TALITA DA SILVA MENDES DE FARIAS

**Caracterização do perfil diário da lipólise e
lipogênese no tecido adiposo de ratos adultos e
a influência da pinealectomia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

TALITA DA SILVA MENDES DE FARIAS

**Caracterização do perfil diário da lipólise e
lipogênese no tecido adiposo de ratos adultos e
a influência da pinealectomia**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área De Concentração: Fisiologia
Humana

Orientador: Prof. Tit. Dr. Fabio Bessa
Lima

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Farias, Talita da Silva Mendes.

Caracterização do perfil diário da lipólise e lipogênese no tecido adiposo de ratos adultos e a influência da pinealectomia / Talita da Silva Mendes Farias. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Fabio Bessa Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do tecido adiposo

Versão do título para o inglês: Characterization of the daily profile of lipolysis and lipogenesis in adipose tissue of adult rats and the influence of pinealectomy.

Descritores: 1. Tecido adiposo 2. Pinealectomia 3. Lipólise 4. Lipogênese 5. Metabolismo 6. Perfil circadiano I. Lima, Fabio Bessa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB0167/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Talita da Silva Mendes Farias.

Título da Dissertação: Caracterização do perfil diário da lipólise e lipogênese no tecido adiposo de ratos adultos e a influência da pinealectomia .

Orientador(a): Fabio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

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

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 Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **04** nas fls. **66** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do **Prof(a) Dr(a) Fabio Bessa Lima**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Papel da melatonina e glicocorticóides na sincronização do metabolismo lipídico em adipócitos isolados de ratos** do qual participou(aram) o(s) alunos Amanda Baron Campaña, André Ricardo Gomes de Proença, Ariclécio Cunha de Oliveira, Maria Isabel Cardoso Alonso Vale, Natalie Carolina de Castro, Rogério Antonio Laurato Sertié, Talita da Silva Mendes de Farias, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **11.02.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

*Dedico àqueles que são meus exemplos de vida,
meus amigos tanto nas horas boas e principalmente
nas difíceis, que me apoiaram incondicionalmente
diante de todas as situações, que me ensinaram o
melhor caminho a seguir... Enfim dedico á vocês,
PAI e MÃE pelo exemplo de vida e dedicação...
Amo vocês!!!!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar pelos melhores caminhos, por colocar pessoas tão especiais em minha vida e por ter me dado uma família linda.

Aos meus pais, por serem os melhores pais do mundo, por não me deixar desistir diante de todas as dificuldades enfrentadas, por agüentar os meus choros e simplesmente, por estarem ao meu lado. Amo vocês, obrigada por tudo sempre.

À minha irmã Janaina, pelos momentos de distração, pelas risadas e pelo apoio.

Ao meu namorado Roberto, por todo apoio e amor, por ter me agüentado nos momentos de estresse e por ter estado ao meu lado apesar de toda a distância.

À professora Cecília Mareze, por ter me ensinado os primeiros passos do mundo da ciência, por ter me ajudado na vinda para São Paulo e por todos os ensinamentos.

Ao professor Fabio, por toda a dedicação, por ter me agüentado nos meus momentos difíceis dentro do laboratório e principalmente por ter confiado no meu potencial. Obrigado por tudo, prometo dar o meu melhor nos próximos anos!!!!

Aos amigos do laboratório, Amanda, André, Ari, Andressa, Arnaldo, Naty, Léo, Rogério, Carol, Paty, Felipe (agregado), Sandra, pelos momentos engraçadíssimos, por toda a risada, pela diversão, pelas discussões, às vezes não tão científicas, por todos os ensinamentos que cada um me passou e que me fez crescer. Mas agradeço vocês principalmente por todo o apoio e ajuda dada no desenvolvimento desse trabalho, por terem ido de madrugada ao laboratório para me ajudar nos experimentos, enfim por toda a ajuda oferecida, sem vocês eu não teria conseguido terminar o meu mestrado. Obrigada de coração por tudo, vocês foram essenciais!!!!

Ao Marco, aluno do Prof. José Cipolla, por ter realizado todas as cirurgias de pinealectomia, e por ter sido tão solícito, sem você eu também não teria feito nada.

Ao Prof. José Cipolla, pelas discussões, por ter aberto o seu laboratório pra mim e por ter me ajudado sempre que possível.

Às minhas amigas, irmãs, companheiras de todas as horas. Ma, Loli, Lis, Dani, Fábria, apesar da distância vocês estiveram sempre presentes, com certeza vocês fazem parte dessa conquista.

Ao secretário de pós graduação, José Maria, que sempre foi super prestativo e que sempre me atendeu com paciência.

Aos funcionários da biblioteca do ICB-I, pelos serviços prestados na elaboração dessa dissertação.

À CAPES, CNPQ e FAPESP por todo o apoio financeiro dado a minha pesquisa.

À todos os professores que passaram pela minha vida e que me doaram, com todo o carinho, um pouco dos seus conhecimentos, ser professor não é uma tarefa fácil por isso agradeço toda dedicação.

Agradeço até as dificuldades encontradas no começo dessa jornada, elas me ensinaram que a ciência nem sempre sai da maneira que nós esperamos. Todas as dificuldades me fizeram crescer como pessoa, como cientista e como ser humano.

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

*"A dificuldade em se vencer um desafio vem da
maneira que você olha para ele.
Olhe sempre com olhos de um gigante..."*

Yuri Lacerda

RESUMO

Farias, T. S. M. **Caracterização do perfil diário da lipólise e lipogênese no tecido adiposo de ratos adultos e a influência da pinealectomia.** 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Biofísica) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Sabendo-se da correlação do hormônio melatonina com mudanças metabólicas no tecido adiposo e devido a trabalhos que apontam, mas que não caracterizam de fato a existência de um perfil diário dos processos de lipólise e lipogênese em adipócitos isolados de ratos, o presente trabalho teve como objetivo investigar se há ritmicidade dos eventos lipolíticos e lipogênicos no tecido adiposo peri-epididimal e caracterizar, no caso da detecção de oscilação rítmica circadiana, se a pinealectomia interfere ou não nesse processo. O sacrifício dos animais, controles e pinealectomizados, foi realizado de quatro em quatro horas, a saber, 6h30min, 10h, 14h, 18h, 22h; 2h e 5h30min. Coletou-se o tecido adiposo peri-epididimal desses animais e isolaram-se os adipócitos para mensurar por meio de ensaios biológicos *ex vivo* (com adipócitos isolados) a sua capacidade de realizar lipólise e lipogênese. Em relação a lipogênese (tanto a taxa basal como a estimulada por insulina), observaram-se algumas diferenças estatisticamente significativas nas determinações feitas entre os horários analisados. Isto ocorreu tanto em adipócitos de animais controles quanto de pinealectomizados. No entanto, a comparação entre grupos (Controle X Pinealectomizado), levando-se em conta o horário do dia, não mostrou diferenças significativas entre os grupos, indicando que remoção da glândula pineal não interfere nesse processo metabólico do tecido adiposo branco peri-epididimal. O estudo da lipólise (tanto a taxa basal como a estimulada por isoproterenol) mostrou que existem algumas diferenças estatisticamente significativas entre os horários analisados, contudo, como no caso da lipogênese, a pinealectomia também não interferiu no ritmo desse processo. A utilização do programa COSINOR, para análise da existência de ritmos desses processos, evidenciou que existe um ritmo, tanto na lipogênese quanto na lipólise, mas que não ocorre de maneira circadiana, ou seja, não ocorre em intervalos de $24h \pm 4$. Possivelmente, seriam ritmos ultradianos. Ainda foi verificada interferência da pinealectomia nas taxas de consumo alimentar, ingestão hídrica e evolução do peso corporal, no entanto não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Palavras-chave: Tecido adiposo. Pinealectomia. Lipólise. Lipogênese. Metabolismo. Perfil Circadiano.

ABSTRACT

FARIAS, T. S. M. **Characterization of the daily profile of lipolysis and lipogenesis in adipose tissue of adult rats and the influence of pinealectomy.** 2010. 62 f. Master thesis (master's degree in physiology and biophysics) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Knowing the correlation of the hormone melatonin with metabolic changes in adipose tissue and because of studies that point, but do not in fact characterize the existence of a daily profile in the processes of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes, the present study investigated whether there is a rhythmicity of lipogenic and lipolytic events in peri-epididymal adipose tissue and characterized, in the case of detection of circadian rhythmic, if pinealectomy interfered in this process. The sacrifice of animals, both controls and pinealectomized, was performed every four hours, namely, 6h30min, 10h, 14h, 18h, 22h; 2h e 5h30min. The peri-epididymal adipose tissue was collected from these animals and adipocytes were isolated to measure, by means of *ex vivo* biological assays, their ability to perform lipolysis and lipogenesis. In relation to lipogenesis (both the basal and the insulin-stimulated rates), there were some statistically significant differences in the determinations around the clock. This occurred in adipocytes both from control as well as from pinealectomized animals. However, the time-of-day comparison between groups (Control X pinealectomized) showed no significant differences, indicating that removal of the pineal gland did not intervene in the metabolic activity of peri-epididymal white adipose tissue. The study of lipolysis (both basal and stimulated rate to isoproterenol) showed that there are some statistically significant differences between the times around the clock, however, as in the case of lipogenesis, pinealectomy did not affect the daily profile of this process. The use of COSINOR program for analysis of the existence of rhythms of these processes showed that indeed there is a rhythm, both in lipogenesis and in lipolysis, but it does not occur in a circadian manner, i. e., it does not occur at a 24 (± 4) hr interval. Possibly, results are more compatible with an ultradian rhythm. Although interference of pinealectomy was verified in rates of food consumption, water intake and body weight evolution, there were no significant differences between groups.

