tratamento com melatonina promoveu uma redução da gordura visceral sem observarem redução da ingestão alimentar (Rasmussen et al., 1999; Wolden - Hanson et al., 2000). Angers et al. (2003), sugeriram que as diferenças sobre os efeitos da melatonina na ingestão alimentar podem ser explicadas pelo momento em que a melatonina foi administrada. De fato, no presente estudo a administração da melatonina foi realizada em períodos diferentes dos estudos anteriores. Outra explicação poderá estar relacionada com as diferentes linhagens de ratos utilizada. Em animais Sprague - Dawley o aumento do peso corporal total e no teor de gordura ocorrem com um aumento concomitante da concentração de insulina. Por outro lado, ratos Wistar ganham peso de acordo ao avanço da idade, entretanto, no jejum, sua concentração de insulina permanece igual ao de ratos Wistar jovens de três meses de idade (Escrivá et al., 1997). Além disso, no presente estudo os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas enquanto nos estudos anteriores os ratos foram mantidos em grupos. Em um estudo dirigido por Hussein et al. (2007) onde os animais foram mantidos em gaiolas individuais, também foi relatado redução da ingestão alimentar,

decorrente do tratamento crônico com melatonina. Esta estratégia nos possibilitou perceber sutis diferenças na ingestão alimentar.

O tecido hepático é essencial na homeostase energética, pois exerce funções de estocar glicose como glicogênio ou converter o excesso de glicose em ácidos graxos após as refeições assim como o papel de promover a produção de glicose através da gliconeogênese em períodos de jejum (Gribble, 2005). A regulação da homeostase dos nutrientes é composta por uma complexa rede entre insulina, hormônios contraregulatórios da glicemia e SNC (Wolfrum et al., 2004; Montminy; Koo, 2004; Pocai, 2005). No entanto, ainda há controvérsias se a desregulação do metabolismo hepático associados à síndrome metabólica e diabetes aumentam diretamente devido à resistência insulínica ou indiretamente por mudanças no fluxo de nutrientes (Barret, 2003). Animais com deleção específica dos receptores hepáticos de insulina, LIRKO, the liver-specific insulin receptor knockout, não desenvolvem diabetes, assim como seus níveis de glicemia de jejum é praticamente normal, embora possa ocorrer uma hiperglicemia transitória após refeições e ratos velhos podem cursar com falência hepática (Michael et al., 2000). A pinealectomia aumenta os níveis plasmáticos de colesterol livre e lipídeos plasmáticos, ocasionando hiperinsulinemia e acúmulo de lipídeos no fígado (Nishida et al., 2003). Não obstante, animais pinealectomizados submetidos ao treinamento aeróbio sofrem diminuição do conteúdo de glicogênio hepático sugerindo uma maior mobilização e/ou uma diminuição da síntese de glicose pelo figado (Borges-Silva et al., 2007). Ambos estudos mostram um papel importante da melatonina sobre o tecido hepático.

O envelhecimento e o aumento da gordura corporal também podem alterar a sensibilidade à insulina pelos seus efeitos no tecido hepático (Pagliassoti; Horton, 1994). Em indivíduos diabéticos do tipo 2, o excesso de gordura visceral e no fígado estão diretamente associados ao aumento da produção hepática de glicose e resistência à insulina (Gastaldelli et al., 2007). Apesar do envelhecimento não alterar os níveis basais e a fosforilação do receptor de insulina após estímulo agudo com insulina no tecido hepático (Kono et al., 1990) nem mesmo a capacidade destes receptores em se ligarem à insulina (Torlinska et al., 2000), pesquisas realizadas por nosso laboratório demonstraram que as etapas iniciais da transdução do sinal insulínico estão alteradas no fígado de ratos velhos Wistar (Carvalho et al., 1996). Em figado de ratos velhos, o aumento da fosforilação do IR e do IRS-2 e da associação deste substrato e do IRS-1 com PI 3-cinase sugere que o tratamento com melatonina melhorou tanto a homeostase

65

glicêmica como o metabolismo lipídico, considerando os papéis diferenciados destes substratos no tecido hepático (Taniguchi et al., 2005). Em nossos achados, a maior fosforilação da AKT/PKB reforça esta sugestão, pois a redução do IRS-1 e 2 no figado é associada com a diminuição da ativação da AKT/PKB (Taniguchi et al., 2005). Além disso, a ativação da AKT/PKB está relacionada com uma diminuição da transcrição da PEPCK, enzima chave da gliconeogênese, diminuindo a produção hepática de glicose (Escrivá et al., 2007; Logie et al., 2007).

No músculo esquelético, o principal tecido responsável pela captação de glicose induzida pela insulina, o envelhecimento parece não afetar a massa muscular de maneira uniforme, pois estudos de Escrivá et al. (1997), apontam que a resistência à insulina ocorre mais em determinados músculos. No gastrocnêmio, um dos músculos mais afetados, a síntese de glicogênio, em resposta ao estímulo com insulina foi acentuadamente reduzida em ratos velhos Wistar (Goodman et al., 1983). Neste tecido, a melatonina aumentou o grau de fosforilação do receptor de insulina, assim como do substrato 2 do receptor (IRS-2) e sua associação com a PI 3-cinase e ativação da proteína AKT/PKB, além de aumentar significativamente a fosforilação/ativação das ERKs 1 e 2 em ambos os protocolos de tratamento. Foi demonstrado que no músculo esquelético o IRS-1 parece estar mais relacionado com a captação de glicose enquanto IRS-2 contribui seletivamente na sinalização das ERKs-1/2, contribuindo para os efeitos mitogênicos estimulados pela insulina (Huang et al., 2005). Recentemente, foi demonstrado que a ativação crônica da AKT/PKB neste tecido pode ocasionar retroalimentação negativa do IRS-1, porém sem ocasionar alterações na captação de glicose pelo músculo (Cleasby et al., 2007). Dessa forma, nossos dados sugerem que o tratamento com melatonina não aumenta a contribuição do músculo esquelético diretamente na captação de glicose, onde aparentemente o efeito da melatonina neste tecido parece estar mais relacionado com o aumento das atividades mitogênicas da insulina.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo nos permite concluir que:

1. O tratamento crônico com melatonina por 8 semanas provocou expressiva melhora na constante de decaimento de glicose (K_{ITT}), precedendo a perda de peso e a redução da ingestão alimentar, e que foi mantida com mais um mês de tratamento.

2. A melhora da sensibilidade à insulina foi acompanhada de aumento no grau de fosforilação de diversos componentes das etapas iniciais da ação da insulina, já aos 2 meses de tratamento com melatonina;

3. Não houve alteração nos níveis protéicos do receptor de insulina e de seus substratos 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) no hipotálamo, fígado e músculo esquelético de ratos velhos suplementados com melatonina por 8 e 12 semanas consecutivas. Por outro lado, no tecido adiposo houve aumento no conteúdo protéico do IRS-1, sem alteração no IR;

4. As etapas a jusante da ativação do IR como a associação do fosfatidilinositol 3'quinase (PI 3-quinase) com os IRS-1 e IRS-2; fosforilação da proteína kinase-B (PKB/AKT), a associação dos IRS com a proteína fosfatase SHP2, a proteína p70 ribossomal S6 kinase (pp70^{s6k}) e a proteína c-Jun N-terminal kinases (JNK) no hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo sofreram regulação tecidoespecífica e tempo-dependente da suplementação com melatonina.

Em síntese, concluímos que o tratamento crônico com melatonina induziu aumento da sensibilidade à insulina acompanhada de regulação positiva das etapas iniciais da ação do hormônio em hipotálamo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de ratos com 13 meses de idade. Detectamos efeito temporal de suplementação com melatonina sobre a ação insulínica, com aumento da sensibilidade à insulina precedendo a diminuição da ingestão alimentar e perda de peso. Sendo assim, nossos dados nos permitem sugerir que a resistência à insulina presente no envelhecimento normal pode ter como fator desencadeador e/ou agravante a redução fisiológica da produção/secreção de melatonina também presente no processo de envelhecimento normal; e que essas alterações podem preceder o aumento de peso e da ingestão alimentar. Nosso estudo reafirma o papel da melatonina como um fator regulador da ação insulínica e permite a conclusão de que a reposição desse hormônio pode contribuir para a reversão da resistência à insulina e redução do peso corporal que acompanha o processo normal de envelhecimento.

REFERÊNCIAS^{*}

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shuman GI, Kahn BB. Adipose selective targeting of the GLUT 4 gene impair insulin action in muscle and liver. Nature. 2001 Feb 8;409(6821):672-3.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2000 Oct;11(8):327-32.

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhê GF, das Neves Borges-Silva C, Neto JC, et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005 Apr;288(4):E805-12.

Alonso-Vale MI, Borges-Silva CN, Anhê GF, Andreotti S, Machado MA, Cipolla-Neto J, et al. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. Horm Metab Res. 2004 Jul;36(7):474-9.

Alquier T, Leloup C, Atef N, Fioramonti X, Lorsignol A, Penicaud L. Cerebral insulin increases brain response to glucose. J Neuroendocrinol. 2003 Jan;15(1):75-9.

Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. Physiol Behav. 2007 Dec 5;92(5):911-23.

Angers K, Haddad N, Selmaoui B, Thibault L. Effect of melatonin on total food intake and macronutrient choice in rats. Physiol Behav. 2003 Oct;80(1):9-18.

Anhê GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso LA, et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. J Neurochem. 2004 Aug;90(3):559-66.

Araki E, Lipes M, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson R, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with target disruption of the IRS-1 gene. Nature. 1994 Nov 10;372(6502):186-90.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

Armstrong SM. Melatonin and circadian control in mammals. Experientia. 1989 Oct 15;45(10):932-8.

Barret EJ. Insulin's effect on glucose production direct or indirect? J Clin Invest. 2003 Feb;111(4):434-5.

Barret P, Morris M, Choi WS, Ross A, Morgan PJ. Melatonin receptors and signal transduction mechanisms. Biol Signals Recept. 1999 Jan-Apr;8(1-2):6-14.

Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chen W, Rossetti L. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. J Clin Invest. 1998 Apr 1;101(7):1353-61.

Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM. Insulin in the brain. Annu Rev Physiol. 1987;49:335-47.

Baskin DG, Figlewicz-Latternann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. Brain Res. 1999 Nov 27;848(1-2):114-23.

Baskin DG, Sipols AJ, Schwartz MW, White MF. Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine. Regul Pept. 1993 Oct 20;48(1-2):257-66.

Bernardis LL, Awad A, Fink C, Bellinger LL. Metabolic and neuroendocrine indices one month after lateral hypothalamic area lesions. Physiol Behav. 1992 Jul;52(1):133-9.

Bernier M, Laird DM, Lane MD. Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Apr;84(7):1844-8.

Bjorntorp P. Neuroendocrine aging. J Intern Med. 1995 Nov;238(5):401-4.

Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. Dev Cell. 2002 Jul;3(1):25-38.

Bodkin NL, Nicolson M, Ortmeyer HK, Hansen BC. Hyperleptinemia: relationship to adiposity and insulin resistance in the spontaneously obese rhesus monkey. Horm Metab Res. 1996 Dec;28(12):674-8.

Bogovich K, Clemons J, Poretsky L. Insulin has a biphasic effect on the ability of human chorionic gonadotropin to induce ovarian cysts in the rat. Metabolism. 1999 Aug;48(8):995-1002.

Bondy SC, Sharman EH. Melatonin and the aging brain. Neurochem Int. 2007 Mar;50(4):571-80.

Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cicolini M, Querena M, Cacciotori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic glucose clamp studies. J Clin Endocrinol Metab. 1989 Feb;68(2):374-8.

Borges-Silva C, Alaniz MHF, Alonso-Vale MIC, Takada J, Andreotti S, Peres SB, et al. Reduced lipolysis and increased lipogeneses in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. J Pineal Res. 2005 Sep;39(2):178-84.

Borges-Silva C, Takada J, Alonso-Vale MIC, Peres SB, Alaniz MHF, Andreotti S, et al. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. J Pineal Res. 2007 Aug;43(1):96-103.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science. 2000 Sep 22;289(5487):2122-5.

Brydon L, Petit L, Delagrange P, Strosberg AD, Jockers R. Functional expression of MT2 (Mel 1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. Endocrinology. 2001 Oct;142(10):4264-71.

Buemann B, Tremblay A. Effects of exercise training on abdominal obesity and related metabolic complications. Sports Med. 1996 Mar;21(3):191-212.

Burks DJ, Mora JF, Schubert M, Whiters DJ, Myers MG, Towery HH, et al. IRS-2 pathway integrate female reproduction and energy homeostasis. Nature. 2000 Sep 21;407(6802):377-82.

Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. J Pineal Res. 1996 Nov;21(4):200-13.

Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Ribeiro LM, Medina MC, Souza LC, et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. Endocrine. 2006 Jun;29(3):391-8.

Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Curr Opin Cell Biol. 1996 Apr;8(2):153-8.

Carrascosa JM, Ruiz P, Martínez C, Pulido JA, Satróstegui J, Andrés A. Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. Biochem Biophys Res Commun. 1989 Apr 14;160(1):303-9.

Carvalheira JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects the JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. Biol Chem. 2003 Jan;384(1):151-9.

Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. FEBS Lett. 2001 Jul 6;500(3):119-24.

Carvalho CR, Carvalheira JB, Lima MH, Zimmerman SF, Caperuto LC, Amanso A, et al. Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. Endocrinology. 2003 Feb;144(2):638-47.

Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. Endocrinology. 1996 Jan;137(1):151-9.

Carvalho CR, Maeda L, Brenelli SL, Saad MJ. Tissue-specific regulation of IRS-2/PI 3-kinase association in aged rats. Biol Chem. 2000 Jan;381(1):75-8.

Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. Diabetes. 1997 Dec;46(12):1950-7.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and –insensitive G proteins. Cell Signal. 2002 Mar;14(3):249-57.

Chansard M, Molyneux P, Nomura K, Harrington ME, Fukura C. c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 modulates the period of mammalian circadian rhythms. Neuroscience. 2007 Mar 30;145(3):812-23.

Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. Endocr Rev. 1995 Apr;16(2):117-42.

Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula pineal: fisiologia celular e função. In: Wajchenberg BL. Tratado de Endocrinologia Clínica. São Paulo: Roca; 1992. p. 83-93.

Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula pineal. In: Aires MM editor. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999. p. 805-811.

Cleasby ME, Reinten TA, Cooney GJ, James DE, Kraegen EW. Functional studies of Akt isoform specificity in skeletal muscle in vio maintained insulin sensitivity despite reduced insulin receptor substrate-1 expression. Mol Endocrinol. 2007 Jan;21(1):215-28.

Coimbra CC, Migliorini RH. Insulin-sensitive glucoreceptors in rat preoptic area that regulate FFA mobilization. Am J Physiol. 1986 Dec;251(6 Pt 1):E703-6.

Coppola A, Diano S. Hormonal regulation of the arcuate nucleus melanocortin system. Front Biosci. 2007 May 1;12:3519-30.

Craparo A, Freund R, Gustafson TA. 14-3-3 (s) interacts with the insulin-like growth factor 1 receptor and insulin receptor substrate 1 in a phosphoserine-dependent manner. J Biol Chem. 1997 Apr 25;272(17):11663-9.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.

Cross DA, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS, Cohen P. The inhibition of glycogen synthase kinase 3 by insulin or insulin-like growth factor-1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. Biochem J. 1994 Oct 1;303 (Pt 1):21-6.

Cuatrecasas P. Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1972 May;69(5):1277-81.

Duan C, Yang H, White MF, Rui L. Disruption of the SH2-B gene causes agedependent insulin resistance and glucose intolerance. Mol Cell Biol. 2004 Sep;24(17):7435-43.

Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, et al. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulinand antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Feb;84(3):704-8.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauster E, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell. 1985 Apr;40(4):747-58.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatases-1B gene. Science. 1999 Mar 5;283(5407):1544-8.

