CAROLINE MENDES

MELATONINA E TERMORREGULAÇÃO

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

São Paulo
2017

CAROLINE MENDES

MELATONINA E TERMORREGULAÇÃO

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP.

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mendes, Caroline
Melatonina e termorregulação / Caroline Mendes; orientador José Cipolla Neto. -- São Paulo, 2017.
95 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Glândula pineal. 2. Melatonina. 3. Termorregulação. 4. Idosos. I. Cipolla Neto, José, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caroline Mendes

Título da Tese: Melatonina e termorregulação

Orientador(a): José Cipolla Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

pública realizada a ...../...../....., considerou

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **199** nas fls. **116** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Cipolla Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica"* do qual participam o(s) aluno(s) **Jéssica Andrade da Silva, Caroline Mendes, Rafael Maso Prévide, Ariane de Oliveira Turati, Angela Ramos Lobo, Rosana Fátima Dantas Ferreira, Ana Maria de Souza Lopes, Ronaldo Meira de Mello, Marco Taneda, Rafael Peres, Fernanda Gaspar do Amaral, Eliângela de Lima, Lia de Alencar Coelho,Daniella do Carmo Buonfiglio e os pesquisadores Fabio Bessa Lima, Silvana Bordin, Sara Schammah, Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Solange Castro Afeche, Edson Amaro Jr.,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **24.01.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 27 de janeiro de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Melatonina e a regulação do metabolismo energético***", registrado sob o protocolo nº ***86/2016***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***12/09/2016*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) *José Cipolla Neto***
- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*
- Membros da Equipe: *Luciana Tocci Belpiede, Fernanda Gaspar do Amaral (Pesquisador colaborador), Daniella do Carmo Buonfiglio (Pós-doutorando), Raysa Cerqueira Silva (Iniciação Científica), Rafaela Panaiotta Parthinos (Iniciação Científica), Lívia Clemente Motta Teixeira (Pós-graduando), Raphael Afonso de Matos (Pós-graduando), José Sinésio da Silva Junior (Pós-graduando), Caroline Mendes (Pós-graduando), Jéssica Andrade da Silva (Pós-graduando), Nityananda Portellada (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Melatonin and Energy metabolism: experimental studies***", protocol nº ***86/2016***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***9/12/2016*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) *José Cipolla Neto***
- Team members: *Luciana Tocci Belpiede, Fernanda Gaspar do Amaral (Colaborator Researcher), Daniella do Carmo Buonfiglio (Postdoctoral Researcher), Raysa Cerqueira Silva (Undergraduate Student), Rafaela Panaiotta Parthinos (Undergraduate Student), Lívia Clemente Motta Teixeira (Graduate Student), Raphael Afonso de Matos (Graduate Student), José Sinésio da Silva Junior (Graduate Student), Caroline Mendes (Graduate Student), Jéssica Andrade da Silva (Graduate Student), Nityananda Portellada (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Rattus norvegicus	*Wistar*	*Macho/Male*	*180-250 g*	*400*
	Wistar	*Fêmea/female*	*250 g*	*370*
	Goto-Kakizaki	*Macho/Male*	*250 g*	*480*
	Wistar	*Macho/Male*	*12 meses/months*	*100*
	Goto-Kakizaki	*Fêmea/female*	*250 g*	*120*

São Paulo, 13 de setembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao meu melhor professor, querido orientador e pai científico, Prof. Dr. José Cipolla Neto, principal pilar de minha formação acadêmica, a quem dedico minha mais efusiva admiração e mais sincero e profundo respeito;

À minha família, pelo amor, alegria e segurança de que jamais estarei sozinha, tendo vocês no meu coração;

Aos meus amigos, pelo companheirismo e plena felicidade por tê-los sempre ao meu redor. Em especial, à Luciana Tocci, Wilson Mitsuo, Ana Paula de Siena, Silvia Leonardo, Guilherme Gomes e Maryana Simas, por serem as melhores pessoas que eu tive a sorte de encontrar. Parafraseando Carl Sagan: "Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim, dividir um planeta e uma época com vocês";

Aos meus colegas de laboratório, agregados e colaboradores, pelos conselhos, ensinamentos, ajuda e amizade, ao longo de todos esses anos;

À nossa técnica de laboratório, Julieta Scialfa, por ser minha segunda mãe, tanto no âmbito científico, quanto no âmbito afetivo;

A todos os professores que já passaram pela minha vida, desde o jardim de infância até o doutorado, pela contribuição imprescindível de cada um, sem a qual eu estaria hoje na mais escura ignorância;

Aos meus roedores, por cederem a vida, involuntariamente, em prol da humanidade e da evolução científica;

Agradeço também a você, cidadão comum, que ao pagar seus impostos financiou, ainda que indiretamente, grande parte desta pesquisa. Retribuo-lhe agora, em forma de conhecimento e ciência;

E, finalmente, meu amor mais sublime e gratidão mais profunda, eu devoto a ELA!