Key words: Adipose tissue. Pinealectomy. Lipolysis. Lipogenesis. Metabolism. Circadian profile.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AA-NAT – Aril - alquilamina N-acetiltransferase
ACS1 – Acil-CoA sintase 1
AG – Ácido graxo
AMPc – Adenosina monofosfato cíclica
ATGL – Lipase de triglicerídeos do adipócito
DAG – Diacilglicerol
EPM – Erro padrão da média
FAS – Ácido graxo sintase
FATP1 – Proteína transportadora de ácidos graxos 1
G6PDH – Glicose -6- fosfato desidrogenase
GLUT4 – Transportador de glucose 4
GMPc – Monofosfato de guanosina cíclica
HCL – Ácido clorídrico
HIOMT – Hidroxi-indol-O-metiltransferase
HSL – Lipase hormônio sensível
IL-6 – Interleucina 6
IP3 – Inositol trifosfato
KOH – Hidróxido de potássio
LPL – Lipase de lipoproteína
MAG – Monoacilglicerol
MEL – Melatonina
NSQ – Núcleo supraquiasmático
PE – Periepididimal
PINX – Pinealectomizados
PKA – Cinase proteica A
PKC – Cinase proteica C
TAB – Tecido adiposo branco
TAG – Triacilglicerol
TNF- α – Fator de necrose tumoral - α

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Molécula de melatonina	19
Figura 2: Principais etapas da síntese de melatonina	21
Figura 3: Desenho experimental	29
Figura 4: Avaliação do peso corporal	33
Figura 5: Consumo alimentar	34
Figura 6: Ingestão Hídrica	35
Figura 7: Incorporação de glicose em lipídeos de adipócitos em tecido adiposo branco Peri-epedidimal (estado basal).....	36
Figura 8: Incorporação de glicose em lipídeos de adipócitos em tecido adiposo branco Peri-epedidimal (estado estimulado)	37
Figura 9: Perfil diário do processo de lipogênese nos estados basal e estimulado	38
Figura 10: Incorporação de Glicose em resíduo AG de TAGs em Tecido Adiposo PE. Situação basal	39
Figura 11: Incorporação de Glicose em resíduo AG de TAGs em Tecido Adiposo PE. Pós-estimulação máxima com insulina	40
Figura 12: : Perfil diário do processo de incorporação de glicose em ácidos graxos de TAGs nos estados basal e estimulado	41
Figura 13: Teste de avaliação da atividade lipolítica basal em tecido adiposo branco Peri-epedidimal	42
Figura 14: Teste de avaliação da atividade lipolítica frente ao estímulo com isoproterenol em tecido adiposo branco Peri-epedidimal	43
Figura 15: Perfil diário do processo de lipólise basal e estimulada	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Tecido adiposo	17
1.2 Glândula pineal e melatonina.	19
1.3 Ritmos circadianos.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Procedimentos experimentais.....	29
3.2.1 <i>Pinelectomia</i>	29
3.3 Experimentos “in vitro”.....	30
3.3.1 <i>Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica</i>	30
3.3.2 <i>Teste de incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em lipídeos em adipócitos isolados</i>	31
3.3.3 <i>Incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em ácido graxo de triacilgliceróis</i>	31
3.3.4 <i>Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol</i>	32
3.4 Tratamento estatístico dos dados.....	32
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Avaliação do peso corporal	34
4.2 Consumo	35
4.3. Teste de incorporação de D-[U- ¹⁴ C]-Glicose em lipídeos em adipócitos isolados (lipogênese).	37
4.4 Teste de incorporação de D-[U- ¹⁴ C]-Glicose em ácidos graxos (AG) de triacilgliceróis em adipócitos isolados.....	40
4.5 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol.....	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO - TABELAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido adiposo

O tecido adiposo branco (TAB) representa um dos mais abundantes tecidos presente em humanos e em muitos animais adultos, podendo ser considerado, em termos comparativos, como a maior estrutura do organismo. Possibilita um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem causar o comprometimento da integridade e funcionalidade destes, além de proteger mecanicamente o organismo contra choques e traumatismos e de servir como um importante isolante térmico. Além disso, tem a função de estocar triacilglicerol constituindo o principal reservatório de energia mobilizável durante períodos de jejum ou de maior demanda energética.

Mais recentemente, importantes avanços surgiram revelando um grande envolvimento do TAB no controle metabólico global atuando como um órgão endócrino através da produção e secreção de hormônios e citocinas (também denominadas adipocinas). Tal controle metabólico ocorre mediante sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos influenciando assim outros sistemas do organismo animal.

As adipocinas são substâncias biologicamente ativas liberadas abundantemente pelos adipócitos. Dentre estas moléculas podemos citar a leptina que apresenta importante ação na regulação do balanço energético, atuando em núcleos hipotalâmicos estimulando ou inibindo a expressão de neuropeptídeos ligados a ingestão alimentar; a adiponectina, que ao contrário das demais adipocinas, atua como fator protetor, com função anti-aterogênica e antiinflamatória; além de resistina, visfatina e outras moléculas com características pró-inflamatórias, como é o caso do fator de necrose tumoral (TNF α) e interleucina 6 (IL-6) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; WAJCHENBERG , 2000).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo e os adipócitos são os únicos tipos celulares especializados no armazenamento de lipídeos na forma de triacilglicerol (TAG). Essas células possuem todas as enzimas e proteínas necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triacilglicerol em períodos em que a oferta é abundante e para mobilizá-los pela

lipólise quando existe um déficit calórico (AHIMA et al.; 2000; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Quando há maior oferta de nutrientes, como no período pós-prandial, ocorre aumento da liberação de insulina que estimula a lipogênese. O armazenamento de lipídeos e sua incorporação em TAG dependem da captação de ácidos graxos contidos nos quilomícrons. No tecido adiposo, os quilomícrons sofrem ação da lipase de lipoproteínas (LPL) que degrada os triacilgliceróis dos quilomícrons e os ácidos graxos então liberados são transferidos para os adipócitos (CURI, 2009). Neste processo, reações bioquímicas em cadeia que têm início a partir de substratos lipídicos resultam em biossíntese e esterificação de ácidos graxos (AG) para a formação de triacilgliceróis (TAG) que são incorporados e armazenados na gota lipídica do adipócito.

Em períodos de jejum, em que ocorre menor disponibilidade de ácidos graxos e triacilgliceróis, o processo de lipólise é ativado e o conteúdo energético armazenado anteriormente sob forma de triacilgliceróis é hidrolisado em diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG) para finalmente ocorrer liberação de três moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol por molécula de TAG para ser utilizado como fonte de energia. (YEAMAN, 2004; LAFONTAN et al., 2009).

O processo de lipólise é dependente da ativação da enzima lipase hormônio sensível (HSL) por meio de uma fosforilação realizada pela cinase protéica A (PKA) e ocorre, principalmente, mediante estimulação por catecolaminas quando há grande demanda energética, ou no estado de jejum.

A atividade funcional do tecido adiposo, tanto em condições normais como patológicas, demonstram forte correlação com mecanismos circadianos. Os níveis circulantes de adipocinas, como a adiponectina e a leptina, apresentam um perfil oscilatório num período de 24 horas, assim como a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF α) (GIMBLE e FLOYD 2009; YILDIZ et al., 2004). Dados apontam que a desregulação circadiana está correlacionada com aumento do risco de obesidade e de comorbidades: doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, resistência a insulina, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (HOLMBACK et al., 2002; DI LORENZO et al., 2003)

1.2 Glândula pineal e melatonina.

A glândula pineal é uma estrutura única que tem sua origem de uma evaginação do diencéfalo, situada em sua margem posterior e acima dos colículos superiores em humanos. Foi descoberta há quase 2000 anos, quando, em 130-230 DC, o médico grego Galeno de Pérgamo descreveu sua localização e a nomeou de glândula pineal. Muitas funções foram atribuídas a esta estrutura durante esses anos, desde órgão vestigial, sem função alguma, até a interpretação cartesiana de “sede da alma”. No entanto, foi apenas na década de 1950 que a glândula ganhou importância no “mundo” das ciências biológicas, uma vez que, nessa época, foi demonstrada a associação da melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, com funções endócrinas.

A pineal, mesmo tendo perdido ao longo da evolução sua capacidade de ritmicidade endógena própria, ainda é considerada como um órgão endócrino ativo através da ação do seu hormônio.

Como dito acima, esta glândula produz e sintetiza a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) que é um composto orgânico do grupo das indolaminas que, por possuir em sua molécula os agrupamentos acetil e metoxi, apresenta uma característica anfifílica, ou seja, é tanto hidro- como lipossolúvel. Assim, graças a estas características de solubilidade, a melatonina pode atingir todos os compartimentos do organismo.

Figura 1: Estrutura química da melatonina.

A produção de melatonina está sob controle de um relógio mestre localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) no hipotálamo anterior (SIMONNEAUX et al., 2004; RUSAK e ZUCKER, 1979). Esse núcleo recebe informações dos

fotorreceptores presentes na retina a partir da via retino-hipotalâmica, e através de projeções se conecta ao núcleo paraventricular hipotalâmico. O NSQ controla, ao longo das 24 horas, a atividade da via neural responsável pela síntese da melatonina e, dessa forma, pode-se afirmar que este hormônio apresenta um ritmo diário e sazonal de secreção e que sua produção é controlada pelo ciclo de iluminação ambiental característico do dia e noite.

A síntese da melatonina na glândula pineal ocorre a partir do aminoácido triptofano, o qual é convertido em serotonina por processos de hidroxilação e descarboxilação (REITER, 1991). Em seguida, ela é acetilada a N-acetilserotonina e, posteriormente, O-metilada resultando assim na molécula de melatonina. As enzimas responsáveis pelas duas etapas finais de acetilação e metilação são a aril-alquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) e a hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT), respectivamente.

A AA-NAT, que é considerada a enzima passo-limitante na via de síntese da melatonina, tem atividade dependente de estimulação noradrenérgica (ZAWILSKA e SADOWSKA, 2002), e apresenta um robusto ritmo diário, atingindo concentrações 100 vezes superiores na fase de escuro ambiental, quando comparado à fase de claro. Esta variação diária na concentração faz com que a redução dos níveis de serotonina na fase escura seja acompanhada por aumento das concentrações de N-acetilserotonina e melatonina. Já, o ritmo da segunda enzima é menos evidente, mas sabe-se que a HIOMT participa da regulação sazonal da produção de melatonina (RIBELAYGA et al., 2000).