Escrivá F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascal-Leone AM, Andres A, et al. In vivo Insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. Endocrinology. 1997 Jan;138(1):49-54.

Escrivá F, Gavete ML, Fermín Y, Pérez C, Galland N, Alvarez C, et al. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. J Endocrinol. 2007 Jul;194(1):131-41.

Fabis M, Pruszyńska E, Maćkowiak P. In vivo and in situ action of melatonin on insulin secretion and some metabolic implications in the rat. Pancreas. 2002 Aug;25(2):166-9.

Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 Jan;278(1):E127-33.
Fasshauer M, Klein J, Ueki K, Kriauciunas KM, Benito M, White MF et al. Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of GLUT-4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25494-501.

Folli F, Bonfanti L, Renard E, Kahn CR, Merighi. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. J Neurosci. 1994 Nov;14(11 Pt 1):6412-22.

Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substsrate 1 in liver and muscle of the intact rat. J Biol Chem. 1992 Nov 5;267(31):22171-7.

Folli F, Saad MJA, Backer JM, Kahn CR. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of animal models of insulin resistant and insulin deficient diabetes mellitus. J Clin Invest. 1993 Oct;92(4):1787-94.

Freychet P, J Roth, DM Neville Jr. Insulin receptor in the liver: specific bindidng of (125I) insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Aug;68(8):1833-7.

Frölich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S. A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci. 1999;893:290-3.

Fruhbeck G, Goméz-Ambrosi J, Muruzábal FJ. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 Jun;280(6):E827-47.

Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of cisceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? Diabetes. 2002 Oct;51(10):2951-8.

Garcia RAP, Afeche SC, Scialfa JH, Amaral FG, Santos SHJ, Lima FB, et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. Life Sci. 2008 Jan 2;82(1-2):108-14.

García-San Frutos M, Fernandez-Agulho T, De Solis AJ, Andres A, Arribas C, Carrascosa JM, et al. Impaired central insulin response in aged wistar rats: role of adiposity. Endocrinology. 2007 Nov;148(11):5238-47.

Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. Gastroenterology. 2007 Aug;133(2):496-506.

Goodman NM, Divz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB. Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: change during 3-96 weeks of age. Am J Physiol. 1983 Jan;244(1):E93-100.

Grad BR, Rozencwaig R. The role of melatonin in mediating seasonal emergetic and immunological adaptations. Brain Res Bull. 1997;44(4):423-30.

Gribble FM. Metabolism: a higher power for insulin. Nature. 2005 Apr 21;434(7036):965-6.

Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein M. Identification of insulin in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Nov;75(11):5737-41.

Heidenreich KA. Insulin and IGF-I receptor signaling in cultured neurons. Ann N Y Acad Sci. 1993 Aug 27;692:72-88.

Hetherington AW, Ranson SW. Nutrition Classics. The Anatomical Record, Volume 78, 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. Nutr Rev. 1983 Apr;41(4):124-7.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alfa- and obesityinduced insulin resistance. Science. 1996 Feb 2;271(5249):665-8.

Huang C, Thirone ACP, Huang X, Klip A. Differential contribution of insulin receptor substrate 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in L6 myotubes. J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):19426-35.

Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. Int J Exp Pathol. 2007 Feb;88(1):19-29.

Illnerová H, Backstron M, Saaf J, Weterberg L, Vangbo B. Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. Neurosci Lett. 1978 Dez; 9(2): 189-93.

Johnson RD. Opioid involvement in feeding behaviour and the pathogenesis of certain eating disorders. Med Hypotheses. 1995 Nov;45(5):491-7.

Jonas EA, Knox RJ, Smith TC, Wayne NL, Connor JÁ, Kaczmarek LK. Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. Nature. 1997 Jan 23;385(6614):343-6.

Kaburagi Y, Satoh S, Tamemoto H, Yamamoto-Honda R, Toke K, Veki K, et al. Role of insulin receptor subtrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUt4 translocation in primary adipocytes. J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):25839-44.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 2000 Aug;106(4):473-81.

Kahn CR. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. Ann Rev of Med. 1985 Set;36(26):429-451.

Kappers, JA.The development topographical relation and innervation of epiphysis cerebri in the albino rat. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1960;52:163-215.

Kasuga M, Karlsson FA, CR Kahn. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. Science. 1982 Jan 8;215(4529):185-7.

Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. J Clin Invest. 2000 Jan;105(2):199-205.

Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of a fat-induced insulin resistance by salicylate. J Clin Invest. 2001 Aug;108(3):437-46.

King GL, Johnson SM. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. Science. 1985 Mar 29;227(4694):1583-6.

Klein DC, Moore RY. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. Science. 1970 Sep 11;169(950):1093-5.

Klein DC, Shaad NL, Namboodiri MA, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Biochem Soc Trans. 1992 May;20(2):299-304.

Kono S, Kuzuya H, Okamoto M, Nishimura H, Kosaki A, Kakehi T, et al. Changes in insulin receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. Am J Physiol. 1990 Jul;259(1 Pt 1):E27-35.

Kreier F, Kalsbeek A, Sauerwein HP, Fliers E, Romijn JA, Buijs RM. "Diabetes of eldery" and type 2 diabetes in younger patients: possible role of the biological clock. Exp Gerontol. 2007 Jan-Feb;42(1-2):22-7.

La Fleur SE, Klasbeek A, Wortel J, Buijs R. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. Neuroendocrinology. 1999 Aug;11(8):643-52.

La Fleur SE, Klasbeek A, Wortel J, Fekks ML, Buijs SR A daily rhythm in glucose tolerance. A role for the suprachiasmatic nucleus. Diabetes. 2001 Jun;50(6):1237-43.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Le Gouic S, Delagrange P, Atgie C, Nibblink M, Hanoun N, Casteilla L, et al. Effects of both melatonin agonist and antagonist on seasonal changes in body mass and energy intake in garden dormouse. Int J Obes Relat Metab Disord. 1996 Jul;20(7):661-7.

Lietkze SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, et al. Structural basis of phosphatidylinositol 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. Mol Cell. 2000 Aug;6(2):385-94.

Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphin PM, Sumida DH, Moraes SM, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. Am J Physiol. 1998 Dec;275(6 Pt 1):E934-41.

Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of the day and melatonin. Braz J Med Biol Res. 1994 Apr;27(4):995-1000.

Lima MH, Souza LC, Caperuto LC, Belivacqua E, Gaspareti AL, Zanuto R, et al. Upregulation of the PI3K/AKT pathway in ovary of rats by chronic treatment with HCG and insulin. J Endocrinol. 2006 Aug;190(2):451-9.

Logie L, Ruiz-Alcaraz AJ, Keane M, Woods YL, Bain J, Marquez R, et al. Characterization of protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells. Diabetes. 2007 Sep;56(9):2218-27.

Manin M, Broer Y, Balage M, Rostene W, Grizard J. Metabolic clearance of insulin from the cerebrospinal fluid in the anesthetized rat. Peptides. 1990 Jan-Feb;11(1):5-12.

Margraf RR, Lynch GR. Melatonin injections affect circadian behavior and SCN neurophysiology in Djungarian rats. Am J Physiol. 1993 Mar;264(3 Pt 2):R615-21.

Marondi E, Stehle JH. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. Trends Endocrinol Metab. 2007 May-Jun;18(4):142-9.

Masaki T, Chiba S, Naguchi H, Yasuda T, Tobe K, Suzuki R, et al. Obesity in insulin receptor substrate-2 deficient mice: disrupted control of arcuate nucleus neuropeptides. Obes Res. 2004 May;12(5):878-85.

Michael MD. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Mol Cell. 2000 Jul;6(1):87-97.

Miller BS, Shankavaram UT, Horney MJ, Gore ACS, Kurtz DT, Rosenzweig SA. Activation of cJun NH2-terminal Kinase/stress-activated protein kinase by insulin. Biochemistry. 1996 Jul 2;35(26):8769-75.

Montminy M, Koo SH. Diabetes: outfoxing insulin resistance? Nature. 2004 Dec 23;432(7020):958-9.

Morgan P, Barret P, Howell H, Helliwel R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. Neurochem Int. 1994 Feb;24(2):101-46.

Morisco C, Marrone C, Trimarco V, Crispo S, Monti MG, Sadoshima J, et al. Insulin resistance affects the cytoprotective effect of insulin in cardiomyocytes through an impairment of MAPK phosphatase-1 expression. Cardiovasc Res. 2007 Dec 1;76(3):453-64.

Morris AJ, Martin SS, Haruta T, Nelson JG, Vollenweider P, Gustafson TA, et al. Evidence for an insulin receptor substrate 1 independent insulin signaling pathway that mediates insulinresponsive glucose transportes (GLUT4) translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 6;93(16):8401-6.

Nakae J, Park B, Accili D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a wortmannin-sensitive pathway. J Biol Chem. 1999 Jun 4;274(23):15982-5.

Nelson RJ, Demas GE. Role of melatonin in mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. Brain Res Bull. 1997;44(4):423-30.

Newbern J, Taylor A, Robinson M, Lively MO, Milligan CE. c-Jun N-terminal kinase signaling regulates events associated with both health and degeneration in motoneurons. Neuroscience. 2007 Jul 13;147(3):680-92.

Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S. Effect of pinealectomy on plasma levls of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. J Pineal Res. 2003 Nov;35(4):251-6.

Nishimura H, Kuzuya H, Okamoto M, Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, et al. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. Am J Physiol. 1988 Jan;254(1 Pt 1):E92-8.

Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus A key mediator of insulin-induced anorexia. Diabetes. 2003 Feb;52(2):227-31.

Nunes AL, Carvalheira JB, Carvalho CR, Brenelli SL, Saad MJ. Tissue-specific regulation of early steps in insulin action in septic rats. Life Sci. 2001 Sep 21;69(18):2103-12.

Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. Nat Neurosci. 2002 Jun;5(6):566-72.

Pagliassoti MJ, Horton TJ. Hormonal and neural regulation of hepatic glucose uptake. In: Pagliassoti MJ, Davis S, Cherrington AD. The role of the liver in maintaing glucose homeostasis. Austin: Landers; 1994. p. 45-70.

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

Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Kanbb JR, et al. The NF- κ B-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. Cell Death Differ. 2006 May;13(5):712-29.

Pardridge WM. Receptor-mediated transport through the blood-brain-barrier. Endocr Rev. 1986 Aug;7(3):314-30.

Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Dorothee P, Preiss U, Schneyer U, et al. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and increased pancreatic serum melatonin-receptor status. J Pineal Res. 2006 Mar;40(2):135-43.

Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer H. Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? J Pineal Res. 2007 Apr;42(4):350-8.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. J Clin Invest. 2000 Jul;106(2):165-9.

Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucoseinduced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rats. J Pineal Res. 2002 Oct;33(3):172-7.

Plitzko D, Rumpel S, Gottmann K. Insulin promotes functional induction of silent synapses in differentiating rat neocortical neurons. Eur J Neurosci. 2001 Oct;14(8):1412-5.

Pocai A. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. Nature. 2005 Apr 21;434(7036):1026-31.

Popovich IG, Zabezhinski MA, Egormin PA, Tyndyk ML, Anikin IV, Spasov AA, et al. Insulin in aging and cancer: antidiabetic drug diabenol as geroprotector and anticarcinoen. Int J Biochem Cell Biol. 2005 May;37(5):1117-29.

Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrange P, Renard P, et al. Melatonin reduces body weight gain in Sprague-Dawley rats with diet-induced obesity. Endocrinology. 2003 Dec;144(12):5347-52.

Quon MJ. Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. J Biol Chem. 1994 Nov 11;269(45):27920-4.

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

Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. J Pineal Res. 2001 Aug;31(1):89-94.

Reiter R. The ageing pineal gland and its physiological consequences. Bioessays. 1992 Mar;14(3):169-75.

Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castro V, Ejo D. Reactive oxygen intermediares, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. Ann N Y Acad Sci. 1998 Nov 20;854:410-24.

Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Sep 12;92(19):8734-8.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron. 1994 Nov;13(5):1177-85.

Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol Sci. 1996 Mar;17(3):100-2.

Richter HG, Torres-Farfán C, Rojas-García PP, Campino C, Torrealba F, Serón-Ferré M. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. Biol Res. 2004;37(1):11-28.

Robinson LJ, Leitner W, Draznin K, Heidenreich KA. Evidence that p21ras mediates the neurotrophic effects of insulin and insulin-like growth factor I in chick forebrain neurons. Endocrinology. 1994 Dec;135(6):2568-73.

Rose DW, Saltiel AR, Majumdar M, Decker SJ, Olefsky JM. Insuline receptor substrate 1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 18;91(2):797-801.

Rosenthal NE, Genhart M, Jacobsen FM, Skwerer RG, Wehr TA. Disturbance of appetite and weight regulation in seasonal affective disorder. Ann N Y Acad Sci. 1987;499:216-30.

Ruiz P, Pulido JA, Martínez C, Carrascosa JM, Satróstegui J, Andrés A. Effect of aging on the kinetic characteristic of insulin receptor autophosphorylation in rat adipocytes. Arch Biochem Biophys. 1992 Jul;296(1):231-8.

Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. J Biol Chem. 1996 Sep 6;271(36):22100-4.

Saad MJ, Velloso LA, Carvalho CR. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and its association of phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. Biochem J. 1995 Sep 15;310 (Pt 3):741-4.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.

Schutz Y. Dietary fat, lipogenesis and energy balance. Physiol Behav. 2004 Dec 30;83(4):557-64.

Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. Endocrinology. 1992 Jun;130(6):3608-16.

Seraphim PM, Bartol I, Cipolla-Neto J, Machado UF. Quantification of Glut-4 transporter in insulin-sensitive tissues from pinealetomized rats. In: Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pévet P. Pineal Update: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. Westbury PJD Publications Ltd; 1997. p. 99-106.

Serrano R, Villar M, Gallardo N, Carrascosa JM, Martinez C, André A. The effect of aging on insulin signaling pathway is tissue dependent: Central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging. Mech Ageing Dev. 2009 Mar;130(3):189-97.

Sharma PM, Egawa K, Gustafson TA, Martin JL, Olefsky JM. Adenovirus-mediated overexpression of IRS-1 interacting domains abolishes insulin-stimulated mitogenesis without affecting glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biol. 1997 Dec;17(12):7386-97.

Shimokata H, Tobin JD, Muller DC, Elahi D, Coon PJ, Andres R. Studies in the distribution of body fat: I. Effects of age, sex, and obesity. J Gerontol. 1989 Mar;44(2):M66-73.

Smith U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance – is insulin resistance initiated in the adipose tissue? Int J Obes Relat Metab Disord. 2002 Jul;26(7):897-904.

Speh JC, Moore RY. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. Brain Res Dev Brain Res. 1993 Dec 17;76(2):171-81.

Standaert MI, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein kinase C-zeta as a dowstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. J Biol Chem. 1997 Nov 28;272(48):30075-82.

Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaya SV, Kubyshin VL, Lapshina EA, Bryzewska M, Reiter RJ & Zavodnik IB (2007). Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. Eur J Pharmacol. 2007 Aug 27;569(3):180-7.

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. Experientia. 1989 Oct 15;45(10):922-32.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature. 1991 Jul 4;352(6330):73-7.

Takahashi M, Yamada T, Tooyama I, Moroo I, Kimura H, Yamamoto T, et al. Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1996 Feb 9;204(3):201-4.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature. 1994 Nov 10;372(6502):182-6.

Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. J Clin Invest. 2005 Mar;115(3):718-27.

Tissenbaum HA, Ruvkun G. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabdtis elegans*. Genetics. 1998 Feb;148(2):703-17.

Torlinska T, Mackowiak P, Nogowski L, Hryniwwiecki T, Witmanowski H, Perz M, et al. Age dependent changes of insulin receptor in rat tissues. J Physiol Pharmacol. 2000 Dec;51(4 Pt 2):871-81.

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature. 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):756-61.