Mãe, vencemos!

Agradeço em especial,

ao CNPq (140166/2013-0) **e à FAPESP (**2014/50457-0)**,**

pelo apoio financeiro.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa, que fez tua rosa tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

MENDES, C. **Melatonina e termorregulação.** 2017. 90 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A glândula pineal, via síntese e secreção de melatonina, desempenha diversas funções fisiológicas importantes, uma delas é o aumento da capacidade de termogênese do tecido adiposo marrom. Além dos depósitos adiposos clássicos (branco e marrom) existe ainda um terceiro tipo celular, as chamadas células adiposas beges, presentes no tecido adiposo branco, porém com características semelhantes aos adipócitos marrons, induzidas em um processo denominado "*browning*". Este processo está relacionado com a termogênese e com o aumento do gasto energético total. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da melatonina sobre a regulação da temperatura corporal em animais idosos obesos da linhagem Wistar que apresentam produção de melatonina prejudicada. Estes animais foram divididos em grupo controle e grupo suplementado com melatonina, e o protocolo experimental teve a duração de 16 semanas. Os principais resultados mostraram que os adipócitos marrons e beges atuam de forma coordenada e complementar para garantir a produção de calor de maneira adequada e que melatonina tem um papel importante nos mecanismos termorregulatórios, assegurando maior capacidade de suportar ao frio e, ainda, participando da regulação do balanço energético.

Palavras-chave: Glândula pineal. Melatonina. Termorregulação. Idosos.

ABSTRACT

MENDES, C. **Melatonin and thermoregulation.** 2017. 90 p. PhD thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The pineal gland, through the synthesis and secretion of melatonin, plays several important physiological functions, one of them is the increase of thermogenesis capacity of brown adipose tissue. In addition to classic adipose deposits (white and brown) there is also a third cell type, the beige adipose cells, present in white adipose tissue, but with similar characteristics to brown adipocytes, induced in a process called"*browning*". This process is related to thermogenesis and the increase of total energy expenditure. Thus, the aim of this study was to investigate the role of melatonin on the regulation of body temperature in elderly obese animals that have impaired production of melatonin. Male-Wistar were divided into control group and group supplemented with melatonin, and the experimental protocol lasted 16 weeks. The main results showed that brown and beige adipocytes act in a coordinated and complementary way to ensure adequate heat production and that melatonin plays an important role in the thermoregulatory mechanisms, ensuring greater capacity to withstand the cold and, also, participating in the regulation of the energy balance.

Keywords: Pineal Gland. Melatonin. Thermoregulation. Elderly.

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA - Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)

cDNA - Complementary deoxyribonucleic (ácido desoxirribonucleico complementar)

CEUA - Comissão ética no uso de animais

C - Controle (jovens)

CM - Controle melatonina (jovens)

Ct - Cycle Threshold (limiar do ciclo)

DNA - Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

DO - Densitometria óptica

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

G - Grama

HK - Housekeeping (genes constitutivos)

Kg - Kilogramas

Mel - Melatonina

mRNA - Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)

MG - Miligramas

nM - Nano molar

PB - Pares de base

PCR - Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

qPCR - Quantitative polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase em tempo real)

RNA - ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RPM - Rotação por minuto

SDS - Sodium dodecil sulfate (dodecilsulfato de sódio)