Através da ação da melatonina, pode-se dizer que a glândula pineal exerce uma variedade de funções sobre a fisiologia humana, podendo atuar como uma glândula endócrina, como um transdutor de sinais e como um regulador pulsátil de hormônios. (MACCHI e BRUCE, 2004).

Figura 2: Principais etapas da síntese de melatonina
Fonte: (GANGULY et al., 2002)

A produção da melatonina é controlada por sistemas endógenos com ritmo circadiano, ou seja, sua síntese e secreção ocorrem predominantemente à noite enquanto que a estimulação luminosa ambiental suprime tal produção (ARMSTRONG, 1989; CIPOLLA-NETO e AFECHE, 1999). Dessa forma, sua secreção é proporcional à duração do período escuro, exibindo um padrão cíclico de secreção com baixos valores durante o dia e altos valores durante a noite.

Tais características de secreção determinam o papel fisiológico da glândula pineal que é sinalizar para o meio interno, pela presença ou ausência de melatonina nos líquidos corporais, se é dia ou noite no meio exterior e também sinalizar, pelo perfil diário do hormônio, qual a estação do ano. Dessa forma, através da secreção da melatonina, pode-se afirmar que a pineal está envolvida na modulação de diversas funções fundamentais para a sobrevivência dos organismos, conferindo ritmos a uma série de funções neuroendócrinas que modulam, por exemplo, o ciclo

sono-vigília e a atividade reprodutora e metabólica de várias espécies (BARTNESS e GOLDMAN, 1989).

Muitos trabalhos apontam que a melatonina apresenta atuação em diversos sistemas do organismo. Diante disso, pode-se destacar o envolvimento deste hormônio na regulação de ritmos circadianos de processos fisiológicos e neuro-endócrinos, função reprodutiva de mamíferos (MACCHI e BRUCE, 2004; ARENDT, 1986), na associação temporal e possível interação da melatonina com o sono e temperatura corporal, mostrando que o ritmo de declínio da temperatura corporal durante uma noite normal é parcialmente modulado pelo aumento endógeno de melatonina (CAGNACCI, 1996), da função imuno-modulatória devido a sua ação no sistema imunológico (CAROLEO et al., 1992; STEINHILBER et al., 1995), da função oncostática (COC et al., 1998; TAN et al., 1994), da função de indução da diferenciação dos osteoblastos (ROTH et al., 1999), da função vaso-reguladora (DOOLEN et al., 1998; VEERMAN et al., 1995), da excelente ação antioxidante e antienvhecimento (REITER, 1998; REITER, 1992) e, ainda, a sua secreção pode ser afetada por desordens psiquiátricas e neurológicas (FIORINA et al., 1996).

Como visto, a melatonina desempenha diversas funções nos seres vivos, e grande parte dessas funções são mediadas por receptores. Nos mamíferos, já foram caracterizados três tipos de receptores de membrana para melatonina, sendo eles MT₁, MT₂ E MT₃. Os receptores de alta afinidade MT₁ e MT₂ pertencem à superfamília dos receptores ligados à proteína G possuindo sete alças transmembrânicas ligando-se à proteína G_i e promovem uma redução na geração citoplasmática do AMPc.

O receptor MT₁, além de ligar-se à G_i, tem afinidade pela proteína G_{q/11} que lhe confere a característica de poder aumentar a produção de diacilglicerol e IP₃, podendo resultar em maior concentração intracelular de cálcio e atividade da PKC. Por outro lado, está demonstrado em vários sistemas que a melatonina, *mediada* pelo receptor MT₁, pode ativar correntes retificadoras de potássio, diminuindo a despolarização celular e resultando em uma redução do influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Os mecanismos mobilizados pela G_i quando o receptor MT₂ é ativado podem resultar em uma redução do GMPc (PETIT et al., 1999), além de implicar na mobilização de dois mecanismos de transdução intracelular: um dependente do componente α (inibição da adenilato ciclase) e outro

dependente do componente $\beta\gamma$, resultando na ativação da fosfolipase C (MACHENZIE et al., 2002; BRYDON et al., 1999; ROKA et al., 1999).

Os receptores de alta afinidade estão distribuídos por todo o organismo desde o sistema nervoso central, onde está presente em várias estruturas, até órgãos e tecidos da periferia.

O terceiro tipo de receptor de membrana existente em mamíferos é o MT₃, um receptor cuja estrutura molecular é muito parecida com uma enzima, a quinona redutase, e cujas ações não estão completamente esclarecidas (MACKENZIE et al., 2002; NOSJEAN et al., 2000).

Lima e colaboradores (1994 e 1998) relataram também que a melatonina atua sobre o metabolismo de carboidratos aumentando a sensibilidade à insulina de adipócitos isolados medida através de testes de captação de glicose e que a pinealectomia leva ao desenvolvimento da resistência à insulina dependente da redução considerável na síntese e expressão gênica dos transportadores de glicose (GLUT 4), em adipócitos de ratos. Quando os animais pinealectomizados passaram por um tratamento de reposição com melatonina observou-se que o conteúdo de GLUT 4 foi restaurado comparado aos animais que apenas receberam veículo.

Outro estudo ainda evidenciou que a pinealectomia causou resistência insulínica e hipercorticosteronemia em diferentes horários do dia e ainda provocou uma alteração diária nos parâmetros metabólicos dos adipócitos isolados resultando num quadro de inadequação entre os requerimentos energéticos e a capacidade de mobilização de acordo com o ciclo diário de atividade-reposo (ALONSO-VALE et al., 2004). Esse mesmo efeito de desorganização rítmica provocado pela pinealectomia também foi constatada quando se estudou a resposta secretória de insulina em células pancreáticas isoladas frente a um estímulo glicêmico (PICINATO et al., 2002).

Outros estudos ainda apontam que a melatonina tem um importante papel na regulação da massa corpórea e balanço energético (BARTNESS et al., 1985; RASMUSSEN et al., 2001), podendo atuar diretamente nos adipócitos através de receptores específicos MT1 e MT2 (ALONSO-VALE et al., 2006). Pessoas que apresentam uma alteração na secreção de melatonina, como, por exemplo, aquelas que possuem um estilo de vida noturno, podem ter um risco aumentado de problemas de saúde, incluindo a obesidade e o diabetes (QIN et al., 2003).

1.3 Ritmos circadianos

Os ritmos biológicos são modificações endógenas e periódicas que acontecem nos seres vivos e possibilitam melhor adaptação ao meio ambiente (MENNA-BARRETO, 1997). Tais modificações ocorrem por mudanças na fisiologia e no comportamento dos organismos o que lhes permite antecipar a regulação de sua biologia, decorrente de mudanças previsíveis no ambiente (JOHNSTON et al., 2009).

Os ritmos biológicos podem ser classificados de acordo com o período de repetição do evento considerado, a saber: ritmos circadianos, com período de 24 ± 4 h; ritmos ultradianos, com período menor do que 20h e ritmos infradianos com período maior do que 28h.

Um ritmo biológico pode estar ajustado a ciclos geofísicos, como, por exemplo, o ciclo sono-vigília que é modulado pelo ciclo diário de claro-escuro. Além dos ciclos geofísicos, um ritmo pode estar regularmente sob a influência de outros ritmos biológicos do próprio organismo ou de outros organismos mostrando que os ritmos não ocorrem de forma isolada no ambiente, mas recebem pistas temporais que contribuem para sobrevivência do indivíduo e o seu sucesso reprodutivo (ROTENBERG, 1997).

As pistas temporais promovem o ajuste dos ritmos, sincronizando-os através de dois mecanismos: arrastamento e mascaramento. No arrastamento, o ajuste temporal de um ritmo ocorre pela ação de outro ritmo. Mais comumente, refere-se ao processo de ajuste temporal de organismos a ciclos ambientais (como a sincronização do ritmo da temperatura central pelo ciclo claro/escuro ambiental). Pode-se dizer que um ritmo está arrastado/sincronizado quando mantém relações de fase estáveis com o ciclo arrastador/sincronizador.

Já, no mascaramento, fatores ambientais podem ter ação direta sobre o ritmo expresso, modificando a expressão de um ritmo biológico sem que haja envolvimento do relógio biológico. Em condições experimentais, tal mecanismo poderia ocultar o verdadeiro sincronizador. No entanto, a possibilidade de responder diretamente a um estímulo ambiental, sem que necessariamente seja um ciclo, proporciona aos organismos uma flexibilidade que não lhes é permitida nos mecanismos rígidos do arrastamento e dá ao mascaramento um importante papel na

adaptação temporal, atuando então como agente da plasticidade (MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997).

A importância da manutenção da ritmicidade está baseada nas evidências de que uma relação temporal constante entre os diversos ritmos fisiológicos leva à determinação de uma ordem temporal interna imprescindível à saúde do organismo. Assim, alterações na organização temporal estão envolvidas na etiologia de várias doenças e na redução da expectativa de vida do indivíduo.

Além disso, os ritmos biológicos são importantes para manutenção da homeostasia do organismo por permitir a temporização adequada dos processos biológicos em antecipação às mudanças no meio externo tais como a alternância do dia/noite ou das estações do ano, por exemplo.

O estudo realizado por Alonso-Vale et al. (2008) demonstrou que a exposição rítmica à melatonina em cultura de adipócitos influencia a atividade metabólica dos adipócitos, mostrando que há um aumento significativo na taxa lipolítica quando a melatonina está ausente no meio de cultura.

Além disso, Borges-Silva et al. (2005) mostraram que a pinealectomia aumenta a resposta lipolítica dos adipócitos quando estes são estimulados com isoproterenol. E outros trabalhos ainda mostraram que a melatonina apresenta em efeito inibitório sobre a lipólise basal (*in vitro*) em adipócitos da região inguinal (ZALATAN et al., 2001). Quando se utiliza a adrenalina como agente lipolítico, observa-se que ocorre uma variação diurna rítmica na sensibilidade do adipócito. Tal ritmicidade persiste em testes *ex vivo* sugerindo que seja da natureza intrínseca dos adipócitos exibir uma variação diária (SUZUKI et al., 1983).