Unger JW, Betz M. Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamohypophyseal system: a review on morphological findings and functional implications. Histol Histopathol. 1998 Oct;13(4):1215-24.

Unger JW, Lange W. Insulin receptors in the pituitary gland: morphological evidence for influence on opioide peptidic synthesizing cells. Cell Tissue Res. 1997 Jun;288(3):471-83.

Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. Physiol Rev. 1998 Jul;78(3):687-721.

Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G. Neuroendocrine regulation of eating behavior. J Endocrinol Invest. 2002 Nov;25(10):836-54.

Vettor R, Fabris R, Pagano C, Federspil G. Neuroendocrine regulation of feeding. Minerva Endocrinol. 2003 Jun;28(2):155-67.

Vollrath L. The Pineal Organ. Berlin: Springer; 1981. p. 83-89.

Wada T, Sasaoka T, Ishiki M, Hori H, Haruta T, Ishihara H, et al. Role of the Src homology 2 (SH2) domain and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatases (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. Endocrinology. 1999 Oct;140(10):4585-94.

Watve MG, Yajnik CS. Evolutionary origins of insulin resistance: a behavioral switch hypothesis. BMC Evol Biol. 2007 Apr 17;7:61.

Werther GA, Hogg A, Oldfield BJ, Mckinley MJ, Figdor R, Mendelsohn FA. Localization and characterization of IGF receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradigraphy and computerized densitometry: a distinct distribution from insulin receptors. J Neuroendocrinol. 1989 Oct 1;1(5):369-77.

White MF, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr=185,000 protein in intact cells. Nature. 1985 Nov 14-20;318(6042):183-6.

White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. Recent Prog Horm Res. 1998;53:119-38.

Whiters DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature. 1998 Feb 26;391(6670):900-4.

Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. J Biol Chem. 1992 Jul 5;267(19):13719-27.

Wilkinson M, Arendt J, Bradtke J, Ziegler D. Determination of dark-induced in pineal N-acetyltransferase activity and simultaneous radioimunoassay of melatonin in pineal, serum and pituitary tissue of the male rat. J Endocrinol. 1977 Feb;72(2):243-4.

Willians LM, Hannah LT, Hastings MH, Maywood ES. Melatonin receptors in the rat brain and pituitary. J Pineal Res. 1995 Nov;19(4):173-7.

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

Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. Nature. 2004 Dec 23;432(7020):1027-32.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesityand diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. Science. 2001 Aug 31;293(5535):1673-7.

Zheng X, Yang Z, Yue Z, Alvarez JD, Sehal A. FOXO and insulin signaling regulate sensitivity of the circadian clock to oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 2;104(40):15899-904.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Melatonin supplementation to obese and aged rats induces up-regulation of the insulin intracellular signaling pathway in the hypothalamus preceding weight loss

Ricardo Zanuto¹, Aparecida Emiko Hirata², Anderson C Marçal¹, Reury F. P. Bacurau³, Luciene M Ribeiro¹, João P G Camporez¹, Mario A S Filho¹, Luciana C Caperuto², José Cipolla Neto¹, Carla R O Carvalho¹

¹Departmento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP); ²Departmento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); ³Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo (USP); Brasil.

Correspondence should be addressed to: Carla R. O. Carvalho, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, Rua Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 121, ICB1, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, Brazil, 055096-900, Fax: +55 11 30917258, e-mail: croc@icb.usp.br

RUNNING TITLE: Melatonin improves insulin action in aged rats **KEY WORDS:** Melatonin, Insulin, Hypothalamus, Aging, Obese

Abbreviations used are: Akt, protein kinase B, homologous to v-AKt; IRS, insulin receptor substrate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PI 3-kinase, phosphoinositide 3-kinase.

Abstract

Melatonin administration can counterbalance several changes promoted in the organism by the aging process. Increasing number of evidences suggests the existence of an interaction between insulin and melatonin and, thus, it is possible that melatonin could bring benefits to the aging-related insulin resistance. In the present study, we supplemented aged Wistar rats with melatonin at night for 8 and 12 weeks and analyzed the initial steps of insulin action in hypothalami of the animals by immunoprecipitation and immunobloting with specific antibodies. Following the treatment, in the 8 weeks protocol, insulin sensitivity increased preceding weight loss, however, with the prolongation of treatment for 12 weeks was also reduced of total body weight and visceral fat. Those modifications were accompanied by the increasing phosphorylation of insulin signaling downstream compounds associated with feeding behavior (i.e. IRS-2 and Akt serine and threonine). Associated to this, animals treated with melatonin present a reduction in food intake and in feed efficiency.

In summary, as far as we know, this is the first study to demonstrate the positive effects of melatonin on insulin sensitivity in hypothalamus before the loss of weight and adiposity and that the suppressive effects of melatonin upon body weight and food intake in aged rats are associated, at least in part, by the improvement of insulin signaling in the central nervous system.

Introduction

Insulin receptors (IR) are expressed not only in the classic insulin-sensitive tissues such as liver, adipose tissue and skeletal muscle, but also in classic insulin-insensitive tissue, such as neuronal tissue of the central nervous system (CNS). There, IR display distinct patterns of expression in the hypothalamus, pituitary and olfactory bulb [1, 2]. In relation to hypothalamus, there are consistent evidences demonstrating that insulin acts in this organ to suppress feeding behavior [3, 4]. Insulin receptor is a protein tyrosine kinase that catalyzes the phosphorylation of several intracellular substrates, including the insulin receptor substrate (IRS) proteins and the src-homology- $2/\alpha$ collagen related protein, Shc [5]. The IRS proteins, once phosphorylated at distinct tyrosine residues, act as docking sites for proteins containing Src homology 2 (SH2) domains, including phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K) and the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase, SHP-2 [5]. A downstream substrate of PI(3)K activity is the serine/threonine protein kinase B or AKT [6, 7]. Upon insulin receptor tyrosine kinase activation and autophosphorylation, there is also recruitment of Shc protein and the adaptor molecule, Grb2, leading to activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (P42/44 MAP kinase, ERK) pathway [8, 9].

The neuronal-specific knockout mice, NIRKO mice, clearly demonstrated the action of insulin in CNS regulating energy balance [4]. On the other hand, Wistar rats show increased adiposity and insulin resistance with aging, similar to other mammals such as humans, dogs, and others rodents. In aged rats there are modifications of the insulin signaling pathway in liver, muscle [10, 11], and in CNS [12]

Besides insulin there are other hormones that changes with aging. Among them, melatonin has its functions affected by aging due to a gradual reduction in its biosynthesis in the pineal gland [13, 14]. On the other hand, melatonin supplementation to aging rats is able to counteract some aging-related changes, as metabolic and behavioral [15, 16]. Additionally, there is growing number of studies showing interaction between insulin and melatonin intracellular pathways. We previously suggested the existence of a cross-talk between insulin

and melatonin due to increased insulin receptor tyrosine kinase activity induced by melatonin infusion in hypothalamus of intact rats [17]. Garcia and coworkers [12] demonstrated that insulin reinforces the norepinephrine-modulated melatonin synthesis in cultured pineal gland from rats. In this regard, we hypothesized that the morphological and metabolic effects of melatonin supplementation in aged rats are linked, at least in part, to the regulation of insulin intracellular signaling pathway in hypothalamus of rats.

Materials and methods

Materials

The reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis (SDSpAGE), immunoprecipitacion and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA). Human recombinant insulin (Iolin R) was from Biobras (MG, Brazil). Anti-IR, anti-IRS-1 and anti-IRS-2, were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA). Anti-PI 3-kinase was from Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Place, NY). Antiphosphotirosine, Antiphospho-Akt (Ser⁴⁷³), Antiphospho-Akt (Thr³⁰⁸), antiphospho-JNK and antiphospho-ERK (Thr²⁰²/Try²⁰⁴) antibodies were from Cell Signaling (Beverly, MA). The enhanced chemiluminescence reagent kit, ECL, and protein A Sepharose 6MB were from Amersham-Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK).

Animals

Male Wistar rats (150-200 g, 8 weeks-old) were housed in a temperature controlled room at 25±2 °C with access to standard rodent chow and water *ad libitum* (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A) under photoperiod regime of 12h:12-hr light-dark cycle (lights on at 6:00 am). The animals were maintained in agreement with the guidelines of Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) and all experimental procedures were approved by Ethical Committee on Animal Experimentation of Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (84/98).

Melatonin supplementation protocol

Ten months later, at 12 months of age, the animals were weighted, housed one per cage and randomly allocated in two groups (control and melatonin). Following a modification of the protocol from Wolden-Hanson and coworkers [18], animals in the melatonin group received tap water containing 0.01% ethanol with 0.4 μ g/ml of melatonin; bottles containing melatonin were covered with aluminum foil to avoid degradation. The solution was supplied 30 minutes before lights off and was removed one hour after lights on. Animals in the control

group received tap water with 0.01% of ethanol in the same time schedule that experimental group received melatonin. After 8 and 12 weeks of treatment, the rats were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/kg, i.p) and used 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes.

Immunoblotting analysis

The abdominal cavity of anesthetized rats was opened, the cava vein exposed, and 0.5 ml of saline (0.09% NaCl) with or without 6 μg insulin was injected as a bolus infusion. Ten minutes after the injection, hypothalamus was removed. The extraction of the hypothalamus was performed at maximal insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptors and its substrates, IRS-1 and IRS-2 (DATA NOT SHOWN). The tissues fragments were immediately homogenized in ice-cold extraction buffer containing 100 mM Tris (pH 7.4), 10 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.01 mg aprotinin/ml. Tissues extracts from rats were centrifuged at 30,000 g, 4 °C, for 15 min to remove insoluble material; the supernatant was then used for the assay. Protein determination was performed by the Bradford [19] by binding method using the Bio-Rad reagent and bovine serum albumin (BSA) as the standard. Two or three mg protein from the supernatant were used for immunoprecipitation with anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, protein A-Sepharose 6MB before Laemmli sample buffer treatment and SDS-PAGE, as described elsewhere [11]. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant). To reduce non-specific protein binding to the nitrocellulose, the filter was preincubated overnight at 4°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated overnight at 22 °C with antibodies against phosphotyrosine, the p85 subunit of PI 3-kinase, the p95 subunit of IR, IRS-1, IRS-2, pAKt, and pERK diluted in blocking buffer with 3% non-fat dry milk followed by washing for 30 min in blocking buffer without milk. To visualize the autoradiogram, commercial enhanced chemiluminescence reagents exposed to photographic film were used. Quantitative analysis of the blots was performed using Scion Image software (Frederick, MD, USA).

Intravenous insulin tolerance test (iviTT)

Regular insulin (0.75 U/kg body weight) was intravenously injected (penis vein). Blood glucose levels were measured on samples obtained from the tail vein using a glucometer (Accu-check Advantage II Control, Roche Diagnostics) at 0, 4, 8, 12 and 16 min after insulin injection. The corresponding 4–16 min values were used to calculate the glucose disappearance constant (k_{ITT}) according to [

Statistical Analysis

Analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. The results were analyzed by One-Way ANOVA. When differences among treatments were detected by ANOVA, the Bonferroni's test was used. The level of significance of p<0.05 was chosen for all statistical comparisons. The samples from positive controls were assumed as 100% due the correspondence with the maximal phosphorylation value induced by acute bolus of insulin. Data are presented as mean \pm SEM.

Results

Animal characteristics

Table 1 shows the effect of chronic melatonin in both protocols of treatment on body weight, food and water intake and insulin sensibility. The melatonin treated rats presented a 2% reduction in body weight against an increase of nearly 4% of control animals through the 12 weeks period of treatment, but this change was not detected in the protocol of 8 weeks. Difference in insulin sensibility was detected by glucose disappearance constant at the end of treatment, where melatonin supplementation was able to increase significantly in both protocols (8 weeks. Cont = 2,84 ± 0,6 %/min n=6 vs Mel = 5,96 ± 0,2 %/min, n=6 ; p<0,05) and (12 weeks. Cont = 3,39 ± 0,4 %/min, n=6 vs Mel = 7,11± 0,17 %/min, n=6 ; p<0,05), while difference in the body weight was detected only 10th week of starts protocol, so melatonin treatment also reduced intra-abdominal fat tissue (Cont=3.94±0.17 g; Mel = 2.58±0.18 g, p<0.05), and food intake (Cont=23±0.6 g/day; Mel = 19.0±0.3 g/day; p<0.05) in 12 weeks protocol.

Insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 levels and phosphorylation degree, interaction between IRS-1 and IRS-2 with PI3-K, interaction between IRS-1 e IRS-2 with pERK 1 e 2, and phosphorylation of JNK in hypothalamus homogenates.

Figure 1 presents the result of melatonin supplementation in both protocols group in the protein level of the IR, IRS-1, and IRS-2 in the hypothalamus of aged obese rats. There was no change in the IR protein level as detected by immunoblotting with the specific antibody against de B subunit of this protein (8 weeks. Cont = $100 \pm 17\%$, n=4; Mel = $101 \pm$ 3%) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 19\%$; Mel = $119 \pm 4\%$) (Figure 1A). Similarly to that detected for IR protein level, there was no modification in the protein level of IRS-1 and IRS-2 (Fig 1 B and C).

The hypothalami that were previously immunoprecipitated with anti-IR antibodies and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibody showed a similar pattern of insulin induced phosphorylation in both treatments (Fig 2A). Despite the similar insulin induced IR tyrosine phosphorylation, the degree of insulin induced tyrosine phosphorylation IRS-1 and IRS-2 in the hypothalamus of melatonin supplemented rats were higher than the control animals. In the 20 month-old rats, the IRS-1 tyrosine phosphorylation is similar to that at basal condition; however, the supplementation with melatonin induced a two-fold increase in the degree of phosphorylation of the IRS-1 after acute insulin infusion similarly in both protocols (8 weeks. Cont = $100 \pm 27\%$, n=4 vs Mel = $285 \pm 16\%$, n=4 ; p<0,05); (12 weeks. Cont = $100 \pm 15\%$, n=4 vs Mel = $233 \pm 41\%$, n=4 ; p<0,05); (Fig 2B). The insulin induced IRS-2 tyrosine phosphorylation had a similar pattern, of that detected for IRS-1 (8 weeks. Cont = $100 \pm 4\%$, n=4 vs Mel = $169 \pm 3\%$, n=4 ; p<0,05); (12 weeks. Cont = $100 \pm 28\%$, n=4 vs Mel = $207 \pm 25\%$, n=4 ; p<0,05) (Fig 2D).

The association of IRS-1 and IRS-2 with the 85 kDa subunit of the PI3K was analyzed in the immunoprecipitated samples against each one of the IRS proteins. There was no increase in the interaction between IRS 1 and 2 with PI3-K after acute insulin stimulus in both protocols (Figures 2C and E).

The downstream pathways were assessed by specific phosphor-antibodies in the same hypothalami samples. Phosphorylation of PKB/Akt serine (Fig 3A) and ERK1 and ERK2 (Fig 3C) was evaluated in both protocols, however the phosphorylation of PKB/Akt threonine (Fig 3B) and JNK (Fig 3D) was performed in only 12 weeks treatment. In basal state and after acute insulin infusion let to a greater Akt phosphorylation in the hypothalamus of rats that were supplemented with melatonin for 8 and 12 weeks, so into basal state: (8 weeks. Cont = $74 \pm 13\%$, n=4 vs Mel = $130 \pm 23\%$, n=4 ; p<0,05); (12 weeks. Cont = $69 \pm 14\%$, n=4 vs Mel = $110 \pm 12\%$, n=4 ; p<0,05) and after acute insulin infusion: (8 weeks. Cont = $100 \pm 11\%$, n=4 vs Mel = $179 \pm$ 21%, n=4 ; p<0,05) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 11\%$, n=5 vs Mel = $134 \pm 8\%$, n=5 ; p<0,05) (Fig 3A). Figure 3B shows the Akt threonine phosphorylation after acute insulin infusion (Cont = $100 \pm 6\%$, n=4 vs Mel = $130 \pm 10\%$; p<0.05). The acute insulin infuse was effective to higher JNK levels (Fig 3D: Cont = $100 \pm 10\%$, n=5 vs Mel = $140 \pm 13\%$, n=5 ; p<0.05). The ERK1 and ERK2 phosphorylation were similar between control and melatonin supplemented rats in both protocols.