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TAM - Tecido adiposo marrom

TABi - Tecido adiposo branco inguinal

TMO - Temperatura máxima optica

UA - Unidades arbitrárias

ZT - Zeitgeber time

^{0}C - Graus Celsius

μL - Microlitro

% - Porcentagem

α - Alfa

β - Beta

- Delta

® - Registrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**

1.1 Glândula pineal e melatonina **16**

1.2 Termorregulação **20**

1.3 Tecido adiposo marrom e adipócitos beges **22**

1.4 Melatonina e termogênese **26**

2 JUSTIFICATIVA **30**

3 OBJETIVO **31**

4 METARIAL E MÉTODOS **32**

4.1 Animais **32**

4.2 Tratamento com melatonina **32**

4.3 Determinação do peso corporal **33**

4.4 Obtenção de dados de temperatura superficial por meio de termografia **33**

4.5 Eutanásia dos animais **35**

4.6 Extração de RNA **35**

4.7 Obtenção de cDNA **37**

4.8 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real **37**

4.9 Extração proteica e *imunoblotting* **40**

4.10 Histologia do tecido adiposo branco inguinal **40**

4.11 Análise estatística **41**

5 RESULTADOS **42**

5.1 Massa corporal e coxins de gordura **49**

5.2 Expressão gênica **52**

5.3 Conteúdo proteico **54**

5.4 Intensidade de *browning* **55**

5.5 Temperatura superficial por meio de termografia, temperatura da pele próxima ao tam e imagens térmicas representativas **56**

5.6 Temperatura superficial por meio de termografia antes e após o protocolo experimental **61**
6 DISCUSSÃO **69**
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS **80**
REFERÊNCIAS **81**
ANEXOS **89**
A – Correlação entre termoneutralidade e peso corporal **89**
B – Massa corporal de animais jovens e idosos **89**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândula pineal e melatonina

O órgão pineal origina-se, embriologicamente, de uma evaginação dorsal do teto do terceiro ventrículo e no cérebro adulto constitui, junto com os núcleos habenulares, a maior parte do epitálamo. Presente em todos os vertebrados, a glândula pineal de peixes, anfíbios, répteis e algumas aves é diretamente fotossensível. Nessas mesmas classes, além de suas características de fotossensibilidade e de secreção endócrina, a glândula pineal mantém conexões, tanto aferentes quanto eferentes, com o sistema nervoso central através do pedúnculo pineal (EKSTRÖM; MEISSL, 2003).

Nos roedores, a glândula pineal apresenta três porções distintas que formam o complexo pineal: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial. A pineal profunda está localizada entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular chamada de recesso pineal, e da sua porção dorsal emerge o pedúnculo pineal que se comunica com a pineal superficial (MOLLER 1992).

Em mamíferos, no entanto, apesar de manter seu caráter endócrino, os pinealócitos perdem sua capacidade fotorreceptora e a pineal, apesar de manter-se conectada diretamente com o sistema nervoso central, passa a estar sob o comando do ciclo de iluminação ambiental, de forma indireta, através de conexões da retina para estruturas diencefálicas que, através de projeções diretas ou indiretas, via sistema nervoso autônomo simpático, atingem a glândula pineal (LIEBERMAN, 1986).

O sistema circadiano, formado pelos núcleos supraquiasmáticos que são sincronizados ao claro-escuro e pela via retino hipotalâmica (JOHNSON; MORIN; MOORE, 1988; SPEH; MOORE, 1993), temporiza o sistema neural que controla a síntese e secreção de

melatonina através dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos que se projetam para os neurônios pré-ganglionares simpáticos situados na coluna intermédio lateral da medula torácica alta. Esses neurônios, por sua vez, projetam-se sobre o gânglio cervical superior que, através de ramos carotídeos internos e nervos conários, inervam a pineal (figura 1). O principal neurotransmissor dessas terminações simpáticas é a noradrenalina, que estimula a síntese de melatonina agindo sobre os adrenoceptores α e β (subtipos α_1 e β_1), presentes na membrana dos pinealócitos.