Em relação à lipogênese, estudos em nosso laboratório, revelaram que adipócitos primários isolados em cultura tratados intermitentemente com melatonina apresentaram queda na capacidade de incorporação de glicose em lipídeos(em resposta à insulina) quando a melatonina estava ausente. Quando a melatonina estava presente, este hormônio facilitou o processo de lipogênese, uma vez que observou-se aumento na taxa de incorporação de glicose em lipídios, indicando que a presença cíclica e intermitente da melatonina pode modular este processo metabólico. Estudos com animais pinealectomizados mostraram que as taxas de incorporação de substratos como glicose ou acetato em lipídeos não foram afetadas pela pinealectomia em animais sedentários (BORGES-SILVA et al., 2005).

Quando se chama a atenção para os ritmos metabólicos do tecido adiposo, há evidências que mostram uma variação diária intensa nas taxas de lipólise e lipogênese em mamíferos. Quando os animais (ratos) estão dormindo, ou seja, os níveis de melatonina são baixos, as taxas lipolíticas aumentam resultando em um aumento na liberação de ácidos graxos não esterificados. Em contraste, quando os animais estão acordados e o nível plasmático de melatonina é maior, as taxas de lipólise diminuem e ocorre um aumento concomitante do processo de lipogênese (BRAY e YOUNG, 2007; SUZUKI, 1983).

Dados que mostram que a expressão dos *clock genes*, genes controladores no relógio biológicos, está diretamente envolvida no padrão circadiano da expressão de hormônios como a leptina e ghrelina independente da ingestão alimentar (KALRA et al., 2003), que a expressão tanto de enzimas lipolíticas e lipogênicas apresentam uma grande variação rítmica diária (BRAY e YOUNG, 2007), que trabalhadores noturnos podem ter dislipidemias, e que a pinealectomia pode resultar em resistência à insulina e, até mesmo, em ganho de peso, indicam que alterações na ritmicidade circadiana podem promover o desenvolvimento da obesidade.

Assim, o presente trabalho tem como proposta demonstrar a existência de um perfil circadiano da lipólise e lipogênese, uma vez que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que demonstrasse a existência do perfil diário desses processos metabólicos através de testes que avaliassem as taxas lipolíticas e lipogênicas em vários horários do dia de modo a se obter uma cobertura abrangente do perfil circadiano quanto os propostos pelo presente trabalho. Foram realizados ensaios biológicos pontuais de quatro em quatro horas (5h30min; 6h30min; 10h; 14h; 18h; 22h e 2h). Os horários da 5h30min e 6h30min da manhã correspondem ao momento de transição entre a fase escura para a fase clara. Além disso, a caracterização circadiana desses processos é de grande relevância para o entendimento da fisiologia metabólica do tecido adiposo. Já o estudo utilizando animais pinealectomizados ganha importância uma vez que já foi demonstrada a grande atuação da melatonina na regulação de processos metabólicos, inclusive mostrando que sua presença ou ausência interferem, *in vitro*, nas taxas de lipólise e lipogênese.

2 OBJETIVOS

Caracterizar o perfil circadiano, através da realização de ensaios que ocorrerão de quatro em quatro horas (5h30min; 6h30min; 10h; 14h; 18h; 22h e 2h), da lipólise e lipogênese, no tecido adiposo branco peri-epididimal, em ratos pinealectomizados e intactos. Os ensaios biológicos avaliarão a atividade lipolítica e a incorporação de glicose marcada (D-[U-¹⁴C]-Glicose) em lipídeos de adipócitos isolados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

Ratos machos Wistar com 7 semanas de idade foram fornecidos pelo Biotério Central do ICB/USP e mantidos durante 3 semanas no biotério de experimentação do departamento de biofísica e fisiologia. Estes foram acondicionados em caixas coletivas de polipropileno (46x24x20 cm com 2 ou 3 animais/caixa), sob condições de temperatura ambiental controlada de $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminação escuro/claro 12/12h e exaustão de amônia controlada. Os animais receberam ração balanceada padrão Nuvital® (com composição seguindo as recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA para alimentos de ratos de laboratório) e água *ad libitum*.

3.2 Procedimentos experimentais

Figura 3: Desenho experimental.

3.2.1 Pinealectomia

Assim que os animais completaram 10 semanas de idade, foi realizada a pinealectomia. O procedimento foi o seguinte: Os animais foram anestesiados com uma mistura de Anazedan® (1,7 ml) e Dopalen® (5,0 ml) (0,15 ml/100 g de peso), e submetidos a cirurgia de acordo com o método de Hoffman e Reiter (1965). Os animais já anestesiados foram posicionados em um aparelho estereotáxico para pequenos animais e uma abertura sagital foi feita no escalpo dos animais a fim de expor a sutura lambdóide. Por meio de uma broca circular, uma perfuração em forma de disco foi feita sobre a sutura e uma peça em forma de disco do osso foi removida delicadamente. Posteriormente, a glândula pineal (que fica logo abaixo da confluência venosa posterior) foi retirada com auxílio de uma pinça fina. Após um breve hemostasia, recolocou-se o disco ósseo na abertura feita no crânio e o escalpo foi suturado.

3.3 Experimentos *ex vivo*

Um mês depois da cirurgia, ou seja, quando os animais estavam com 14 semanas de idade, eles foram anestesiados com Thiopentax® (tiopental sódico 1,0 g) e sacrificados por decapitação, tal procedimento ocorreu em diferentes horários: 6h30min, 10h, 14h, 18h, 22h, 2h, 5h30min.

Para a retirada dos tecidos, foi realizada uma laparotomia mediana e em seguida foram removidos os tecidos adiposos subcutâneo (SC), retroperitoneal (RP) e peri-epididimal (PE) da região.

Somente os coxins da gordura PE foram retirados para o isolamento dos adipócitos, e submetidos, *ex vivo*, a testes biológicos para avaliação das taxas de incorporação de D-[U-¹⁴C]-glicose em lipídeos e determinação das taxas de lipólise basal e estimulada por isoproterenol. Os adipócitos passaram ainda por análises de mensuração do seu diâmetro, para a determinação do volume.

3.3.1 Isolamento dos adipócitos e determinação do seu tamanho

Os adipócitos foram isolados mediante a técnica de digestão do tecido pela collagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às condições laboratoriais. Em resumo, o coxim gorduroso PE (1 g) foi retirado, picado em finos fragmentos e incubado em tampão digestivo (DMEM/HEPES 20 mM/BSA 4%, collagenase II – Sigma - 1,0 mg/mL, pH=7,40) por cerca de 60min a 37 °C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, as amostras foram filtradas em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavadas por três vezes com 25 mL de tampão EARLE/HEPES 20 Mm/BSA 1%, piruvato de sódio 1mM, sem glicose, pH 7,4 e mantido a 37 °C (tampão EHB). Para determinação do tamanho celular, alíquotas de suspensão celular foram fotografadas em microscópio óptico acoplado a câmera digital 1.3MP (Moticam 1000 - MOTIC). Utilizou-se o programa Motic-Images Plus 2.0 para medição da área transversal celular, da qual se obteve o raio celular médio (foram medidas 50 células/animal/tecido). A partir deste valor, assumindo-se que o adipócito isolado é esférico, foi calculado o volume e a área de superfície celular média de acordo com as fórmulas proposta por Fine e Digirolamo

(1997). O número de adipócitos do tecido foi determinado pela razão: massa total de tecido /massa média do adipócito.

3.3.2 Teste de incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em lipídeos.

Adipócitos diluídos a uma concentração final de 10% (v:v) em tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1%/glicose 2 mM, pH=7,45 a 37 °C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno (17x100 mm) contendo 5 µL de D-[U-¹⁴C]-glicose (1850 Bq/tubo), com ou sem insulina na concentração final de 10 nM. Estes tubos foram vedados com tampas de borracha, enriquecidos de uma atmosfera com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ e incubados por 60min em banho-maria a 37 °C.

Em seguida, foi realizada a extração dos lipídeos mediante a adição de 2,5 mL de reativo de Dole (isopropanol:n-heptano:H₂SO₄ 8N, 4:1:0,25 v:v:v) no meio de incubação (DOLE, MEINERTZ, 1960). Agitou-se a mistura por 4-5 vezes (sessões de 10 segundos) em vórtex durante 30 minutos. Ao final do período, foram adicionados 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada. Após a agitação em vórtex, deixou-se a mistura decantar e alíquotas de 0,5 mL da fase superior (contendo os lipídeos extraídos no n-heptano) foram transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLumeTM, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada (LIMA, BAO, GARVEY, 1994; RODBELL, 1964). Os resultados serão expressos em nmol.10⁻⁶ cels⁻¹. h⁻¹.

3.3.3 Incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em ácido graxo de triacilgliceróis

Da mistura composta por TAG previamente obtida no teste de incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em lipídeos, foram retirados 500 µL, seguido por secagem completa utilizando-se N₂ gasoso. Após este procedimento, adicionou-se 1 mL de etanol (95%) e 250 µL de KOH (40%), os tubos de ensaio foram frouxamente tampados e colocados em banho-maria à 60 °C por 1 hora. Em seguida, o material foi resfriado à temperatura ambiente por aproximadamente 10min e, logo após, adicionou-se 2 mL de HCL (3N) e 2mL de n-heptano. Esta mistura foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso por 10min. Uma amostra de 500

μL da fase superior desta mistura foi retirada e transferida para um *vial* contendo 2,5 mL de líquido de cintilação que foi finalmente levado ao contador beta por 5min.

3.3.4 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol

Adipócitos isolados foram incubados em tampão Earle/Hepes 20 mM/BSA 1% com glicose 5mM, pH 7,4 e tratados previamente por 30min com adenosina ($0.2 \mu\text{M}$) que é um potente inibidor da lipólise. Como os adipócitos apresentam espontaneamente certo grau de lipólise, este tratamento (adenosina) evita esta ocorrência durante o preparo do ensaio. Em seguida, acrescentou-se adenosina desaminase (enzima que degrada adenosina) (20 um/mL) para liberar o processo lipolítico e incubou-se por mais 30min. A seguir, um grupo de tubos utilizados para a determinação de glicerol liberado de forma não específica (constituído por tubos que não receberão o isoproterenol [agente lipolítico] ou ácido ascórbico) foram retirados do banho e mantidos em banho de gelo enquanto o teste ocorria. Como há uma liberação não específica de glicerol antes mesmo de começar o teste com o agente lipolítico (isoproterenol), a determinação da liberação não específica é necessária e o valor desta determinação é descontado do valor obtido nos demais tubos.