Discussion

The insulin effectiveness in mediate energetic metabolism and food intake [4] decreases though aging process [20, 21, 22]. Despite the mechanisms underlying melatonin action's are poorly understood at the present, this hormone can negate some changes promoted by aging [23, 24]. In this sense, increasing evidences permit hypothesize that melatonin can improve insulin effectiveness in the CNS of aged animals [12, 25]. Thus, in the present study, we supplemented aged Wistar rats with melatonin at night for 8 and 12 weeks. Following the treatment, we analyzed the initial steps of insulin action in hypothalami of the animals by immunoprecipitation and immunobloting with specific antibodies.

As expected, our data show that melatonin supplementation promoted a reduction in total body weight and visceral fat in the protocol of 12 weeks, and it was accompanied by the improvement in insulin sensitivity and an increased phosphorylation of downstream elements of insulin cascade in hypothalamus. However, the simple fact that chronic treatment with melatonin for 12 weeks has been able to reduce adiposity, was to be expected that the insulin sensitivity increase, since the weight loss by itself is capable of this effort [44]. Thus, the present study sought to achieve the chronic supplementation for 8 weeks, because this stage has not significant differences in body weight and adiposity of animals, minimizing the effects of weight loss directly on insulin sensitivity.

The results demonstrated that even before the loss of weight and adiposity, the 8 week protocol promoted a similar significant improvement in insulin sensitivity when compared with 12 weeks protocol; thus, this improvement in sensitivity of the hormone was from the central action of melatonin in this tissue in the 8 weeks protocol. In concordance

with this statement, melatonin administration to aged rats promoted an increased phosphorylation of IRS-1 and 2 and Akt after acute insulin stimulus in both protocols. However, the treatment was accompanied by a reduction in food intake only in 12 weeks treatment. We previously suggested the existence of a cross-talk between melatonin and insulin in the hypothalamus in young animals [17] and believe that this communication is mechanistically involved in the increase of insulin sensitivity in spite of the absence of body weight reduction. On the other hand, the data of the present study confirm that these hormones also interact in older rats and additionally, suggest at least one prominent physiological role for this hormonal interaction; reduce central insulin resistance.

It is also interesting to note that the values of glucose disappearance constant observed in older animals treated with melatonin were similar to values observed in young rats [46]. This is in accordance with the results of Rassmussen and coworkers (1999) that demonstrated that melatonin supplementation reduces insulin plasmatic concentrations of middle-aged rats to values observed in young animals. Additionally, our data suggest that melatonin supplementation is more efficient that hypocaloric diet to reduce insulin resistance since the effect is reduced as the animals become older [22].

The improvement of insulin signal transduction by melatonin and the consequent reduction in food intake observed in the 12 weeks protocol is in concordance with the anorexic effect of insulin in central nervous system [26] and with the fact that the disruption of insulin signaling pathways is implicated with hyperphagia and/or increased body weight as can be seen in mice with neuronal disruption of insulin receptor [4] and IRS-2 knockouts [27]. This anorexigenic effect of insulin could be mediated by neuropeptides because the intracerebroventricular insulin injection promoted anorexia associated to upregulated mRNA levels of proopiomelanocortin (POMC) [28]. Accordingly, IRS-2 knockout mice presented a reduction in pro-opiomielanocortin (POMC) mRNA level in arcuate nucleus [27] and the reduced expression of hypothalamic POMC is associated with obesity in ageing [29]. Recently, Parton and coworkers [30] demonstrated that glucose sensing by POMC neuron (important for the control of feeding behavior, energy storage and expenditure) is impaired in

obese mice and that the mechanism underlying such impairment involves uncopling protein 2 (UCP2). Interesting, IRS-2 knockout mice present increased levels of UCP-2 in adipose tissue [27]. Moreover, the overexpression of this neuropeptide ameliorates age-related obesity in rats with an initial period of food reduction during the study [31]. Together, these evidences suggest that insulin could be acting through POMC in the hypothalamus to modulate food intake. However, melatonin administration was associated to the down regulation of POMC mRNA levels in aged rats [32]. This issue deserves additional investigation.

Because the reduction of the adipose tissue mass can only result from a chronic state of negative fat balance [33], the reduction in food intake promoted by melatonin also can explain another finding of the present study, the reduction in visceral fat. It is important to note that some previous study in which melatonin treatment promoted a reduction in visceral fat did not observe reduction in food intake [15, 18]. Angers and coworkers [34] suggested that the differences on the melatonin effect upon food intake could be explained by the timing of melatonin administration. In fact, in the present study we administrated melatonin in a different time schedule from the previously mentioned studies since it was concentrated on the dark period only. Another explanation could be related to different rat strains utilized. In Sprague-Dawley rats the increase in body weight and total fat content occurs with a concomitant increase in insulin concentration. Otherwise, Wistar rats gain weight as they become old but their fasting insulin concentration remains at the values of 3 months-age-old animals [20]. Finally, in the present study the animals were maintained one per cage while in the previous studies the rats were maintained in group. In a similar way, the study of Hussein and coworkers [35] in which the animals were maintained in individual cages, reported reduction in food intake due melatonin treatment. This strategy could permit us perceive subtle differences in food intake.

However, the reduction in food intake could not explain all fat reduction. Melatonin supplementation also decreased feed efficiency in aged rats, therefore, promoting another way to reduce visceral fat. Wolden-Hason and coworkers [18] also observed that melatonin reduces feed efficiency in middle-aged rats. Another potential explanation for the reduction of visceral fat is the increase in the spontaneous physical activity. Aging is accompanied of a decreased muscular activity [36] and melatonin was able to increase spontaneous physical activity in 19% in middle-aged Sprague Dawley rats with a concomitant reduction of 20% of visceral fat [18]. Melatonin also is able to increase behavioral responsiveness in a test of response to novelty in middle-aged rats [16]. However, we did not evaluate the energy expenditure by spontaneous activity in our animals.

In summary, as far as we know, this is the first study to demonstrate the positive effects of melatonin on insulin sensitivity in hypothalamus before the loss of weight and adiposity and that the suppressive effects of melatonin upon body weight and food intake in aged rats are associated, at least in part, by the improvement of insulin signaling.

Acknowledgments

We also thank Mrs. Julieta Helena Scialfa for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- BASKIN DG, SIPOLIS AJ, SCHWARTZ MW, WHILE MF. Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine. Regulatory Peptides 1993; 48:257-266.
- FOLI F, BONFATI L, RENARD E, KAHN CR, MERIGHI A. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system. J Neuroscience; 1994; 14:6412-6422.
- WOODS SC, PORTE DJR, BOBBIONI E et al. Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight. American Journal of Clinical Nutrition 1985; 42: 1063-1071(3).
- BRÜNING JC, GAUTAM D, BUCKS DJ et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science 2000; 289:2122-2125(4).
- SALTIEL AR, KAHN CR. INSULIN SIGNALING AND THE REGULATION OF GLUCOSE AND LIPID METABOLISM. Nature 2001; 414:799-806.
- COFFER PJ, JIN J, WOODGETT JR. Protein kinase B (c-AKT): a multifunctional mediator of phosphatidilinositol 3-kinase activation. Biochem J 1998; 335:1-13.
- LAWLOR MA, ALESSI DR. PKB/AKt: a key regulatr mediator of cell proliferation, survival and insulin response? J Cell Sci 2001; 114:2903-2910.
- SKOLNIK EY, BATZER A, LI N, LEE CH, LOWENSTEIN G, MOHAMMADI M, MARGOLIS B, SCHLESSINGER J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. Science 1993; 260:1953-1955.
- DE FEA K, ROTH PA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 1997; 272:31400-31406.

- CARVALHO CRO, BRENELLI SL, SILVA AC et al. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. Endocrinology 1996; 137:151-159(14).
- 11. CARVALHO CR, MAEDA L, BRENELLI SL, SAAD MJ. Tissue-specific regulation of IRS-2/PI3-kinase association in aged rats. Biol Chem 2000; 381:75-8.
- GARCIA RAP, AFECHE SC, SCIALFA JH et al. Insulin modulates norepinephrinemediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. Life Sciences 2008; 82:108-114(12).
- PANG SF, TSANG CW, HONG GX et al. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth and aging. J Pineal Res 1990; 8:179-192(19).
- REITER RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. BioEssays 1992; 14169-14175(20).
- 15. RASMUSSEN DD, BOLDT BM, WILKINSON CW et al. Daily melatonin administration at middle ages suppresses male visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. Endocrinology 1999; **40**:1009-1012(9).
- RASMUSSEN DD, MITTON DR, LARSEN SA et al. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavior responses. J Pineal Res 2001; 31:89-94(10).
- ANHÊ GF, CAPERUTO LC, PEREIRA-DA-SILVA M et al. *In vivo* activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. Journal of Neurochemistry 2004; 90:559-566(11).
- 18. WOLDEN-HANSON T, MITTON DR, MCCANTS RL et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal

adiposity and plasma and leptin and insulin independent of food intake and total body fat. Endocrinology 2000; **141:**487-497(13).

- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976; 72:248-254(18).
- 20. ESCRIVA F, AGOTE M, RUBIO E et al. *In vivo* Insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. Endocrinology 1997; **138**:49-54(8).
- ESCRIVA F, GAVETE ML, FERMIN Y et al. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. J Endrinol 2007; 194:131-141.
- GARCÍA-SAN FRUTOS M, FERNANDEZ-AGULHO T, DE SOLIS AJ et al. Impaired central insulin response in aged wistar rats: role of adiposity. Endocrinology 2007; 148:5238-5247(7).
- 23. GRAD BR, ROZENCWAIG R. The role of melatonin in mediating seasonal emergetic and immunological adaptations Brain Res Bull 1993; 44:423-430(21)
- REITER RJ, GUERRERO JM, GARCIA JJ et al. Reactive oxygen intermediares, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. Ann Ny Acad Sci 1998;
 854:410-424(22).
- ALONSO-VALE MIC, ANDREOTTI S, PERES SB et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 288:E805-E812(23).

- 26. NISWENDER KD, MORRISON CD, CLEGG DJ et al. Insulin Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the Hypothalamic Arcuate Nucleus. A Key Mediator of Insulin-Induced Anorexia. Diabetes 2003; 52:227-231(17).
- MASAKI T, CHIBA S, NAGUCHI H et al. Obesity in insulin receptor substrate-2 deficient mice: disrupted control of arcuate nucleus neuropeptides. Obesity Research 2004; 12:878-885(24).
- 28. HONDA K, KAMISOYAMA H, SANEYASU T et al. Central administration of insulin suppress food intake in chicks. Neuroscience Letters 2007; 423: 153-157(25).
- MOOBS CV, BRAY GA, ATKINSON RL et al. Neuroendocrine and pharmacological manipulations to acess how calories increases life span. J Gerontol A Biol Sci Med 2001; 56:34-44(26).
- PARTON LE, YE CP, COPPARI R et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. Nature 2007; 13:228-233(27).
- LI G, ZHANG Y, WILSEY JT et al. Hypothalamic pro-opiomelanocortin gene delivery ameliorates obesity and glucose intolerance in aged rats. Diabetologia 2005; 48:2376-2385(28).
- 32. RASMUSSEN D, MARCK BT, BOLDT BM et al. Suppression of hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) gene expression by daily melatonin supplementation in aging rats. J Pineal Res 2003; 34:127-133.
- SCHUTZ Y. Dietary fat, lipogenesis and energy balance. Physiology and Behavior 2004; 83:557-564(29).
- 34. ANGERS K, HADDAD N, SELMAOUI B et al. Effect of melatonin on total food intake and macronutrient choice in rats. Physiology and Behavior 2003; 80:9-18(30).

- 35. HUSSEIN MR, AHMED OG, HASSAN AF et al. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. In J Exp Path 2007; **88**:19-29(31).
- ALTUN M, BERGMAN E, EDSTRÖM E et al. Behavioral impairments of the aging rat. Physiology & Behavior 2007; 92:911-923(32).
- 37. PAPA S, BUBICI C, ZAZZERONI F et al. The NF-κB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. Cell Death and Differentiation 2006; 13:712-729(33).
- MILLER BS, SHANKAVARAM UT, HORNEY MJ et al. Activation of cJun NH₂terminal Kinase/stress-activated protein kinase by insulin. Biochemistry 1996;
 35:8769-8775(34).
- 39. MORISCO C, MARRONE C, TRIMARCO V et al. Insulin resistance affects the cytoprotective effect of insulin in cardiomyocytes through an impairment of MAPK phosphatase-1 expression. Cardiovascular Research 2007; **76:**453-464(35).
- 40. KREIER F, KALSBEEK A, SAUERWEIN HP et al. "Diabetes of eldery" and type 2 diabetes in younger patients: possible role of the biological clock. Gerontology 2007;
 42:22-27(36).
- CHANSARD M, MOLYNEUX P, NOMURA K et al. c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 modulates the period of mammalian circadian rhythms. Neuroscience 2007; 145:812-823(37).
- BONDY SC & SHARMAN EH. Melatonin and the aging brain. Neurochemistry International 2007; 50:571-580(38).

- NEWBERN J, TAYLOR A, ROBINSON M et al. c-Jun N-terminal kinase signaling regulates events associated with both health and degeneration in motoneurons. Neuroscience 2007; 147:680-692(39).
- 44. MCLAUGHLIN T, SCHWEITZER P, CARTER S, YEN CG, LAMENDOLA C, ABBASI F, REAVEN G. Persistence of improvement in insulin sensitivity following a dietary weight loss programme. Diabetes Obes Metab 2008; 10:1186-94(12).
- 45. BONORA E, MOGHETTI P, ZANCANARO C, CIGOLINI M, QUERENA M, CACCIATORI V, CORGNATTI A, MUGGEO M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance test with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 68, 374-378.
- 46. FURUYA DT, BINSACK R, ONISHI ME, SERAPHIM PM, MACHADO UF. Low ethanol consumption induces enhancement of insulin sensitivity in liver of normal rats. Life Sciences 77, 1813-1824.

Table 1 Characteristics of male rats after 8 and 12 weeks with melatonin treatment.Body weight, adipose tissue, food and water intake. The results are expressed asmedium \pm SEM and the * p<0.05. The numbers of animals are in parentheses.</td>

	8 weeks		12 weeks	
	Control (n)	Melatonin (n)	Control (n)	Melatonin (n)
Initial Weight (g)	387 ± 15 (14)	383 ± 18 (14)	394 ± 11 (21)	391 ± 16 (21)
Final Weight (g)	405 ± 10 (14)	388 ± 11 (14)	424 ± 17 (21)	383 ± 9 (21) *
Body weight increase during the experiment (%)	+4	+1	+7	-2 *
Visceral adipose tissue (g)	3,13 ± 0,78 (7)	2,76 ± 0,65 (7)	3,94 ± 0,17 (9)	2,58 ± 0,18 (9) *
Food intake (g/day)	20 ± 0,8 (7)	19 ± 0,8 (7)	23 ± 1,2 (18)	19±0,3 (18) *
Daily water intake (ml/day)	11 ± 1,4 (7)	10,1 ± 0,6 (7)	10 ± 0,5 (18)	9,1 ± 0,7 (18)
Nocturnal water intake (ml/day)	28 ± 1 (7)	30 ± 1,5 (7)	31 ± 1 (18)	27 ± 2 (18)
Glucose disappearance constant (%/min)	2,84 ± 0,6 (6)	5,96 ± 0,2 (6) *	3,39 ± 0,40 (6)	7,11±0,17(6)*

Figure Legend:

Figure 1. Effect of acute insulin stimulus on protein expression of insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 from control and melatonin chronically treated rats for 8 and 12 weeks. Hypothalami homogenates from control and treated melatonin rats were immunoblotting with anti-IR (A), or anti-IRS-1 (B), or anti-IRS-2 (C) antibodies. The protein level of control (open bar) and melatonin treated (dark bar) were evaluated using image analyzer and are show in the bar graph as arbitrary units (%). Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph.