Para a realização do teste, foi adicionado isoproterenol $1 \mu\text{M}$ para se obter a lipólise maximamente estimulada ou o diluente contendo ácido ascórbico para se determinar a lipólise espontânea (basal); o tempo de incubação foi de 60min a 37°C e ao final, o volume total ($200 \mu\text{l}$) do meio foi centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 0°C por 5min a 7000 rpm. Alíquotas ($120 \mu\text{L}$) do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células pelo método enzimático-colorimétrico. A determinação do glicerol é, portanto, o indicador da atividade lipolítica.

3.4 Tratamento estatístico dos dados

Os dados foram analisados pelo programa *Microsoft Excel 2007*[®] e GraphPad Prism 5.0, utilizando-se análise de variância *Anova one way* para comparação entre horários dentre de um grupo e *Anova two way* para análise da

influência dos fatores pinealectomizados e controles intactos. O perfil diário foi estudado mediante estudos dos resultados analisados pelo programa COSINOR.

4 RESULTADOS

4.1. Avaliação do peso corporal

A figura 4 mostra a evolução do peso corporal durante as quatro semanas após a cirurgia de remoção da glândula pineal. Observa-se que os pesos eram semelhantes nos animais antes da cirurgia. A pesagem, feita uma semana após a cirurgia, mostrou que os animais pinealectomizados ganharam menos peso que os controles, fato este derivado, possivelmente, do estresse pós-cirúrgico. A análise estatística dessa figura nos mostra a existência de uma diferença significativa no peso corporal entre os grupos (Controle X PINX) nesse ponto. Nas demais semanas, tal diferença estatística não foi mais observada.

Figura 4: Avaliação do peso corporal dos animais controle e pinealectomizados durante o período de quatro semanas. Cada valor corresponde a média $\pm$ EPM do grupo representativo, $n=20$. Diferenças significativas ($p<0,05$), (letras diferentes = há diferença estatisticamente diferente).

4.2 Consumo alimentar

Tanto o consumo alimentar como a ingestão hídrica foram acompanhados semanalmente. As figuras 5 e 6 revelam que não houve diferenças significativas entre os animais controle e pinealectomizados durante o período analisado.

Figura 5: Consumo Alimentar. As medidas foram realizadas uma vez por semana. Valores expressos em (g) correspondem à média $\pm$ EPM dos animais, (n=11). Não foram identificadas diferenças significativas

Figura 6: Ingestão hídrica. As medidas foram realizadas uma vez por semana. Valores expressos em ml correspondem à média $\pm$ EPM dos animais, (n=11). Não foram identificadas diferenças significativas.

4.3 Teste de incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em lipídeos em adipócitos isolados (lipogênese)

A figura 7 apresenta os resultados da taxa de incorporação basal em adipócitos isolados de animais controle e animais pinealectomizados.

Figura 7: Incorporação de Glicose em lipídeos de adipócitos em Tecido Adiposo PE. Grupos controle e pinealectomizados no estado basal. Quantificação ($\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{ células} \cdot \text{h}^{-1}$) realizada em teste biológico **ex vivo**, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde a média $\pm$ EPM do grupo representativo, $n=7$ para cada ponto. Diferenças significativas ($p<0,05$), (letras diferentes = há diferença estatisticamente significativa; letras iguais= não há diferença).

Já, a figura 8 apresenta os resultados da taxa de incorporação de glicose no estado maximamente estimulado pela insulina em adipócitos isolados de animais controle e animais pinealectomizados.

Figura 8: Incorporação de Glicose em lipídeos de adipócitos em Tecido Adiposo PE. Grupos controle e pinealectomizados estimulados com insulina. Quantificação ($\text{nmol} \cdot 10^6 \text{ células} \cdot \text{h}^{-1}$) realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média $\pm$ EPM do grupo representativo, $n=7$ para cada ponto. Diferenças significativas ($p<0,05$), (letras diferentes $p<0,05$; letras iguais= não há diferença).

Tanto na figura 7 quanto na 8, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e pinealectomizados.

A figura 9 apresenta o perfil diário do processo de lipogênese. A utilização do programa COSINOR nos mostra a existência de um perfil diário para este processo, no entanto o perfil não se caracteriza como circadiano tanto para a lipogênese basal quanto para a estimulada. E tal figura nos mostra, mais claramente que não há diferenças estatísticas entre grupos controles e pinealectomizados.

Figura 9: Perfil diário do processo de lipogênese basal e estimulada. Grupos controle e pinealectomizados. Quantificação ($\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{células} \cdot \text{h}^{-1}$) realizada em teste biológico *ex vivo*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média $\pm$ EPM do grupo representativo, $n=7$ para cada ponto.

4.4 Teste de incorporação de D-[U-¹⁴C]-Glicose em ácidos graxos (AG) de triacilgliceróis

Tanto a figura 10 quanto a 11 apresentam o perfil diário do processo de incorporação de glicose marcada no resíduo ácido graxo de TAG no estado basal e no estimulado por insulina. Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados (controle X pinealectomizados).

Observam-se, em ambas as figuras, diferenças estatisticamente significativas entre alguns horários analisados do grupo controle, tanto no estado basal quanto no estimulado pela insulina. Já essa diferença, entre os horários, desaparece nos animais pinealectomizados.

Figura 10: Incorporação de Glicose em resíduo AG de TAGs em Tecido Adiposo PE. Situação basal. Quantificação ($\text{nmol. } 10^{-6} \text{ células. h}^{-1}$) realizada em teste biológico **ex vivo**, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média $\pm$ EPM ($n=7$ para cada ponto), (letras diferentes = $p<0.05$; letras iguais= não há diferenças entre si).

Figura 11: Incorporação de Glicose em resíduo AG de TAGs em Tecido Adiposo PE. Pós-estimulação máxima com insulina. Quantificação ($\text{nmol. } 10^{-6} \text{ células. h}^{-1}$) realizada em teste biológico *ex vivo*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média $\pm$ EPM ($n=7$ para cada ponto). (letras diferentes = $p<0.05$; letras iguais= não há diferenças entre si).

Figura 12: Perfil diário do processo de incorporação de glicose em ácidos graxos de TAGs nos estados basal e estimulado. Grupos controle e pinealectomizados. Quantificação (nmol. 10⁶ células. h⁻¹) realizada em teste biológico *ex vivo*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM (n=7).

4.5 Avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol

As figuras 13 e 14 mostram os resultados da atividade lipolítica basal e da estimulada por isoproterenol.

Observa-se, em ambas as figuras, que tanto a lipólise espontânea (basal) e a estimulada por isoproterenol não diferem estatisticamente entre os grupos controle e pinealectomizados.

Figura 13: Avaliação de Atividade Lipolítica Basal em Tecido Adiposo PE. Quantificação do glicerol liberado ($\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{células} \cdot \text{h}^{-1}$) no meio de incubação de adipócitos isolados. Cada valor corresponde à média $\pm$ EPM ($n=7$). (letras diferentes = $p<0.05$; letras iguais= não há diferença estatisticamente entre si).

Figura 14: Teste de Avaliação de Atividade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol em Tecido Adiposo Periepididimal. Grupos controle e pinealectomizados. Quantificação (glicerol liberado - nmol.10⁻⁶células.h⁻¹) realizada em teste biológico *in vitro*, a partir de adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde a média ± EPM do grupo representativo, n=7 para cada ponto. Diferenças significativas ($p < 0,05$), (letras diferentes = há diferença estatisticamente diferente; letras iguais= não há diferença estatisticamente diferente).

Mediante o programa COSINOR, detectou-se a existência de um perfil diário para o processo de lipólise, tanto para a basal quanto para a estimulada com isoproterenol, no entanto esse perfil não se caracterizou como circadiano. Este perfil é ilustrado pela figura 15. Em ambos os casos, a figura sugere um aumento da atividade lipolítica, tanto a basal como a estimulada por isoproterenol, na primeira metade da manhã e na primeira metade da noite.

Figura 15: Perfil diário do processo de lipólise basal e estimulada. Grupos controle e pinealectomizados. Quantificação ($\text{nmol} \cdot 10^6 \text{células} \cdot \text{h}^{-1}$) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados. Cada valor corresponde à média $\pm$ EPM ($n=7$).

5 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram a existência de um perfil diário dos processos metabólicos lipogênese e lipólise, no entanto, através da utilização do programa COSINOR, chegamos a conclusão que não se trata de perfis circadianos, ou seja, o ritmo apresentado não ocorre num período de $24h \pm 4h$. Também é apontado pela análise estatística, que não há diferença estatística entre os grupos controle e pinealectomizados, evidenciando que a falta de melatonina no organismo dos animais, num período de quatro semanas, não alterou estas capacidades funcionais dos adipócitos isolados nos diferentes horários.

No entanto muitos dados da literatura científica a este respeito indicam que a glândula pineal possui uma forte influência sobre o metabolismo glicídico e lipídico do tecido adiposo. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que ratos pinealectomizados desenvolveram um quadro de intolerância à glicose e uma diminuição na responsividade celular dos adipócitos a insulina (LIMA et al., 1998). Animais pinealectomizados apresentaram perda de ritmo diário na habilidade do pâncreas em responder aos estímulos da glicose, e diminuição do conteúdo celular de GLUT 4 em tecido adiposo, mostrando assim, a influência da pinealectomia sobre o metabolismo de carboidratos.