Figure 2. Effect of acute insulin stimulus on tyrosine phosphorylation of insulin receptor, IRS-1, and IRS-2, and PI 3-kinase association with IRS-1 and IRS-2 from control and melatonin chronically treated rats for 8 and 12 weeks. Hypothalami homogenates from control and treated melatonin rats were immunoprecipitated with anti-IR (A), or anti IRS-1 (B), or anti IRS-2 (D) followed by immunoblotting with antiphosphoryrosine (A,B,D) or anti-PI 3-kinase (C, E) antibodies. The degree of basal (-) and acutely insulin-induced (+) tyrosine phosphorylation or association of the IRS-1 and IRS-2 with PI 3-kinase were analyzed. Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct letters signify statistical significance, P<0.05.

Figure 3. Effect of acute insulin stimulus upon insulin signaling downstream components in hypothalamus from control and melatonin chronically treated rats. Hypothalami homogenates from control and treated melatonin rats were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting with antiphospho-AKT-Ser⁴⁷³, antiphospho-AKT-Thr³⁰⁸; antiphospho-ERK-1/2; anti-pJNK antibody, as described in the Methods section. Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct letters signify statistical significance, P<0.05.



Figure 1



Figure 2


Figure 3

APÊNDICE B

Regulation of insulin signaling transduction pathways in liver and skeletal muscle tissues from adult rats: effect of aging and melatonin supplementation

Ricardo Zanuto¹, Aparecida Emiko Hirata², Anderson C Marçal¹, Reury F. P. Bacurau³, Luciene M Ribeiro¹, João P G Camporez¹, Mario A S Filho¹, Luciana C Caperuto², José Cipolla Neto¹, Carla R O Carvalho¹

¹Departmento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP); ²Departmento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); ³Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo (USP); Brasil.

Correspondence should be addressed to: Carla R. O. Carvalho, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, Rua Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 121, ICB1, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, Brazil, 055096-900, Fax: +55 11 30917258, e-mail: croc@icb.usp.br

RUNNING TITLE: Melatonin improves insulin action in aged rats **KEY WORDS:** Melatonin, Insulin, Liver, Skeletal, Muscle, Aging, Obese

Abbreviations used are: Akt, protein kinase B, homologous to v-AKt; IRS, insulin receptor substrate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PI 3-kinase, phosphoinositide 3-kinase.

Abstract

The increased adiposity that accompanies aging process reduces insulin sensitivity in several tissues like liver and skeletal muscle. Because it has been demonstrated that melatonin supplementation negates some events of aging and that this hormone is able to cross-talk with insulin, in the present study we supplemented aged Wistar rats with melatonin at night for 8 and 12 weeks to investigate the initial steps of insulin signaling pathway in liver and skeletal muscle. Our results demonstrated that melatonin supplementation did not affect the levels of insulin receptors or its substrates in both tissues. However, the basal phosphorylation of these proteins was increased by the treatment; even before body weight or adipose tissue reductions were observed. In the effort to identify changes in the phosphorylation level of downstream proteins, we observed that melatonin has a tissue-specific action since the insulin cascade was differently stimulated in liver and skeletal muscle. In liver, both IRS-1/2 and the interaction of PI3-K as well as the augment in the phosphorylation levels of SHP2, AKT/PKB, ERK-1/2, demonstrated that glucose and lipid metabolism was affected by the treatment. Otherwise, in skeletal muscle, only IRS-2 and its interaction with PI3-K was affected by melatonin supplementation. This, in addition the others downstream components which phosphorylation were affected by melatonin, demonstrated that in skeletal muscle, insulin's mitogenic activity was influenced rather that glucose uptake. In summary, as far as we know, this is the first study to demonstrate that the suppressive effects of melatonin against insulin resistance in aged rats are promoted, at least in part, by the improvement of insulin signaling pathways. Besides, the interaction between melatonin and insulin presents a tissue-specific pattern.

Introduction

The hepatic tissue is essential to energetic homeostasis as it exerts functions such as glucose storage, synthesis de novo of lipids from carbohydrate and glucose production through glycogenesis during periods of fasting (Gribble, 2005). Considering its importance, the homeostasis of nutrients is regulated by the complex interaction among insulin, contra regulatory hormones and central nervous system (Wolfrum et al. 2004; Montminy & Koo, 2004; Pocai, 2005).

Particularly in relation to insulin, the increased adiposity observed in aged mammals, including humans; can changes the sensitivity of this hormone by its effects on hepatic tissue (Pagliassoti and Horton, 1994). In type 2 diabetic subjects, for example, the excess visceral fat and fat in liver are directly associated with the augment in glucose hepatic production and insulin resistance (Gastaldelli et al. 2007). Besides studies had demonstrated that aging process did not change basal levels or phosphorylation of IR (Kono et al. 1990) neither the ability of the receptor recognize insulin (Torlinska et al. 2000), data from our laboratory demonstrated that the initial phases of insulin signaling cascade are altered in liver from aged Wistar rats (Carvalho et al. 1996).

The greater adiposity of aged individuals also can promote insulin resistance by means of its effects on skeletal muscle because this tissue is the main site for insulin-dependent glucose uptake. However, in opposition to liver, skeletal muscle is not uniformly affected by aging as insulin resistance in more intense in some muscles than others (Escrivá et al. 1997); in gastrocnemius one of most affected muscles, glycogen synthesis in response to insulin stimulus is marked reduced (Goodman et al. 1983).

Glucose and lipid metabolism is also regulated by melatonin as could be observed by pinealectomy, a procedure that results in increased the plasma levels of free cholesterol and hyperinsulinemia and fat accumulation in liver (Nishida et al. 2003). Interestingly, melatonin biosynthesis by pineal gland is reduced in aged organisms and this attracted attention to the possibility of suppresses aging-related through melatonin administration (Grad & Rozencwaig, changes 1993). Notwithstanding, the mechanisms underlying melatonin action are not completely clear, these data suggests that an interaction between melatonin and insulin could be involved. Reinforcing this speculation with previously suggested the existence of a cross-talk between insulin and melatonin because the second could phosphorylate insulin receptor in rat hypothalamus (Anhê et al. 2004). So, we hypothesized that the morphological and metabolic effects of melatonin supplementation in aged rats are linked to the regulation of insulin signaling pathways. Because intermediates from insulin signaling pathways play their role in a tissue-specific manner (Carvalho et al. 1996) we evaluated the effects of melatonin supplementation in liver and gastrocnemius from aged rats.

Materials and methods

Materials

The reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis (SDSpAGE), immunoprecipitacion and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA). Human recombinant insulin (Iolin R) was from Biobras (MG, Brazil). Anti-IR, anti-IRS-1 and anti-IRS-2, were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA). Anti-PI 3-kinase was from Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Place, NY). Anti phosphotyrosine, Anti phospho-Akt (Ser⁴⁷³), Anti phospho-Akt (Thr³⁰⁸), anti phospho-JNK and anti phospho-ERK (Thr²⁰²/Try²⁰⁴) antibodies were from Cell Signaling (Beverly, MA). The enhanced chemiluminescence reagent kit, ECL, and protein A Sepharose 6MB were from Amersham-Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK).

Animals

Male Wistar rats (150-200 g, 8 weeks-old) were housed in a temperature controlled room at 25±2 °C with access to standard rodent chow and water *ad libitum* (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A) under photoperiod regime of 12h:12-hr light-dark cycle (lights on at 6:00 am). The animals were maintained in agreement with the guidelines of Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) and all experimental procedures were approved by Ethical Committee on Animal Experimentation of Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (84/98).

Melatonin supplementation protocol

Ten months later, at 12 months of age, the animals were weighted, housed one per cage and randomly allocated in two groups (control and melatonin). Following a modification of the protocol from Wolden-Hanson and coworkers (2000), animals in the melatonin group received tap water containing 0.01% ethanol with 0.4 μ g/ml of melatonin; bottles containing melatonin were covered with aluminum foil to avoid degradation. The solution was supplied

30 minutes before lights off and was removed one hour after lights on. Animals in the control group received tap water with 0.01% of ethanol in the same time schedule that experimental group received melatonin. After 8 and 12 weeks of treatment, the rats were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/kg, i.p) and used 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes.

Immunoblotting analysis

The abdominal cavity of anesthetized rats was opened, the cava vein exposed, and 0.5 ml of saline (0.09% NaCl) with or without 6 μg insulin was injected as a bolus infusion. Thirty seconds after the injection, a fragment from liver was obtained, after 90 seconds the procedure was repeated to soleus muscle after the injection. The time intervals to tissue collection were equivalent to the maximum phosphorylation of insulin receptors and its substrates, IRS-1 and IRS-2, in these tissues as previously demonstrated by several studies (Carvalho et al. 1996, 1997, Carvalheira et al. 2001, Niswender et al. 2003) and confirmed in our laboratory. The tissues were immediately homogenized in ice-cold extraction buffer containing 100 mM Tris (pH 7.4), 10 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.01 mg aprotinin/ml. Tissues extracts from rats were centrifuged at 30,000 g, 4 °C, for 15 min to remove insoluble material; the supernatant was then used for the assay. Protein determination was performed by the Bradford (1976) bye binding method using the Bio-Rad reagent and bovine serum albumin (BSA) as the standard. Two or three mg protein from the supernatant were used for immunoprecipitation with anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, protein A-Sepharose 6MB before Laemmli sample buffer treatment and SDS-PAGE, as described elsewhere (Carvalho et al. 2003, Lima et al. 2006). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant). To reduce non-specific protein binding to the nitrocellulose, the filter was pre-incubated overnight at 4°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated overnight at 22 °C with antibodies against phosphotyrosine, the p85 subunit of PI 3-kinase, the p95 subunit of IR, IRS-1, IRS-2, pAKt, and pERK diluted in blocking buffer with 3% non-fat dry milk followed by washing for 30 min in blocking buffer without milk. To visualize the autoradiogram, commercial enhanced chemiluminescence reagents exposed to photographic film were used. Quantitative analysis of the blots was performed using Scion Image software (Frederick, MD, USA).

Statistical Analysis

Analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. The results were analyzed by One-Way ANOVA. When differences among treatments were detected by ANOVA, the Bonferroni's test was used. The level of significance of p<0.05 was chosen for all statistical comparisons. The samples from positive controls were assumed as 100% due the correspondence with the maximal phosphorylation value induced by acute bolus of insulin. Data are presented as mean \pm SEM.

Results

Insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 protein levels in liver from rats treated with melatonin for 8 and 12 weeks

Immunoblottings with anti-IR, IRS-1 and IRS-2 are presented in Figure 1 and demonstrated that the protein level of this receptor and its substrates were similar between control and animals treated with melatonin for 8 and 12 weeks (Figure 1A, B and C).

Insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 phosphorylation and Interaction between IRS-1 and IRS-2 with PI3-K and SHP-2 in from rats treated with melatonin for 8 and 12 weeks

Figure 2 demonstrate that the melatonin treatment for 8 weeks promoted a marked increase in IR phosphorylation after insulin acute stimulus (08 week. Cont = $100 \pm 6\%$, n=4 vs Mela = $167 \pm 19\%$, n=5; p<0.05), however, in the group treated for 12 weeks, it was observed only a significant increase in the basal phosphorylation of IR (12 weeks. Cont = $20 \pm 2\%$, n=5 vs Mela = $33 \pm 5\%$, n=5; p<0.05) (Figure 2A). Similarly, to the protein level the acute stimulus with insulin maintained the phosphorylation of IRS-1 in both treated groups (Figure 2B). The analysis IRS-2 phosphorylation degree demonstrated a difference among the two protocols of supplementation in comparison to control group, respectively, (08 weeks. Cont = $100 \pm 6\%$, n=4 vs Mela = $143 \pm 7\%$, n=4; p<0.05) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 15\%$, n=4 vs Mela = $147 \pm 4\%$, n=4; p<0.05) (Figure 2C). In the effort to identify changes in the phosphorylation level of downstream proteins, it was not detected alterations in the association of IRS-1 and PI3-K after the acute insulin stimulus in the group treated for 8 weeks, however, it was observed a significant association between IRS-1 and PI3-K

in the group treated for 12 weeks (12 week. Cont = $100 \pm 9\%$, n=7 vs Mela = $132 \pm 2\%$, n=7; p<0.05) (Figure 2D). Notwithstanding, there was an increase in the association of IRS-2 and PI3-K after the acute insulin stimulus in both treated groups in comparison to control group, respectively, (08 weeks Cont = $100 \pm 3\%$, n=7 vs Mela = $198 \pm 16\%$, n=7; p<0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 8\%$, n=5 vs Mela = $153 \pm 2\%$, n=5; p<0.05) (Figure 2E). Additionally, it was observed an increased association between IRS-1 and the SHP2 protein in both treated groups in the basal state, respectively, (08 weeks Cont = $68 \pm 25\%$, n=3 vs Mela = $178 \pm 21\%$, n=3; p<0.05) and (12 weeks Cont = $67 \pm 3\%$, n=3 vs Mela = $102 \pm 12\%$, n=3; p<0.05), even as after acute stimulus with insulin, respectively (08 weeks Cont = $100 \pm 5\%$, n=3 vs Mela = $272 \pm 19\%$, n=3; p<0.05) e (12 weeks Cont = $100 \pm 4\%$, n=3 vs Mela = $152 \pm 2\%$, n=3; p<0.05) (Figure 2F). It was not observed differences between IRS-2 and SHP2 in both protocols (Figure 2G).

Phosphorylation levels of AKT/PKB Ser(473) and Thr(308), phosphorylation of ERKs 1 e 2, phosphorylation of JNK, and phosphorylation of p70^{s6k} in liver homogenates

To evaluate the proteins that Interact with PI3-K, four distinct experiments were performed. The results demonstrated a significant increase in the phosphorylation of AKT/PKB after the acute stimulus with insulin in both protocols of supplementation, respectively, (08 weeks Cont = $100 \pm 8\%$, n=4 vs Mela = $187 \pm 20\%$, n=4; p<0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 5\%$, n=4 vs Mela = $138 \pm 9\%$, n=4; p<0.05) (Figure 3A). In relation to AKT/PKB threonine phosphorylation it was not observed changes after 12 weeks of treatment (Figure 3B). The acute insulin stimulus it was also able to increase the phosphorylation level of ERK 1 and 2 in the protocol

of 8 weeks (08 weeks Cont = $100 \pm 2\%$, n=4 vs Mela = $161 \pm 10\%$, n=4 ; p<.05), however, these changes were not observed after 12 weeks of treatment (Figure 3C). Similarly, we performed the analysis of the phosphorylation degree of pp70^{s6k} in both protocols and once again we did not observed significant differences (Figure 3D), the same occurred in relation to the basal phosphorylation of pJNK in the 12 weeks protocol (Figure 3E).

Insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 protein levels in skeletal muscle from rats chronically treated with melatonin for 8 and 12 weeks

Figure 4 presents the results from protein level of IR, IRS-1 and 2 demonstrating that animals treated with melatonin and control animals had similar levels of these proteins (Figures 4A, B and C).

Insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 phosphorylation and Interaction between IRS-1 and IRS-2 with PI3-K in soleus muscle from rats chronically treated with melatonin for 8 and 12 weeks

The analysis of the level of phosphorylation from tyrosyl residues pertaining to IR demonstrated a significant increase induced by the acute insulin stimulus in both protocols of treatment (08 weeks Cont = $100 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $138 \pm 6\%$, n=4 ; p<0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $145 \pm 10\%$, n=4 ; p<0.05) (Figure 5A), however, we did not observe an increase in the phosphorylation degree of IRS-1 or of the association between this substrate and PI3-K with melatonin treatment (Figures 5B and D). However, the acute insulin stimulus was able to induce a significant increase in the phosphorylation level of IRS-2 at 8 weeks (08 week Cont = $100 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $164 \pm 19\%$, n=4 ; p<0.05), as well as in the association

between this substrate with PI3-K in both protocols of treatment, respectively, (08 weeks Cont = $100 \pm 12\%$, n=5 vs Mela = $162 \pm 24\%$, n=5 ; p<0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 3\%$, n=5 vs Mela = $168 \pm 18\%$, n=5 ; p<0.05) (Figure 5C and E).

Phosphorylation levels of AKT/PKB Ser(473) and Thr(308) and phosphorylation of ERKs 1 e 2 in skeletal muscle homogenates.

AKT/PKB Serine/Threonine protein has been suggested as important to the transmission of insulin signal. Our data demonstrated a significant increase in the phosphorylation degree of AKT/PKB Serine in the 8 weeks protocol after acute insulin stimulus (08 weeks Cont = $100 \pm 4\%$, n=4 vs Mela = $161 \pm 7\%$, n=4 ; p<0.05), however, it was not observed AKT/PKB in serine and threonine in the protocol of 12 weeks (Figures 6A and B). Basal and insulin stimulated phosphorylation of ERK 1 and 2 proteins were increased in both protocols (08 weeks Cont = $78 \pm 14\%$, n=4 vs Mela = $140 \pm 11\%$, n=4 ; p<0.05) and (12 weeks Cont = $96 \pm 7\%$, n=4 vs Mela = $174 \pm 10\%$, n=4 ; p<0.05); (08 weeks Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $178 \pm 21\%$, n=4 ; p<0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $178 \pm 21\%$, n=4 ; p<0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 10\%$, n=5 vs Mela = $220 \pm 19\%$, n=5 ; p<0.05) (Figure 6C).

Discussion

In the present study, we supplemented aged Wistar rats with melatonin at night for 8 and 12 weeks. After the treatment, the initial steps of insulin action in liver and skeletal muscle were evaluated by acute stimulus of insulin in vivo followed by immunopreciptation and immunobloting of the tissues with specific antibodies.

In vertebrates, melatonin is secreted from pineal gland during darkness with low/absent levels during the day. With aging melatonin biosynthesis by pineal diminishes resulting in lower levels of the hormone at night in aged animals (Pang et al. 1990, Reiter 1992). This phenomenon leads to the hypothesis that melatonin administration could counterbalance aged-induced changes (Grad & Rozencwaig, 1993) and in fact, as demonstrated later, melatonin can partially restore both the biochemical and behavioral profile of older animals (Reiter et al. 1998). Melatonin also could negate adverse effects of pathologies such as obesity and diabetes. For example, Hussein and coworkers (2007) demonstrated that melatonin was able to minimize several metabolic and morphological changes in rabbits with obesity induced by a high fat diet, while Sudnikovich and coworkers (2007) reported that melatonin may promote some benefit against the vascular complications of streptozotocin-induced diabetes. Notwithstanding, the mechanism(s) underlying these melatonin's actions are unclear. Although, some evidence suggest the involvement of a putative interaction between insulin and melatonin. Specifically, Alonso-Vale and coworkers (2005) demonstrated, in vitro, that melatonin exerts a synergistic action with insulin upon insulin-induced receptor tyrosine phosphorylation. Additionally, we proposed the existence of a cross-talk between insulin and melatonin because the later can, in vivo; phosphorylate insulin receptor in rat hypothalamus (Anhê et al. 2004). Thus, this is the first study designed to investigate the possibility that the effects of melatonin in aged rats can be justified by a functional interaction between both hormones.

Because the reduction of insulin sensitivity in several tissues (Nishimura et al. 1988, Watve & Yajnik, 2007) is the main cause of the age-related increase in insulin resistance (Popovich et al. 2005), the mechanisms underlying melatonin's actions can be better understood by the evaluation of different sites. Another fact reinforces this assertion; the effects of aging upon insulin cascade are specific to the tissue evaluated (Carvalho et al. 1996, Huang et al. 2005). In fact, the results related to insulin receptor protein level or phosphorylation state in response to melatonin treatment was the same in all tissues evaluated.

In skeletal muscle, the main tissue responsible for insulin-induced glucose disposal, aging appears did not affect muscle mass in a uniform way because insulin resistance develops more in certain muscles (Escrivá et al. 1997). In soleus, one of the most affected muscles, the glycogen synthesis in response to insulin stimulus was markedly reduced in aged Wistar rats (Goodman et al. 1983). In the present study, melatonin increased the phosphorylation degree of IRS-2 and ERK-1/2 in gastrocnemius. It was demonstrated that in skeletal muscle IRS-1 appears to be more related to glucose uptake while IRS-2 contributes selectively to ERK signaling, therefore, contributing to insulin-stimulated mitogenic signaling (Huang et al. 2005). Thus, our data suggest that skeletal muscle did not contribute with the improvement in insulin sensitivity due melatonin treatment. Besides, in skeletal muscle, melatonin action seems to be related to mitogenic action of insulin.

Aging and body fat increase can also change insulin sensitivity by its effects in liver, which can account for disposal of up to one third of an oral glucose load (Pagliassoti & Horton, 1994). In type 2 diabetic individuals, the excess of visceral fat and liver fat are associated to increased hepatic glucose production and hepatic insulin resistance (Gastaldelli et al. 2007). Despite aging did not alter basal and insulin stimulated phosphorylation of liver insulin receptors (Kono et al. 1990) neither the ability of theses receptors to bind insulin (Torlinska et al. 2000), we previously demonstrated that the early steps of insulin signal transduction are altered in liver from aged Wistar rats (Carvalho et al. 1996). In liver from aged rats, the increased phosphorylation of IRS-2 and the higher association of this substrate and IRS-1 with PI 3k suggest that melatonin improved both, glucose homeostasis and lipid metabolism, considering the differential role of both substrates in this organ (Taniguchi et al. 2005). The greater phosphorylation of AKt reinforces this suggestion because the reduction of IRS-1 and 2 in liver was associated to the disruption in the activation of AKT (Taniguchi et al. 2005).

In summary, as far as we know, this is the first study to demonstrate that the suppressive effects of melatonin against insulin resistance in aged rats are promoted, at least in part, by the improvement of insulin signaling pathways. Besides, the interaction between melatonin and insulin presents a tissue-specific pattern.

Acknowledgments

We also thank Mrs. Julieta Helena Scialfa for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhê GF, das Neves Borges-Silva C, Neto JC, et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. <u>Am J Physiol Endocrinol Metab.</u> 2005 Apr;288(4):E805-12.

Anhê GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso LA, et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. <u>J Neurochem.</u> 2004 Aug;90(3):559-66.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. <u>Anal Biochem.</u> 1976 May 7;72:248-54.

Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. <u>FEBS Lett.</u> 2001 Jul 6;500(3):119-24.

Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. <u>Endocrinology</u>. 1996 Jan;137(1):151-9.

Carvalho CR, Thirone AC, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. <u>Diabetes.</u> 1997 Dec;46(12):1950-7.

Carvalho C. R., Carvalheira J. B., Lima M. H., Zimmerman S. F., Caperuto L.C., Amanso A, et al. Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. <u>Endocrinology</u>. 2003 Feb;144(2):638-47.

Escrivá F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascal-Leone AM, Andres A, et al. In vivo Insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. <u>Endocrinology</u>. 1997 Jan;138(1):49-54.

Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. <u>Gastroenterology</u>. 2007 Aug;133(2):496-506.

Goodman NM, Divz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB. Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: change during 3-96 weeks of age. <u>Am J Physiol.</u> 1983 Jan;244(1):E93-100.

Grad BR, Rozencwaig R. The role of melatonin in mediating seasonal emergetic and immunological adaptations. <u>Brain Res Bull.</u> 1997;44(4):423-30.

Gribble FM. Metabolism: a higher power for insulin. <u>Nature.</u> 2005 Apr 21;434(7036):965-6.

Huang C, Thirone ACP, Huang X, Klip A. Differential contribution of insulin receptor substrate 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in L6 myotubes. J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):19426-35.

Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. <u>Int J Exp Pathol.</u> 2007 Feb;88(1):19-29.

Kono S, Kuzuya H, Okamoto M, Nishimura H, Kosaki A, Kakehi T, et al. Changes in insulin receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. <u>Am J Physiol.</u> 1990 Jul;259(1 Pt 1):E27-35.

Lima MH, Souza LC, Caperuto LC, Belivacqua E, Gaspareti AL, Zanuto R, et al. Upregulation of the PI3K/AKT pathway in ovary of rats by chronic treatment with HCG and insulin. <u>J Endocrinol.</u> 2006 Aug;190(2):451-9.

Montminy M, Koo SH. Diabetes: outfoxing insulin resistance? <u>Nature.</u> 2004 Dec 23;432(7020):958-9.

Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S. Effect of pinealectomy on plasma levls of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. J Pineal Res. 2003 Nov;35(4):251-6.

Nishimura H, Kuzuya H, Okamoto M, Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, et al. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. <u>Am J</u> <u>Physiol.</u> 1988 Jan;254(1 Pt 1):E92-8.

Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus A key mediator of insulin-induced anorexia. <u>Diabetes</u>. 2003 Feb;52(2):227-31.

Pagliassoti MJ, Horton TJ. Hormonal and neural regulation of hepatic glucose uptake. In: Pagliassoti MJ, Davis S, Cherrington AD. The role of the liver in maintaing glucose homeostasis. Austin: Landers; 1994. p.45-70.

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

Pocai A. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. <u>Nature</u>. 2005 Apr 21;434(7036):1026-31.

Popovich IG, Zabezhinski MA, Egormin PA, Tyndyk ML, Anikin IV, Spasov AA, et al. Insulin in aging and cancer: antidiabetic drug diabenol as geroprotector and anticarcinoen. Int J Biochem Cell Biol. 2005 May;37(5):1117-29.

Reiter R. The ageing pineal gland and its physiological consequences. Bioessays. 1992 Mar;14(3):169-75.

Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castro V, Ejo D. Reactive oxygen intermediares, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. <u>Ann N Y Acad</u> <u>Sci.</u> 1998 Nov 20;854:410-24.

Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaya SV, Kubyshin VL, Lapshina EA, Bryzewska M, Reiter RJ & Zavodnik IB (2007). Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. <u>Eur J Pharmacol.</u> 2007 Aug 27;569(3):180-7.

Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. <u>J Clin Invest.</u> 2005 Mar;115(3):718-27.

Torlinska T, Mackowiak P, Nogowski L, Hryniwwiecki T, Witmanowski H, Perz M, et al. Age dependent changes of insulin receptor in rat tissues. <u>J Physiol Pharmacol.</u> 2000 Dec;51(4 Pt 2):871-81.

Watve MG, Yajnik CS. Evolutionary origins of insulin resistance: a behavioral switch hypothesis. <u>BMC Evol Biol.</u> 2007 Apr 17;7:61

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

Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. <u>Nature</u>. 2004 Dec 23;432(7020):1027-32.

Figure Legends:

Figure 1. Effect of acute insulin stimulus on protein expression of insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 from control and melatonin chronically treated rats for 8 and 12 weeks. Liver homogenates from control and treated melatonin rats were immunoblotting with anti-IR (A), or anti-IRS-1 (B), or anti-IRS-2 (C) antibodies. The protein level of control (open bar) and melatonin treated (dark bar) were evaluated using image analyzer and are show in the bar graph as arbitrary units (%). Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct symbols were used to represent statistical significance, P<0.05.

Figure 2. Evaluation of IR, IRS-1 and 2 phosphorylation levels, analysis of the association between substrates 1 and 2 and PI3-K, analysis of the association between PI3-K and SHP2 protein induced by insulin in rat liver treated with melatonin by 08 and 12 weeks. Proteins were extracted and treated to immunoprecipitation with anti-IR (A); anti-IRS-1 (B) and anti-IRS-2 (C) antibodies and the immunoblotting was performed with anti phosphotyrosine antibody (D, E and F) and with anti-PI 3-Kinase antibody (D and E) and anti-SHP-2 antibody (F and G). Data are presented as mean \pm SEM and represent 6 distinct similar experiments to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct symbols were used to represent statistical significance, P<0.05.

Figure 3. Evaluation of phosphorylation level of AKT/PKB Ser and Thr, pERKs 1 and 2, pp70s6k, and pJNK induced by insulin (basal condition) in rat liver treated with melatonin by 08 and 12 weeks. Proteins were extracted with Laemmli's buffer and the immunoblotting was performed with anti-pAKT Ser (A), anti-pAKT Thr (B), anti-pERK 1and 2 (C), anti-pp70s6k (D), and anti-pJNK (E) antibodies. Data are presented as mean ± SEM and represent 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct symbols were used to represent statistical significance, P<0.05. Figure 4. Effect of acute insulin stimulus on protein expression of insulin receptor, IRS-1 and IRS-2 from control and melatonin chronically treated rats for 8 and 12 weeks. Skeletal muscle homogenates from control and treated melatonin rats were immunoblotting with anti-IR (A), or anti-IRS-1 (B), or anti-IRS-2 (C) antibodies. The protein level of control (open bar) and melatonin treated (dark bar) were evaluated using image analyzer and are show in the bar graph as arbitrary units (%). Data are the mean \pm SEM of 4 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct symbols were used to represent statistical significance, P<0.05.

Figure 5. Evaluation of IR, IRS-1 and 2 phosphorylation levels, analysis of the association between substrates 1 and 2 and PI3-K by insulin in rat gastrocnemius treated with melatonin by 08 and 12 weeks. Proteins were extracted and treated to immunopreciptation with anti-IR (A); anti-IRS-1 (B) and anti-IRS-2 (C) antibodies and the immunoblotting was performed with anti phosphotyrosine antibody (A, B and C) and with anti-PI 3-Kinase antibody (D and E). Data are presented as mean \pm SEM and represent 6 distinct similar experiments to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct symbols were used to represent statistical significance, P<0.05.

Figure 6. Evaluation of AKT/PKB and pERKs 1 and 2 phosphorylation levels induced by insulin in rat gastrocnemius treated with melatonin by 08 and 12 weeks. Proteins were extracted with Laemmli's buffer and the immunoblotting was performed with anti-pAKT Ser (A), anti-pAKT Thr (B), anti-pERK 1 and 2 (C) Data are presented as mean \pm SEM and represent 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct symbols were used to represent statistical significance, P<0.05. Results



FIGURE 1









FIGURE 2





I L

12 weeks



С т

12 weeks



FIGURE 3

8 weeks

200

(% 150-(%) ∩ 100-∀ 50-

50

0



FIGURE 4





FIGURE 5





FIGURE 6

APÊNDICE C

Melatonin supplementation to obese and aged rats induces up-regulation of the insulin intracellular signaling pathway in visceral fat tissue preceding weight loss

Ricardo Zanuto¹, Aparecida Emiko Hirata², Anderson C Marçal¹, Reury F. P. Bacurau³, Luciene M Ribeiro¹, João P G Camporez¹, Mario A S Filho¹, Luciana C Caperuto², José Cipolla Neto¹, Carla R O Carvalho¹

¹Departmento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP); ²Departmento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); ³Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo (USP); Brasil.

Correspondence should be addressed to: Carla R. O. Carvalho, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, Rua Prof. Lineu Prestes, 1524, sala 121, ICB1, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, Brazil, 055096-900, Fax: +55 11 30917258, e-mail: croc@icb.usp.br

RUNNING TITLE: Melatonin improves insulin action in aged rats **KEY WORDS:** Melatonin, Insulin, Visceral Fat, Aging, Obese

Abbreviations used are: Akt, protein kinase B, homologous to v-AKt; IRS, insulin receptor substrate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PI 3-kinase, phosphoinositide 3-kinase.

Abstract

Adipose tissue is an important contributor to the control of homeostasis throughout its ability to release several substances, however, the functions of this tissue appears to be compromised by the growing adiposity resulting from aging process. Melatonin supplementation can negate several morphological and metabolic aged-induced changes, but the mechanism underlying melatonin's actions are unclear. Thus, in the present study, we have examined the regulation of the insulin signaling pathways by using immunoprecipitation and immunoblotting in adipose tissue of aged rats chronically treated with melatonin. Melatonin treatment promoted increase in insulin sensitivity and a reduction of visceral fat. Specifically, concerning this last finding, the reduction was not only due food intake decrement but also because the lower food efficiency promoted by melatonin treatment. It is important to note that melatonin effects are already present at 8 weeks, that is, previously to the occurrence of visceral fat reduction. Thus, melatonin effects were not a consequence of adiposity decrement, what would be an expect finding. In relation to molecular mechanisms, those modifications were accompanied by the increased phosphorylation of insulin signaling downstream compounds associated with glucose homeostasis in adipose tissue (e.g. IRS-1). Additionally, melatonin supplementation increase the association level of IRS-1 with downstream compounds of insulin signaling pathway as PI-3K, SPH2, AKT/PKB and ERK-1 and 2. These results indicate that, in aged rats, melatonin regulates insulin signaling downstream components probably modulating functions as glucose uptake and energetic homeostasis.

Introduction

Adiposity, specially of visceral adipose tissue, as well as insulin and leptin plasma levels increase as the organism become older (Bjorntorp, 1995) and these changes, frequently are associated with glucose intolerance, insulin resistance, diabetes, dyslipidemia and hypertension (Bjorntorp, 1995; Bodkin et al., 1996; Buemann et al., 1996). It is believed that, at least in part, the association between increased adiposity and disease was due the imbalance of the several substance secreted by adipose tissue such as hormones, growth factors, citokines and adipokines (Ahima et al., 2000; Fruhbeck et al., 2001).

Adipose tissue is also an important target for several hormones, among them, melatonin (Brydon et al. 2001; Alonso-Vale., 2005). On the other hand, the biosynthesis of this hormone is reduced in aged organisms and has been proposed as a strategy to counterbalance the effects of aging process. This, led to the logic hypothesis that melatonin supplementation was able to revert aged-related changes upon the adiposity (Grad & Rozencwaig, 1993). In fact, Rasmussen and coworkers (1999) demonstrated that daily nocturnal melatonin administration suppresses visceral fat and diminishes insulin and leptin levels to values more similar to those observed in younger animals. Posterior studies demonstrated several interactions among melatonin and adipose tissue. For example, melatonin is able to increase insulin sensitivity in cultured adipocytes (Lima et al., 1994). On the contrary, adipocytes from pinealectomized rats appears to present a reduced ability to uptake glucose due a minor expression of GLUT4 (Seraphim et al. 1997; Lima et al.1998). In this context, it was not surprising that pinealectomized animals have their ability to adjust energetic demand during fasting (Alonso-Vale et al. 2004) or to an program of physical exercise (Borges-Silva et al. 2005) due to an imbalance between substrates

mobilization (Alonso-Vale et al. 2004; Borges-Silva et al. 2005) and lipogenesis in adipose tissue.

Recently, our knowledge about the positive effects of melatonin was detailed to pathologies such as obesity and diabetes (Hussein et al. 2007, Sudnikovich et al. 2007). Although, the mechanisms whereby melatonin promotes its effects are unclear, some evidence suggests that a putative interaction between insulin and melatonin is involved. For example, Peschke and coworkers (2006, 2007) demonstrated that in diabetic rats and type 2 diabetic patients the higher glucose and insulin levels are associated with lower melatonin level and a compensatory upregulation in the expression of pancreatic MT1 melatonin receptors. Otherwise, while the imbalance between pro- and oxidant factors promotes several changes in central nervous system with aging (Bondy and Sharman, 2007) insulin signaling is able to regulates the sensitivity of circadian clock to oxidative stress in Drosophila (Zheng et al. 2007). Further, it was demonstrated that in vitro melatonin can act synergistically with insulin in the phosphorylation of its receptor (Alonso-Vale et al. 2005). Additionally, we previously suggested the existence of a cross-talk between insulin and melatonin because the second could phosphorylate insulin receptor in rat hypothalamus (Anhê et al. 2004).

Because intermediates from insulin signaling pathways play their role in a tissue-specific manner (Carvalho et al. 1996), it is probable that the effects of melatonin supplementation will differ from tissue to tissue. Thus, we decided to evaluate the effects of this strategy in adipose tissue from aged rats and our hypothesis is that the effects of melatonin upon this tissue are linked to the regulation of insulin signaling pathways.

Materials and methods

Materials

The reagents for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis (SDSpAGE), immunoprecipitacion and immunoblotting were from Bio-Rad (Richmond, CA). Human recombinant insulin (Iolin R) was from Biobras (MG, Brazil). Anti-IR, Anti-IRS-1, Anti-IRS-2 and antiphoshotyrosine were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA). Anti-PI 3-kinase and Anti-SHP-2 was from Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Place, NY). Antiphospho-Akt (Ser⁴⁷³), antiphospho-ERK (Thr²⁰²/Try²⁰⁴) and antiphospho-JNK antibodies were from Cell Signaling (Beverly, MA). The enhanced chemiluminescence reagent kit, ECL, and protein A Sepharose 6MB were from Amersham-Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK).

Animals

Male Wistar rats (150-200 g, 8 weeks-old) were housed in a temperature controlled room at 25±2 °C with access to standard rodent chow and water *ad libitum* (Nuvilab CR-1; Nuvital Nutrientes S/A) under photoperiod regime of 12h:12-hr light-dark cycle (lights on at 6:00 am). The animals were maintained in agreement with the guidelines of Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) and all experimental procedures were approved by Ethical Committee on Animal Experimentation of Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (84/98).

Melatonin supplementation protocol

Ten months later, at 12 months of age, the animals were weighted, housed one per cage and randomly allocated in two groups (control and melatonin). Following a modification of the protocol from Wolden-Hanson and coworkers, animals in the melatonin group received tap water containing 0.01% ethanol with 0.4 μ g/ml of melatonin; bottles containing melatonin were covered with aluminum foil to avoid degradation. The solution was supplied 30 minutes

before lights off and was removed one hour after lights on. Animals in the control group received tap water with 0.01% of ethanol in the same time schedule that experimental group received melatonin. After 8 and 12 weeks of treatment, the rats were anesthetized with sodium thiopental (25 mg/kg, i.p) and used 10-15 min later, as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes.

Immunoblotting analysis

The abdominal cavity of anesthetized rats was opened, the cava vein exposed, and 0.5 ml of saline (0.09% NaCl) with or without 6 μg insulin was injected as a bolus infusion. Sixty seconds after the injection, visceral fat tissue was removed. The extraction of the visceral fat was performed at maximal insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptors and its substrates, IRS-1 and IRS-2 (Caperuto et al. 2006). The tissues fragments were immediately homogenized in ice-cold extraction buffer containing 100 mM Tris (pH 7.4), 10 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium vanadate, 2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.01 mg aprotinin/ml. Tissues extracts from rats were centrifuged at 30,000 g, 4 °C, for 15 min to remove insoluble material; the supernatant was then used for the assay. Protein determination was performed by the Bradford (Bradford et al. 1976) by binding method using the Bio-Rad reagent and bovine serum albumin (BSA) as the standard. Two or three mg protein from the supernatant were used for immunoprecipitation with anti-IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, protein A-Sepharose 6MB before Laemmli sample buffer treatment and SDS-PAGE, as described elsewhere (Carvalho et al. 2000). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was performed for 90 min at 120 V (constant). To reduce non-specific protein binding to the nitrocellulose, the filter was pre-incubated overnight at 4°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mM Tris, 150 mM NaCl and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated overnight at 22 °C with antibodies against phosphotyrosine, the p85 subunit of PI 3-kinase, the p95 subunit of IR, IRS-1, IRS-2, pAKt, pERK and pJNK diluted in blocking buffer with 3% non-fat dry milk followed by washing for 30 min in blocking buffer without milk. To visualize the autoradiogram, commercial enhanced chemiluminescence reagents exposed to photographic film were used. Quantitative analysis of the blots was performed using Scion Image software (Frederick, MD, USA).

Intravenous insulin tolerance test (iviTT)

Regular insulin (0.75 U/kg body weight) was intravenously injected (penis vein). Blood glucose levels were measured on samples obtained from the tail vein using a glucometer (Accu-check Advantage II Control, Roche Diagnostics) at 0, 4, 8, 12 and 16 min after insulin injection. The corresponding 4–16 min values were used to calculate the glucose disappearance constant (k_{ITT}) according to Bonora et al. 1989**Statistical Analysis**

Analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. The results were analyzed by One-Way ANOVA. When differences among treatments were detected by ANOVA, the Bonferroni's test was used. The level of significance of p<0.05 was chosen for all statistical comparisons. The samples from positive controls were assumed as 100% due the correspondence with the maximal phosphorylation value induced by acute bolus of insulin. Data are presented as mean \pm SEM.

Results

Animal characteristics

Table 1 shows the effect of chronic melatonin in both protocols of treatment on body weight, food and water intake and insulin sensibility. The melatonin treated rats presented a 2% reduction in body weight against an increase of nearly 4% of control animals through the 12 weeks period of treatment, but this change was not detected in the protocol of 8 weeks. Difference in insulin sensibility was detected by glucose disappearance constant at the end of treatment, where melatonin supplementation was able to increase significantly in both protocols (8 weeks. Cont = $2,84 \pm 0,6$ %/min n=6 vs Mel = $5,96 \pm 0,2$ %/min, n=6 ; p<0,05) and (12 weeks. Cont = $3,39 \pm 0,4$ %/min, n=6 vs Mel = $7,11\pm 0,17$ %/min, n=6 ; p<0,05), while difference in the body weight was detected only after the 10th week of starts protocol, so melatonin treatment also reduced intra-abdominal fat tissue (Cont= 3.94 ± 0.17 g; Mel = 2.58 ± 0.18 g, p<0.05), and food intake (Cont= 23 ± 0.6 g/day; Mel = 19.0 ± 0.3 g/day; p<0.05) in 12 weeks protocol.

Insulin receptor and IRS-1 levels and phosphorylation degree, interaction between IRS-1 with PI3-K and SHP-2, interaction between IRS-1 with pERK 1 e 2, and phosphorylation of AKT Serine⁴⁷³ and JNK in visceral fat homogenates.

The immunoblotting with anti-IR and anti-IRS-1 demonstrated that the level of insulin receptor was similar in adipose tissue from melatonin treated and control animals at 8 and 12 weeks of treatment (Figure 1A). However, there was a significant increase in the level of the IRS-1 protein from adipose tissue of melatonin treated animals, respectively (08 weeks Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mel = $268 \pm 16\%$, n=4;

p < 0.05) and (12 weeks Cont = 100 ± 4%, n=4 vs Mel =197 ± 6%, n=4 ; p < 0.05) (Figure 1B).

The phosphorylation level of tyrosil residues from IR and IRS-1 and 2 was performed by immunoblotting with an antibody against tyrosine in samples previously marked with the antibodies for these same receptor e substrates.

The acute stimulus with insulin was able to induce a significant augment in phosphorylation level of IR in both protocols of treatment ((8 weeks. Cont = $100 \pm$ 3%, n=4 vs Mel = $237 \pm 17\%$, n=4; p<0.05) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mel = $142 \pm 8\%$, n=4; p<0.05), respectively (Figure 2A). Acute insulin stimulus also promoted increased IRS-1 phosphorylation, respectively (8 weeks. Cont = $100 \pm 10\%$, n=5 vs Mel = $262 \pm 34\%$, n=5; p<0.05) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 13\%$, n=5 vs Mel = $161 \pm 5\%$, n=5; p<0.05), with an increased phosphorylation of IRS-1 in basal state in 12 weeks protocol (12 weeks. Cont = $74 \pm 3\%$, n=5 vs Mel = $145 \pm 5\%$, n=5; p < 0.05) (Figure 2B). Accompanying theses findings, it was observed, in both protocols, a significant increase in the association between IRS-1 and PI-3K in the basal state, respectively (8 weeks. Cont = $47 \pm 3\%$, n=5 vs Mel = $83 \pm 5\%$, n=5; p < 0.05) and (12 weeks. Cont = 101 ± 2%, n=5 vs Mel = 150 ± 6%, n=5; p < 0.05) as well after acute insulin stimulus, respectively (8 weeks. Cont = $100 \pm 2\%$, n=5 vs Mel = $154 \pm 5\%$, n=5; p<0.05) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 2\%$, n=5 vs Mel = $239 \pm$ 24%, n=5; p < 0.05 (Figure 2C). Besides these findings, there was also an association of IRS-1 with the protein SHP2 after acute insulin stimulus in both protocols, respectively (8 weeks. Cont = $100 \pm 2\%$, n=5 vs Mel = $176 \pm 8\%$, n=5; p<0.05) and (12 weeks. Cont = $100 \pm 7\%$, n=5 vs Mel = $170 \pm 12\%$, n=5; p < 0.05) (Figure 2D).
There was no difference in the phosphorylation levels of IRS-2 after the acute insulin stimulus in the protocol of 08 weeks (Figure 2E).

The acute stimulus with insulin in animals chronically treated with melatonin was able to induces an increase in the level of phosphorylation of AKT/PKB serine proteins at 08 and 12 weeks in the basal state (8 weeks Cont = $62 \pm 12\%$, n=4 vs Mel = $187 \pm 2\%$, n=4; p < 0.05); (12 weeks Cont = $100 \pm 9\%$, n=4 vs Mel = $122 \pm 5\%$, n=4; p < 0.05) and after the acute insulin stimulus, respectively (8 weeks Cont = $100 \pm$ 8%, n=4 vs Mel = $98 \pm 6\%$, n=4; p < 0.05); (12 weeks Cont = $84 \pm 7\%$, n=4 vs Mel = $129 \pm 6\%$, n=4; p < 0.05) (Figure 3A). Additionally, it was observed a significant increase in the level of basal phosphorilyation from ERKs 1 and 2 proteins (08 weeks Cont = $122 \pm 9\%$, n=4 vs Mela = $195 \pm 15\%$, n=4 ; p < 0.05) with a simultaneous increase after the acute stimulus with insulin in both protocols of supplementation, respectively (08 weeks Cont = $100 \pm 20\%$, n=4 vs Mela = $196 \pm 12\%$, n=4; p < 0.05) and (12 weeks Cont = $100 \pm 2\%$, n=5 vs Mela = $124 \pm 3\%$, n=5; p < 0.05) (Figure 3B). There were not differences in the level of phosphorilation of pJNK in the 12 weeks supplementation protocol (Figure 3C).