Outro estudo (ALONSO-VALE et al., 2004) comprovou a existência da resistência à insulina em adipócitos isolados de animais pinealectomizados, com redução da capacidade máxima de captarem 2-desoxi-D-glicose sob estímulo da insulina. Esta deficiência funcional foi observada em diferentes horários do dia (8h, 16h e 23h). Nesse mesmo trabalho, em relação à capacidade de incorporação de glicose em lipídeos, no seu estado basal e estimulado pela insulina, os animais controles não apresentaram variações importantes ao longo do dia, diferentemente daquilo que foi encontrado no presente trabalho. Em animais pinealectomizados, houve um grande aumento na taxa de incorporação de glicose, estimulado pela insulina, no horário das 16h, fato este que também não foi verificado em nosso estudo. Diferentemente, o nosso trabalho realizou uma análise mais pormenorizada e abrangente do perfil diário mediante a inclusão de mais intervalos de tempo. Com esta última caracterização, fica mais clara a idéia de oscilação ao longo do dia e indica que, para a caracterização da existência, ou não, de um processo oscilatório

diário, é necessário aumentar-se o número de observações com a discriminação de mais horários. O presente estudo foi concebido para uma observação de pelo menos 6 diferentes horários, intervalados por 4 horas.

Em 2008, Alonso-Vale et al., utilizando cultura de adipócitos primários tratados de forma intermitente com melatonina, ou seja na presença ou ausência alternada de melatonina a cada 12 horas (12+/12- Mel), mostrou que os adipócitos apresentavam diferenças na incorporação de glicose em lipídeos em resposta à insulina da mesma forma que foi encontrado em animais pinealectomizados (LIMA et al., 1998). Verificou-se uma queda acentuada nesta capacidade funcional quando a melatonina estava ausente. Em presença de melatonina, a capacidade de incorporar glicose em lipídeos de adipócitos se elevou, o que parece sinalizar para uma “lógica” metabólica se considerarmos que a presença de melatonina, significando noite no meio de cultura, coincide com o período do dia em que o animal (rato) busca alimento e há, portanto, maior oferta de nutrientes para o organismo.

Esses trabalhos citados acima sugerem que a mensagem circadiana do relógio biológico para a periferia, em mamíferos, seja baseada em parte, no pico noturno da melatonina. No entanto, o presente trabalho não corrobora com tais evidências em relação aos processos de lipogênese e lipólise.

Quando se faz uma análise em relação a enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos (ALONSO-VALE et al., 2008), adipócitos tratados de forma intermitente com melatonina e insulina evidenciaram aumento significativo da expressão da enzima FAS (ácido graxo sintase) e uma forte tendência de aumento na expressão da enzima lipogênica G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase), somente quando havia insulina e melatonina presentes no meio, reforçando a idéia da importância da presença da melatonina para a intensificação do processo de lipogênese. Fukuda e Iritani (1991) mostraram que, quando os ratos começavam a se alimentar ativamente no período noturno, a quantidade de RNAm das enzimas lipogênicas acetil CoA carboxilase, FAS, málica e G6PDH aumentavam significativamente, em fígado de ratos, sendo que a variação diurna na quantidade de RNAm da FAS foi mais acentuada.

Em relação ao perfil diário de atividade de enzimas lipogênicas, Zardoya et al. (1994) investigaram a atividade destas mesmas enzimas no fígado de ratos e descreveram um ritmo circadiano sinusoidal, alcançando a máxima atividade

também à noite e a mínima durante o período de luz. Além disso, (Durgan, 2005, apud BRAY e YOUNG, 2007) dado apontam para a existência de um padrão circadiano na expressão de genes considerados componentes chaves do metabolismo lipídico quando analisados na gordura epididimal de ratos. O trabalho mostrou que existe maior expressão da enzima lipase de lipoproteínas (*lpI*) no final da tarde, um aumento acentuado (aproximadamente 4 horas após o anoitecer) da proteína transportadora de ácidos graxos (*fatp1*), um aumento progressivo durante o dia com o ápice de expressão da enzima acil-CoA sintetase 1 (*acs-1*) no início da noite e maior expressão da enzima lipase de triglicerídeos do adipócito (*atgl*) durante o período noturno.

Outra via responsável pelo fornecimento de ácidos graxos na síntese de TAG é a lipogênese *de novo*. Por meio dela, a síntese de novas moléculas de AG a partir de substratos não lipídicos se realiza. Em mamíferos, o principal substrato utilizado são os carboidratos e a sua ocorrência se dá notadamente no fígado e no tecido adiposo (Gondret et al., 2001). A análise desse processo no presente estudo mostrou que não houve diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

No entanto, quando analisamos o perfil diário da incorporação de glicose marcada em AG de triacilgliceróis dentro do grupo controle, verificamos a existência de diferenças significativas entre alguns horários analisados, mostrando um aumento da taxa de incorporação, principalmente no período da manhã (6h30min e 10h), e uma queda no início da noite. Quando a análise foi realizada nos animais pinealectomizados, a diferença entre horários encontrada nos animais controle desapareceu, indicando uma possível interferência da pinealectomia nesse processo.

Ainda em relação ao metabolismo lipídico, muitos trabalhos apontam para a relação da melatonina com o processo de lipólise, no entanto há dados na literatura que ainda são divergentes. Suzuki et al. (1983) estimularam adipócitos isolados com epinefrina e observaram um pico da atividade lipolítica na metade do período noturno (aproximadamente as 3h), ou seja, quando a melatonina está presente o processo de lipólise é estimulado. Já, Alonso-Vale et al. (2008), através de experimentos realizados em culturas de adipócitos primários, demonstraram que presença de melatonina inibe a lipólise e sua ausência a estimula. Este resultado corrobora o de outros autores que relataram que a melatonina apresenta um efeito

inibitório sobre o processo lipolítico (NG e WONG, 1986; ZALATAN, 2001). Este último autor verificou que concentrações fisiológicas de melatonina inibem diretamente a lipólise em adipócitos de ratos (via MT1 e MT2).

Tal fato ainda é fortalecido por estudos que apontam que a remoção da glândula pineal resulta em aumento da taxa lipolítica nos adipócitos quando estimulados com isoproterenol, ou seja, a ausência de melatonina facilitaria este processo (BORGES-SILVA, et al., 2005).

Quando avaliada a expressão gênica da enzima lipolítica HSL (ALONSO-VALE, et al., 2008), não foi verificada mudança no conteúdo de RNAm em decorrência da exposição dos adipócitos à melatonina. Por outro lado, a atividade lipolítica foi altamente modulada pela sua presença. Vários estudos demonstram que a modulação da atividade lipolítica raramente é acompanhada por mudança de expressão da enzima HSL, mas sim por mudança na sua atividade, que depende do seu grau de fosforilação (GONZÁLEZ-YANES, et al., 2006). A atividade da HSL bem como seu estado de fosforilação são modulados positivamente pela via da PKA dependente de AMPc (HOLM, 2003; BIMBAUM, 2003). O principal caminho de transdução do sinal da melatonina, via receptor de membrana, envolve a ativação da proteína G inibitória, inibindo a adenilciclase e, portanto, a geração de AMPc (PETIT, et al., 1999; MAZZUCCELLI, et al., 1996). Logo, é possível que a presença da melatonina, por diminuir o conteúdo de AMPc, iniba a atividade da HSL, e assim, a atividade lipolítica nas células.

Diante da análise do perfil diário da lipólise, um fato que nos causa estranhamento é a diminuição da lipólise às 14h. Esperar-se-ia que, nesse horário, o valor encontrado fosse maior, ou que pelo menos, estivesse no mesmo patamar que nos horários da noite, uma vez que foi mostrado por Alonso-Vale et al. (2008) que, na ausência de melatonina, a produção de glicerol é aumentada, e ainda porque é neste horário que os animais estariam no seu estado de jejum alimentar, ou seja, estariam sem oferta de nutrientes para o organismo, necessitando de uma demanda energética maior.

Em relação ao peso corporal avaliado durante as quatro semanas pós-cirurgia, os dados analisados não se mostraram estatisticamente diferentes entre os grupos controle e pinealectomizados. No entanto, dados da literatura apontam que a melatonina interfere na regulação da massa corporal em ratos, demonstrando a

íntima relação entre melatonina e peso corporal. Prunet-Marcassus et al. (2003) mostraram que ratos com aumento de peso induzido por dieta hiperlipídica e que receberam diariamente suplementação de melatonina tiveram ganho de peso significativamente menor que os animais controles que receberam a mesma ração. Além disso, nesse mesmo trabalho, também foi mostrado que a ausência de melatonina em animais pinealectomizados induziu a aumento de peso. Entretanto, este aumento desapareceu quando estes mesmos animais foram suplementados com melatonina. Outro dado ainda corrobora tal situação: a administração diária de melatonina diminui a gordura abdominal e os níveis de leptina em ratos de meia idade (RASMUSSEN, et al., 1999).

Muitos poderiam relacionar a perda de peso, em animais que receberam melatonina, com o aumento da atividade lipolítica, contudo evidências indicam que este hormônio tem ação inibitória sobre o processo lipolítico que ocorre no tecido adiposo branco. Para tentar explicar essa “contradição”, Atgié et al. (2009) mantiveram animais sob condições de dia curto (dias curtos e noites longas) e seu trabalho mostrou que, ao final de 11 semanas, os animais sob estas condições, haviam perdido peso. Ao analisar as taxas de lipólise entre seus grupos, verificaram que as diferenças não eram significativas e assim realizaram outros testes e demonstraram que a perda de peso nesses animais não estava relacionada com o aumento da atividade lipolítica e, sim, ligado a fatores relacionados a respostas antilipolíticas diminuídas nos adipócitos dos animais de dia curto, ou seja a responsividade a insulina estava levemente diminuída (não havia diferença estatística) e a atividade da enzima LPL (lipase de lipoproteína) estava bastante diminuída em animais com o dia curto. Desse modo, diante dos fatos, não devemos relacionar sumariamente perda ou ganho de peso com maior ou menor atividade lipolítica ou lipogênica, pois tal determinação muitas vezes não é cabível, pois outros fatores podem interferir nesse processo.

Muitos dos trabalhos citados acima demonstram que a pinealectomia provoca uma alteração diária nos parâmetros metabólicos dos adipócitos de forma a resultar num quadro de inadequação entre os requerimentos energéticos e a capacidade de mobilizá-los de acordo com o ciclo atividade-reposo. Além disso, a ausência da melatonina impede a capacidade de adaptação metabólica, extremamente necessária para que o animal possa enfrentar condições estressantes (como

exercício e jejum, por exemplo), e se adequar metabolicamente a estas situações. Dessa forma, a glândula pineal atuaria como um sincronizador interno do metabolismo energético e como um elo entre o meio ambiente e o organismo animal, funcionando em conjunto com o tecido adiposo como um grande sistema de adaptação metabólica aos desafios ambientais e ao estresse.

No entanto o presente trabalho, ao analisar em intervalos de quatro em quatro horas, o perfil diário dos processos de lipólise e lipogênese apenas avaliando o ciclo atividade-repouso e sem “desafiar” o organismo a períodos de estresse como o jejum ou exercício, mostrou a inexistência de diferenças significativas entre os grupos controle e pinealectomizados, indicando que, possivelmente, a glândula pineal, através do seu hormônio melatonina, não interfira de modo significativo nos perfis dos processos metabólicos analisados.

Embora tenhamos caracterizado um perfil diário dos processos de lipólise, lipogênese e de incorporação de glicose marcada em ácidos graxos (AG) de triacilgliceróis em adipócitos isolados, ao analisar os dados, verificamos que eles iam contra uma possível “lógica metabólica” dos organismos. Hipoteticamente, esta “lógica” indicaria que, durante a noite, em animais de hábitos noturnos, a taxa lipogênica é maior devido a maior oferta de nutrientes (pois é neste momento que os animais se alimentam), e durante o dia a taxa lipolítica é aumentada pois este é o horário de baixa atividade alimentar e, portanto, de maior necessidade de mobilização de substratos energéticos.

A partir disso, chegamos à conclusão de que, do ponto de vista cronobiológico, os testes empregados aqui, não conseguem reproduzir com fidedignidade aquilo que está ocorrendo dentro do organismo, pelos seguintes motivos: 1º: o tempo utilizado desde o isolamento celular dos adipócitos até os resultados dos testes analisados leva aproximadamente quatro horas, e este intervalo é um tanto elevado para analisar cronobiologicamente tais processos, 2º: devido ao grande intervalo de tempo, as mensagens endócrinas presentes no momento do sacrifício dos animais podem ter sido bastante atenuadas o que pode ter repercutido sobre os processos metabólicos dos adipócitos de modo a mascarar a atividade funcional destas células.

Dessa maneira, achamos que técnicas mais apropriadas devam ser empregadas para mostrar com maior clareza a existência do perfil diário dos processos de lipólise e lipogênese.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados conduzem às seguintes conclusões:

- ✓ Existe um padrão diário dos processos de lipólise e lipogênese, e que, no entanto, não se caracteriza como um ritmo circadiano;
- ✓ A pinealectomia não influencia o perfil diário dos processos metabólicos, lipólise e lipogênese, avaliada em adipócitos isolados da gordura PE de ratos Wistar adultos.
- ✓ Técnicas mais apropriadas devem ser utilizadas para demonstrar, cronobiologicamente, o perfil desses processos metabólicos.

REFERÊNCIAS*

ALONSO-VALE, M. I. C.; ANHE, G. F.; BORGES-SILVA, C. N.; ANDREOTTI, S.; PERES, S. B.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Pinealectomy alters adipose tissue adaptability to fasting in rats. **Metabolism**, v. 53, p. 500-506, 2004.

ALONSO-VALE, M. I. C.; BORGES-SILVA, C. N.; ANHE, G. F.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M. A.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. **Horm. Metab. Res.**, v. 36, p. 474-479, 2004.

ALONSO-VALE M. I. C.; ANDREOTTI S.; BORGES-SILVA C.N.; MUKAI, P. Y.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Intermittent and rhythmic exposure to melatonin in primary cultured adipocytes enhances the Insulin and dexamethasone effects on leptin expression. **J. Pineal Res.**, v. 41, p. 28-34, 2006.

ALONSO-VALE M. I. C.; ANDREOTTI S.; MUKAI P. Y.; BORGES-SILVA, C. N.; PERES, S. B.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. **J. Pineal Res.**, v. 45, p. 422-429, 2008.

AHIMA R. S.; FLIER J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, p. 327-332, 2000.

ARENDT, J. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. **Oxford Rev. Reprod. Biol.**, v. 8, p. 1-2, 1986

ARENDT, J. **Melatonin and the Mammalian Pineal Gland**. London: Chapman e Hill, 1995.

ARMSTRONG, S. M. Melatonin and circadian control in mammals. **Experientia**, v. 45, p. 932-938, 1989.

ATGIE, C.; SAUVANT, P.; AMBID, L.; CARPENE, C. Possible mechanisms of weight loss of Siberian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*) exposed to short photoperiod. **J. Physiol. Biochem.**, v. 65, p. 377-386, 2009

BARTNESS T. J.; WADE G. N. Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. **Neuro Biobehav Rev.**, v. 9, p. 599-612, 1985.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARTNESS, T. J.; GOLDMAN, B. D.; Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. **Experientia**, v. 45 p. 939-945, 1989.

BIMBAUM, M. J. Lipolysis: more than just a lipase. **The journal of cell biology**, v. 6, p. 1011-1012, 2003.

BRAY, M. S.; YOUNG, M. E. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. **Obes. Rev.**, v. 8, p. 169-181, 2007.

BRYDON, L.; ROKA, F.; PETIT, L.; COPPET, P.; TISSOT, M.; BARRET, P.; MORGAN, P. J.; NANOFF, C.; STROBERG, A. D.; JOCKERS, R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, p. 2025-2038, 1999.

BORGES-SILVA, C. N.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; ALONSO-VALE, M. I. C.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; PERES, S. B.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. **J. Pineal Res.**, v. 39, p. 178-184, 2005.

CAGNACCI, A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 200-213, 1996.

CAROLEO, M. C.; FRASCA D.; NISTICO G.; DORIA G. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. **Immunopharmacology**, v. 47, p. 81-89, 1992.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: AIRES M. M. **Fisiologia**. 2. ed. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 1999. p. 805-811.

COC, S.; FERNANDEZ, R.; GUEZMES, A.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4383-4390, 1998.

CURI, R. Integração do metabolismo. In: CURI, R.; PROCÓPIO, J. **Fisiologia Básica**. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 2009. p. 783.

DI LORENZO, L.; DE PERGOLA, G.; ZOCCHETTI, C.; L'ABBATE, N.; BASSO, A.; PANNACCIULLI, N.; CIGNARELLI, M.; GIORGINO, R.; SOLEO, L. Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p. 1353–1358, 2003.

DOLE, V. P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 235, p. 2595-2599, 1960.

DOOLEN, S.; KRAUSE, D. N.; DUBOCOVICH, M. L.; DUCKLES, S. P. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 345, p. 67-69, 1998.

FINE, J. B.; DI GIROLAMO, M. A simple method to predict cellular density in adipocyte metabolic incubations. **Intern. J. Obesity.**, v. 1, p. 764-768, 1997.

FIORINA, F.; LATTUADA, G.; PONARI, O.; SILVESTRINI, C.; DALLAGLIO, O. Impaired nocturnal melatonin excretion and changes of immunological status in ischaemic stroke patients. **Lancet.**, v. 347, p. 692-693, 1996.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FUKUDA, H.; IRITANI, N. Diurnal variations of lipogenic enzyme mRNA quantities in rat liver. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1086, n. 3, p. 261-264, 1991.

GANGULY, S.; CONN, S. L.; KLEIN, D. V. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. **Cell tissue Res.**, v. 309, p. 127-137, 2002.

GIMBLE, J. M.; FLOYD, Z. E. Fat circadian biology. **J Appl Physiol.**, v. 107, n. 5, p. 1629-1637, 2009.

GONDRET, F.; FERRÉ, P.; DUGAIL, I. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. **J. Lipid. Res.**, v. 42, p. 106-113, 2001.

GONZÁLEZ-YANES, C.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Signaling mechanisms regulating lipolysis. **Cellular signaling**, v. 18, p. 401-408, 2006.

HOFFMAN, R.A.; REITER, R.J. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. **Anat. Rec.**, v. 153, p. 19–22, 1965.

HOLM, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 1120-1124, 2003.

HOLMBACK, U.; FORSLUND, A.; FORSLUND, J.; HAMBRAEUS, L.; LENNERNAS, M.; LOWDEN, A.; STRIDSBERG, M.; AKERSTEDT, T. Metabolic responses to nocturnal eating in men are affected by sources of dietary energy. **J. Nutr.**, v. 132, p. 1892–1899, 2002.

KALRA, S. P.; BAGNASCO, M.; OTUKONYONG, E. E.; DUBE, M. G.; KALRA, P. S. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. **Regul. Pept.**, v. 111, p. 1-11, 2003.

JOHNSTON, J. D.; FROST, G.; OTWAY, D. T. Adipose tissue, adipocytes and the circadian timing system. **Obes. Rev.**, v. 10, p. 52-60, 2009. Supplement 2.

LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Prog. Lipid. Res.**, v. 48, n. 5, p. 275-297, 2009.

LIMA, F. B.; MATSUSHITA, D. H.; HELL, N. S.; DOLNIKOFF, M. S.; OKAMOTO, M. M.; CIPOLLA NETO, J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food, time of day and melatonin. **Braz. J. Med Biol Res.**, v. 27, p. 995-1000, 1994.

LIMA, F. B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; MORAES, S. M. ; HELL, N. S. ; OKAMOTO, M. M. ; SAAD, M. J. ; CARVALHO, C. R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 934-941, 1998.

MACKENZIE, R. S.; MELAN, M. A.; PASSEY, D. K.; WITT-ENDERBY, P. A. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. **Biochem. Pharmacol.**, v.63, p. 587-595, 2002.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 25, p. 177-195, 2004.

MAZZUCCHELLI, C.; PANNACCI, M.; NONNO, R.; LUCINI, V.; FRASCHINI, F.; STANKOV, B. M. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. **Brain. Res. Mol. Brain Res.**, v. 39, p. 117-126, 1996.