Discussion

Adipose tissue is a major tissue for the increase of insulin resistance due to aging process and several evidences support the hypothesis that this tissue is one of the first places to suffer the metabolic disorders responsible for the developmental of glucose intolerance (Serrano et al., 2009). In vitro studies demonstrated that adipocytes isolated from older rats presented a diminished activation of insulin receptors (Carrascosa et al. 1989, Ruiz et al. 1992). In concordance with this, in older Wistar rats the reduced insulin sensitivity, after eight months of aged, occurs simultaneous to a significant increase in the percentage of body fat, specially visceral fat (Escrivá et al. 2007). The high correlation between the metabolic disturbances of adipose tissue such as obesity and lipodystrophy with the manifestation of insulin resistance suggest a pivotal role for adipose tissue in the glycemic homeostasis (Kahn & Flier, 2000). In older rats, a marked deficiency in insulin signaling cascade is present in the adipose tissue after the acute stimulus with insulin, resulting in a reduction of IR phosphorylation and AKT/PKB activation and a concomitant decrease in GLUT-4 translocation for adipocyte membrane (Smith, 2002; Serrano et al., 2009). Conditional knockout mice for the GLUT-4 gene in the adipose tissue, present glucose intolerance (Abel et al., 2001). Paradoxically, it was demonstrated in FIRKO, fatspecific IR knockout mice, these animals present a greater total life span in comparison to wild type mice, evidencing a protection against obesity and glucose intolerance due aging process (Blüher et al., 2003). Besides, these knockouts maintained during their lives, a fat mass 50-70% minor in comparison to wild type controls. Notwithstanding, several studies suggested that the increase of adipose tissue is one of the most important feature responsible by insulin resistance as the organism become older (Gabriely et al., 2002; Escrivá et al., 2007). Thus, the reduction of insulin sensitivity in adipose tissue due the aging process could be understanding as a protection against the deleterious effects of an increased fat mass. However, it is important to note that a persistent insulin resistance in adipose tissue could result in the compromising of the homeostasis of lipid metabolism and led to an accumulation of ectopic fat in peripheric tissues, an fact that could promote the development of glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus (Serrano et al., 2009).

In this tissue, melatonin treatment increased the phosphorylation of IR, IRS-1 as well as of proteins of insulin cascade as PI3K, SHP-2, AKT/PKB and ERKs 1 and 2. The increase of IRS-1 phosphorylation level seems to be important for insulin metabolic actions in the adipose tissue (Kaburagi et al. 1997, Fasshauer et al. 2000). Studies from Quon (2002) demonstrated that the overexpression of IRS-1 in cultured adipocytes was able to increase the levels of GLUT4 translocation to the cell membrane, even in the absence of insulin, suggesting a pivotal role for this insulin substrate in adjoose cells. Contradictorily, the abolishment of IRS-1 from adjoocytes did not compromised the interaction of IR/IRS-1 and consequently in glucose uptake stimulated by insulin (Morris et al., 1996; Sharma et al., 1997). Additionally, microinjections of anti-IRS-1 antibody in fibroblasts were able to reduce cell growth and DNA synthesis stimulated by insulin (Rose et al., 1994). These results suggest a differential action of IRS-1 in the mitogenic and metabolic effects of insulin in adipose tissue. Despite of this, studies performed in knockouts mice for the SHP-2 suggested that this protein is a physiological enhancer of insulin action, performing an essential role in the maintained of glycemic homeostasis during aging process (Duan et al. 2004). In this way, the effects of melatonin treatment in the adipose tissue could support the improvement in the insulin sensitivity. However, in the present study, it was observed a simultaneous reduction in visceral fat. Because the reduction of fat only can occur in response of a negative caloric balance (Schutz, 2004), the reduction of food intake promoted by melatonin also could explain the results concerning visceral fat, but this was not the case. The reduction of food intake did not justify all visceral fat reduction once melatonin supplementation also reduced food efficiency. Wolden - Hanson and coworkers (2000) reported a similar finding with middle-aged rats. It is also possible that the negative caloric balance was resulted from the increase in spontaneous physical activity, normally reduced in aged animals (Altun et al. 2007). For example, it was observed an increase of 19% in the spontaneous activity with a concomitant 20% reduction in body fat percentage in middle-aged Sprague Dawley rats submitted to melatonin supplementation (Wolden - Hanson et al. 2000). It is interesting to note that melatonin also was able to increase the behavioral response of middle-aged rats (Rasmussen et al. 2001), however, we did not evaluated neither spontaneous physical activity nor behavioral response of our animals.

It is worth to mention that some previous studies demonstrated that melatonin treatment was able to reduce visceral fat without affect food ingestion (Rasmussen et al. 1999, Wolden - Hanson et al. 2000). Angers and coworkers (2003) suggested that differences related to the effects of melatonin treatment upon food intake could be explained by the time schedule of the hormone was administrated In fact, in the present study, melatonin was administrated in a different time schedule in comparison to the mentioned studies. Another explanation could be related to the different animals strains used in the several studies. For example, Sprague Dawley rats present a body weight and total body fat increase with a concomitant increase in insulin basal levels. On the other hand, Wistar rats gain weight as they become older but their fast insulin levels remain similar to that observed in young animals with three months of age (Escrivá et al. 1997). Finally, in the present study the animals were maintained one per cage while in the previous studies they remained in group. In a study performed by Hussein and coworkers (2007) in which the animals also were maintained in individual cages, the chronic melatonin treatment was able to reduce food intake. Probably, the strategy of individualize the animals per cage permits verify subtle changes in food intake.

Acknowledgments

We also thank Mrs. Julieta Helena Scialfa for technical assistance. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

Abel ED, Peroni O, Kim JK, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shuman GI, Kahn BB. Adipose selective targeting of the GLUT 4 gene impair insulin action in muscle and liver. <u>Nature.</u> 2001 Feb 8;409(6821):672-3.

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. <u>Trends Endocrinol Metab.</u> 2000 Oct;11(8):327-32.

Alonso-Vale MI, Borges-Silva CN, Anhê GF, Andreotti S, Machado MA, Cipolla-Neto J, et al. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. <u>Horm Metab Res.</u> 2004 Jul;36(7):474-9.

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhê GF, das Neves Borges-Silva C, Neto JC, et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. <u>Am J Physiol Endocrinol Metab.</u> 2005 Apr;288(4):E805-12.

Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. <u>Physiol Behav.</u> 2007 Dec 5;92(5):911-23.

Angers K, Haddad N, Selmaoui B, Thibault L. Effect of melatonin on total food intake and macronutrient choice in rats. <u>Physiol Behav.</u> 2003 Oct;80(1):9-18.

Anhê GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso LA, et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. <u>J Neurochem.</u> 2004 Aug;90(3):559-66.

Bjorntorp P. Neuroendocrine aging. J Intern Med. 1995 Nov;238(5):401-4.

Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. <u>Dev Cell.</u> 2002 Jul;3(1):25-38.

Bodkin NL, Nicolson M, Ortmeyer HK, Hansen BC. Hyperleptinemia: relationship to adiposity and insulin resistance in the spontaneously obese rhesus monkey. <u>Horm</u> <u>Metab Res.</u> 1996 Dec;28(12):674-8.

Bondy SC, Sharman EH. Melatonin and the aging brain. <u>Nerochem Int.</u> 2007 Mar;50(4):571-80. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cicolini M, Querena M, Cacciotori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic glucose clamp studies. J Clin Endocrinol Metab. 1989 Feb;68(2):374-8.

Borges-Silva C, Alaniz MHF, Alonso-Vale MIC, Takada J, Andreotti S, Peres SB, et al. Reduced lipolysis and increased lipogeneses in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. <u>J Pineal Res.</u> 2005 Sep;39(2):178-84.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. <u>Anal Biochem.</u> 1976 May 7;72:248-54.

Brydon L, Petit L, Delagrange P, Strosberg AD, Jockers R. Functional expression of MT2 (Mel 1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. <u>Endocrinology</u>. 2001 Oct;142(10):4264-71.

Buemann B, Tremblay A. Effects of exercise training on abdominal obesity and related metabolic complications. <u>Sports Med.</u> 1996 Mar;21(3):191-212.

Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Ribeiro LM, Medina MC, Souza LC, et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. Endocrine. 2006 Jun;29(3):391-8.

Carrascosa JM, Ruiz P, Martínez C, Pulido JA, Satróstegui J, Andrés A. Insulin receptor kinase activity in rat adipocytes is decreased during aging. <u>Biochem Biophys</u> <u>Res Commun.</u> 1989 Apr 14;160(1):303-9.

Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. <u>Endocrinology</u>. 1996 Jan;137(1):151-9.

Carvalho CR, Maeda L, Brenelli SL, Saad MJ. Tissue-specific regulation of IRS-2/PI 3-kinase association in aged rats. <u>Biol Chem.</u> 2000 Jan;381(1):75-8.

Duan C, Yang H, White MF, Rui L. Disruption of the SH2-B gene causes agedependent insulin resistance and glucose intolerance. <u>Mol Cell Biol.</u> 2004 Sep;24(17):7435-43. Escrivá F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascal-Leone AM, Andres A, et al. In vivo Insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. <u>Endocrinology</u>. 1997 Jan;138(1):49-54.

Escrivá F, Gavete ML, Fermín Y, Pérez C, Galland N, Alvarez C, et al. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. J Endocrinol. 2007 Jul;194(1):131-41.

Fasshauer M, Klein J, Ueki K, Kriauciunas KM, Benito M, White MF et al. Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of GLUT-4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25494-501.

Fruhbeck G, Goméz-Ambrosi J, Muruzábal FJ. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. <u>Am J Physiol</u> <u>Endocrinol Metab.</u> 2001 Jun;280(6):E827-47.

Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of cisceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? <u>Diabetes.</u> 2002 Oct;51(10):2951-8.

Grad BR, Rozencwaig R. The role of melatonin in mediating seasonal emergetic and immunological adaptations. <u>Brain Res Bull.</u> 1997;44(4):423-30.

Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. <u>Int J Exp Pathol.</u> 2007 Feb;88(1):19-29.

Kaburagi Y, Satoh S, Tamemoto H, Yamamoto-Honda R, Toke K, Veki K, et al. Role of insulin receptor subtrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUt4 translocation in primary adipocytes. J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):25839-44.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. <u>J Clin Invest.</u> 2000 Aug;106(4):473-81.

Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food

intake, time of the day and melatonin. <u>Braz J Med Biol Res.</u> 1994 Apr;27(4):995-1000.

Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphin PM, Sumida DH, Moraes SM, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. <u>Am J Physiol.</u> 1998 Dec;275(6 Pt 1):E934-41.

Morris AJ, Martin SS, Haruta T, Nelson JG, Vollenweider P, Gustafson TA, et al. Evidence for an insulin receptor substrate 1 independent insulin signaling pathway that mediates insulinresponsive glucose transportes (GLUT4) translocation. <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> 1996 Aug 6;93(16):8401-6.

Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Dorothee P, Preiss U, Schneyer U, et al. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and increased pancreatic serum melatonin-receptor status. J Pineal Res. 2006 Mar;40(2):135-43.

Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer H. Melatonin and type 2 diabetes – a possible link? J Pineal Res. 2007 Apr;42(4):350-8.

Quon MJ. Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. J Biol Chem. 1994 Nov 11;269(45):27920-4.

Rasmussen DD, Boldt BM, Wikinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and insulin to youth levels. <u>Endocrinology</u>. 1999 Feb;140(2):1009-12.

Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. J Pineal Res. 2001 Aug;31(1):89-94.

Rose DW, Saltiel AR, Majumdar M, Decker SJ, Olefsky JM. Insuline receptor substrate 1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction. <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> 1994 Jan 18;91(2):797-801.

Ruiz P, Pulido JA, Martínez C, Carrascosa JM, Satróstegui J, Andrés A. Effect of aging on the kinetic characteristic of insulin receptor autophosphorylation in rat adipocytes. <u>Arch Biochem Biophys.</u> 1992 Jul;296(1):231-8.

Schutz Y. Dietary fat, lipogenesis and energy balance. <u>Physiol Behav.</u> 2004 Dec 30;83(4):557-64.

Seraphim PM, Bartol I, Cipolla-Neto J, Machado UF. Quantification of Glut-4 transporter in insulin-sensitive tissues from pinealetomized rats. In: Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pévet P. Pineal Update: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. Westbury:PJD Publications Ltd. 1997. p.99-106.

Serrano R, Villar M, Gallardo N, Carrascosa JM, Martinez C, André A. The effect of aging on insulin signaling pathway is tissue dependent: Central role of adipose tissue in the insulin resistance of aging. <u>Mech Ageing Dev.</u> 2009 Mar;130(3):189-97.

Sharma PM, Egawa K, Gustafson TA, Martin JL, Olefsky JM. Adenovirus-mediated overexpression of IRS-1 interacting domains abolishes insulin-stimulated mitogenesis without affecting glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. <u>Mol Cell Biol.</u> 1997 Dec;17(12):7386-97.

Smith U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance – is insulin resistance initiated in the adipose tissue? Int J Obes Relat Metab Disord. 2002 Jul;26(7):897-904.

Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaya SV, Kubyshin VL, Lapshina EA, Bryzewska M, Reiter RJ & Zavodnik IB (2007). Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. <u>Eur J Pharmacol.</u> 2007 Aug 27;569(3):180-7.

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

Zheng X, Yang Z, Yue Z, Alvarez JD, Sehal A. FOXO and insulin signaling regulate sensitivity of the circadian clock to oxidative stress. <u>Proc Natl Acad Sci U S A.</u> 2007 Oct 2;104(40):15899-904.

Table 1 Characteristics of male rats after 8 and 12 weeks with melatonin treatment.Body weight, adipose tissue, food and water intake. The results are expressedas medium \pm SEM and the * p<0.05. The numbers of animals are in</td>parentheses.

	8 weeks		12 weeks	
	Control (n)	Melatonin (n)	Control (n)	Melatonin (n)
Initial Weight (g)	387 ± 15 (14)	383 ± 18 (14)	394 ± 11 (21)	391 ± 16 (21)
Final Weight (g)	405 ± 10 (14)	388 ± 11 (14)	424 ± 17 (21)	383 ± 9 (21) *
Body weight increase during the experiment (%)	+4	+1	+7	-2 *
Visceral adipose tissue (g)	3,13 ± 0,78 (7)	2,76 ± 0,65 (7)	3,94 ± 0,17 (9)	2,58 ± 0,18 (9) *
Food intake (g/day)	20 ± 0,8 (7)	19 ± 0,8 (7)	23 ± 1,2 (18)	19±0,3 (18) *
Daily water intake (ml/day)	11 ± 1,4 (7)	10,1 ± 0,6 (7)	10±0,5 (18)	9,1 ± 0,7 (18)
Nocturnal water intake (ml/day)	28 ± 1 (7)	30 ± 1,5 (7)	31 ± 1 (18)	27 ± 2 (18)
Glucose disappearance constant (%/min)	2,84 ± 0,6 (6)	5,96 ± 0,2 (6) *	3,39 ± 0,40 (6)	7,11±0,17 (6) *

Figure Legend

Figure 1. Effect of acute insulin stimulus on protein expression of insulin receptor and IRS-1 from control and melatonin chronically treated rats for 8 and 12 weeks. Visceral fat homogenates from control and treated melatonin rats were immunoprecipitated followed by immunoblotting with anti-IR (A) or anti-IRS-1 (B) antibodies. The protein level of control (open bar) and melatonin treated (dark bar) were evaluated using image analyzer and are show in the bar graph as arbitrary units (%). Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct letters signify statistical significance, P<0.05.

Figure 2. Effect of acute insulin stimulus on tyrosine phosphorylation of insulin receptor, IRS-1, and IRS-2, and PI 3-kinase and SHP-2 association with IRS-1 from control and melatonin chronically treated rats for 8 and 12 weeks. Hypothalami homogenates from control and treated melatonin rats were immunoprecipitated with anti-IR (A), or anti IRS-1 (B), or anti IRS-2 (E) followed by immunoblotting with antiphosphoryrosine (A,B,E), or anti-PI 3-kinase (C), or anti SHP2 (D) antibodies. The degree of basal (-) and acutely insulin-induced (+) tyrosine phosphorylation or association of the IRS-1 with PI 3-kinase and SHP2 were analyzed. Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct letters signify statistical significance, P<0.05.

Figure 3. Effect of acute insulin stimulus upon insulin signaling downstream components in adipose tissue from control and melatonin chronically treated rats. Visceral fat homogenates from control and treated melatonin rats were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-phospho-ser473-Akt; anti-phospho-ERK-1/2; anti-pJNK antibody, as described in the Methods section. Data are the mean \pm SEM of 6 distinct experiments similar to the ones presented herein are represented as bar graph. Distinct letters signify statistical significance, P<0.05.



Figure 1











Figure 2







Figure 3