MENNA-BARRETO, L. O tempo na biologia. In: MARQUES N.; MENNA-BARRETO L. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Ed. Edusp, 1997. p. 18-21.

NG, T. B.; WONG, C. M. Effects of pineal indoles and arginine vasotocin on lipolysis and lipogenesis in isolated adipocytes. **J. Pineal Res.**, v. 3, p. 55-66, 1986.

NOSJEAN, O.; FERRO, M.; COGE, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J. M.; LEFOULON, F.; FAUCHERE, J. L.; DELAGRANGE, P.; CANET, E.; BOUTIN, J. A. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 31311–31317, 2000.

PETIT, L.; LACROIX, I.; DE-COPPET, P.; STROSBERG, A. D. ; JOCKERS, R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 633-639, 1999.

PICINATO, M. C.; HABER, E. P.; CARPINELLI, A. R.; CIPOLLA-NETO, J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rats. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 172-177, 2002.

PRUNET-MARCASSUS, B.; DESBAZEILLE M., BROS A., LOUCHE K., DELAGRANGE P., RENARD P., CASTEILLA L., PE´ NICAUD L.: Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 144, p. 5347-5352, 2003.

QIN, L. Q.; LI, J.; WANG, J.; XU, J. Y.; KANEKO, T. The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults, **Life Sci.**, v.73, p. 1467-1475, 2003.

RASMUSSEN, D. D.; BOLDT, B. M.; WILKINSON, C. W.; YELLON, S. M.; MATSUMOTO, A. M. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology**, v. 140, p. 1009-1012, 1999.

RASMUSSEN, D. D.; MITTON, D. R.; LARSEN, S. A.; YELLON, S. M. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. **J. Pineal Res.**, v. 31, p. 89-94, 2001.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Rev.**, v. 12, p. 151-180, 1991.

REITER, R. J. The ageing pineal gland and its physiological consequences. **Biossays**, v. 14, p. 169-175, 1992.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, p. 359-384, 1998.

RIBELAYGA, C.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX, V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **Am. J. Physiol.**, v. 278, p. 1339-1345, 2000.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipids. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 357-380, 1964.

ROKA, F.; BRYNDON, L.; WALDHOER, M.; STROSBURG, A. D.; FREISSMUTH, M.; JOCKERS, R.; NANOFF, C. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p. 1014-1024, 1999.

ROTENBERG, L. MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. Desenvolvimento da cronobiologia. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Ed. Edusp, 1997. p. 24-44.

ROTH, J. A.; KIM, B. G.; LIN, W. L.; CHO, M. I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 22041-22047, 1999.

RUSAK, B. ; ZUCKER I. Neural regulation of circadian rhythms. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 449-526, 1979.

SIMONNEAUX, V.; POIREL, V. J.; GARIDOU, M. L.; NGUYEN, D.; DIAZ-RODRIGUEZ, E.; PÉVET, P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. **Molecular Brain Research**, v. 120, p. 164-172, 2004.

STEINHILBER, D.; BRUNGS, M.; WERZ, O.; WIESENBERG, I.; DANIELSSON, C.; KAHLEN, J. P.; NAYERI, S.; SCHRADER, M.; CARLBERG, C. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7037-7040, 1995.

SUZUKI, M.; SHIMOMURA, Y.; SATOH, Y. Diurnal changes in lipolytic activity of isolated fat cells and their increased responsiveness to epinephrine and theophylline with meal feeding in rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)**, v. 29, p. 399-411, 1983.

TAN, D. Z.; POEGGELER, B.; REITER, R. J.; CHEN, L. D.; CHEN, S.; MANCHESTER, L. C.; BARLOW-WALSON, L. R. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by carcinogen safrole. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 215-218, 1994.

VEERMAN, D. P.; IMHOLZ, B.P.; WIELING, W.; WESSELING, K. H.; VAN, MONTFRANS, G. A. Circadian profile of systemic hemodynamics. **Hypertension**, v. 26, p. 55-59, 1995.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 697-738, 2000.

YEAMAM, S. Hormone – sensitive lipase- new roles for a old enzyme. **Biochem. J.**, v. 22, p. 379-411, 2004.

YILDIZ, B.O.; SUCHARD, M.A.; WONG, M.L; MCCANN, S.M.; LICINIO, J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 10434–10439, 2004.

ZALATAN, F.; KRAUSE, J. A.; BLASK, D. E. Inhibition of isoproterenol-induced lipolysis in rat inguinal adipocytes in vitro by physiological melatonin via a receptor-mediated mechanism. **Endocrinology**, v. 142, p. 3783-90, 2001.

ZAWILSKA, J. B.; SADOWSKA, M. Prolonged treatment with glucocorticoid dexamethasone suppresses melatonin production by pineal gland and retina. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 54, p. 61-66, 2002.

ZARDOYA, R.; DIEZ, A.; SERRADILLA, M. C.; MADRID, J. A.; BAUTISTA, J. M.; GARRIDO PERTIERRA, A. Lipogenic activities in rat liver are subjected to circadian rhythms. **Rev. Esp. Fisiol.**, v. 50, p. 239-44, 1994.

ANEXO - Tabelas

Lipogênese (estado basal)

Horários	Controle	Pinealectomizados
6h 30min	137,54 ± 6,04	111,81 ± 5,99
10h	143,24 ± 12,92	143,63 ± 15,71
14h	99,89 ± 7,53	97,48 ± 8,74
18h	147,91 ± 11,04	130,41 ± 10,39
22h	123,59 ± 6,98	114,62 ± 9,37
2h	118,02 ± 11,68	116,74 ± 11,04
5h 30min	163,96 ± 7,32	152,09 ± 8,43

Tabela 1 - Incorporação de Glicose em lipídeos em adipócitos de Tecido Adiposo PE. Grupos controle e pinealectomizados no estado basal. Quantificação (nmol. 10^6 células. h^{-1}) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM (n=7).

Lipogênese (estimulada pela insulina)

Horários	Controle	Pinealectomizados
6h 30min	187,71 ± 10,93	165,71 ± 13,23
10h	198,51 ± 14,53	194,33 ± 24,78
14h	135,05 ± 10,85	144,49 ± 13,08
18h	190,60 ± 21,97	176,26 ± 10,73
22h	138,10 ± 10,37	154,95 ± 10,59
2h	159,94 ± 13,59	176,75 ± 14,67
5h 30min	208,85 ± 10,88	214,71 ± 14,62

Tabela 2 - Incorporação de Glicose em lipídeos em adipócitos de Tecido Adiposo PE. Grupos controle e pinealectomizados estimulados com insulina. Quantificação (nmol. 10^6 células. h^{-1}) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde a média ± EPM (n=7).

Lipólise (estado basal)

Horários	Controle	Pinealectomizados
6h 30min	3778,56 ± 503,87	2725,87 ± 468,18
10h	4918,35 ± 390,63	4852,71 ± 352,99
14h	2572,42 ± 539,93	2832,69 ± 342,56
18h	4102,12 ± 369,62	3681,10 ± 383,74
22h	3736,73 ± 502,33	3551,51 ± 382,47
2h	3735,91 ± 449,24	3904,90 ± 428,99
5h 30min	3814,65 ± 696,45	3086,32 ± 631,93

Tabela 3 - Teste de Avaliação de Atividade Lipolítica no estado basal em Tecido Adiposo PE. Grupos controle e pinealectomizados. Quantificação (glicerol liberado - nmol. 10^6 células. h^{-1}) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde a média ± EPM (n=7).

Lipólise (estimulada com Isoproterenol)

Horários	Controle	Pinealectomizados
6h 30min	6053,81 ± 638,66	6654,48 ± 712,05
10h	6038,27 ± 661,69	6553,81 ± 535,53
14h	4732,56 ± 671,35	4668,42 ± 572,26
18h	5472,10 ± 222,38	5122,06 ± 537,12
22h	6004,66 ± 402,92	6008,65 ± 808,43
2h	5440,73 ± 546,61	5173,37 ± 538,94
5h 30min	5857,55 ± 468,51	6064,00 ± 965,29

Tabela 4 - Teste de Avaliação de Atividade Lipolítica estimulada com Isoproterenol em Tecido Adiposo PE. Grupos controle e pinealectomizados. Quantificação (glicerol liberado - nmol. 10^6 células. h^{-1}) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde a média ± EPM (n=7).

Incorporação de glicose em AG de triglicerídeos (estado basal)

Horários	Basal controle	Basal pinealectomizados
6h 30min	249,95 ± 15,07	189,12 ± 15,13
10h	262,30 ± 38,53	218,39 ± 11,30
14h	199,44 ± 14,50	163,94 ± 14,18
18h	180,68 ± 5,05	175,39 ± 5,98
22h	159,98 ± 14,62	164,57 ± 11,61
2h	185,60 ± 24,58	214,76 ± 29,89
5h 30min	201,39 ± 15,25	182,72 ± 25,81

Tabela 5 - Incorporação de Glicose em AG de Triacilgliceróis em Tecido Adiposo PE.
 Grupos controle e pinealectomizados no estado basal. Quantificação (nmol. 10⁶ células. h⁻¹) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde a média ± EPM (n=7).

Incorporação de glicose em AG de triglicerídeos (estimulada com insulina)

Horários	Controle	Pinealectomizados
6h 30min	255,90 ± 15,25	207,98 ± 14,86
10h	261,61 ± 34,87	222,48 ± 9,53
14h	203,09 ± 15,34	173,58 ± 16,45
18h	186,05 ± 4,67	183,83 ± 7,12
22h	167,18 ± 15,43	178,52 ± 12,83
2h	187,51 ± 24,00	229,24 ± 33,00
5h 30min	215,94 ± 12,39	197,39 ± 25,98

Tabela 6 - Incorporação de Glicose em AG de Triacilgliceróis em Tecido Adiposo PE.
 Grupos controle e pinealectomizados no estado estimulado pela insulina. Quantificação (nmol. 10⁶ células. h⁻¹) realizada em teste biológico **ex vivo**, em adipócitos isolados no dia do sacrifício. Cada valor corresponde à média ± EPM (n=7).