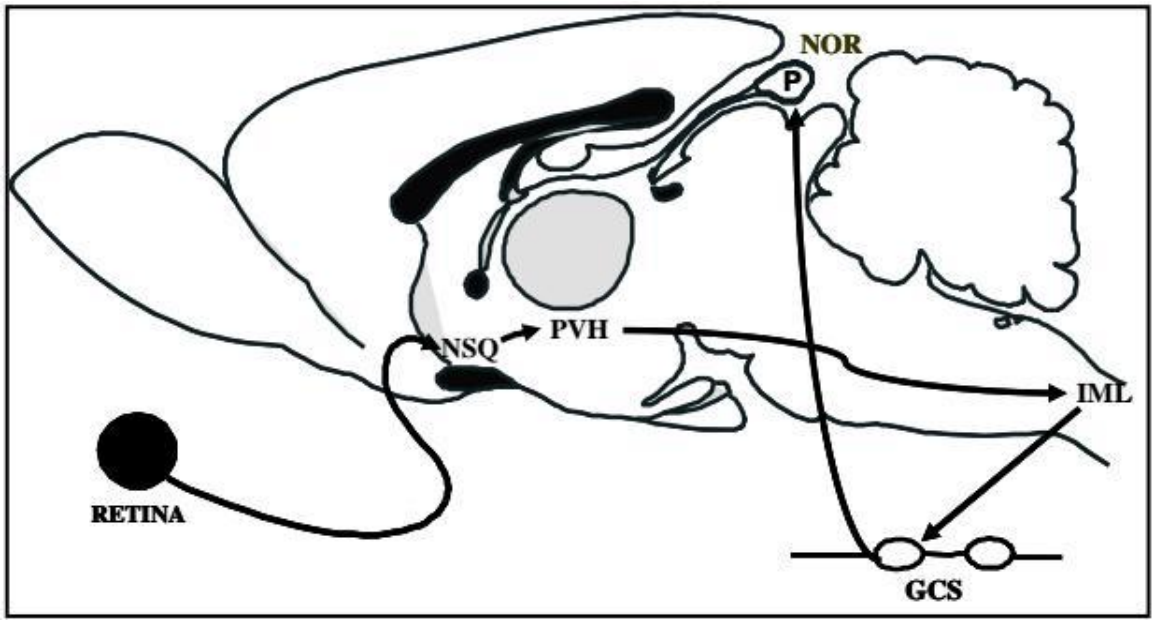

Figura 1 – Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina: A síntese de melatonina é controlada por uma via neural, que por sua vez é temporizado pelos NSQs e estes são sincronizados pelo ciclo claro-escuro ambiental captado pela retina, garantindo que a síntese deste hormônio se dê apenas na fase escura. NSQs: núcleos supraquiasmáticos; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; IML: coluna intermédio lateral da medula espinhal; GCS: gânglio cervical superior; P: pineal; NOR: noradrenalina (Adaptado de Cipolla-Neto; Afeche, 2008).

O caráter endócrino da pineal é, portanto, comum a todos os animais, e a sincronização da glândula ao ambiente é feita pelo ciclo de iluminação ambiental típico do dia e da noite. Tal controle é bastante refinado, com o seu hormônio, melatonina, sendo produzido exclusivamente no período noturno na maioria dos vertebrados, e a magnitude e duração de sua concentração no meio extracelular estão na estrita dependência da duração da fase escura. Dessa forma, a melatonina circulante tem

também seu perfil plasmático variável de acordo com as noites mais longas ou mais curtas típicas das diversas estações do ano (REITER, 1993). Fica claro assim a função fisiológica da glândula pineal: sinalizar para o meio interno pela presença ou ausência diária da melatonina na circulação e nos diversos líquidos corpóreos, se é noite ou dia no meio exterior e, através da duração do seu perfil secretório noturno, qual é a estação do ano.

Em função desse papel de temporizador do meio interno, a glândula pineal tem um importante papel mediador entre os fenômenos cíclicos ambientais e os processos regulatórios fisiológicos, tais como na regulação de fenômenos circadianos e sazonais associados à reprodução (GOLDMAN, 2001), na termorregulação, na regulação do sistema cardiovascular, em particular da pressão arterial, na regulação de ciclos de atividade-repouso e vigília-sono, no sistema imunológico (FRASCHINI et al., 1990), na temporização do feto, gestação e parto e na regulação endócrina (DIAZ; BLÁZQUEZ, 1986).

Conforme mencionado acima, a produção de melatonina é exclusivamente noturna e seu pico de concentração fisiológica na circulação de humanos e ratos é de cerca de 100 a 300 pM (REITER, 1991)**,** porém, no processo fisiológico de envelhecimento, a biossíntese de melatonina pela glândula pineal diminui, bem como os níveis do hormônio são significativamente menores na meia idade (PANG et al., 1990), deste modo, a melatonina também pode ser considerada um marcador ontogenético. Essa diminuição se deve, provavelmente, a uma redução brusca da densidade dos receptores β-adrenérgicos localizados na membrana da glândula, fundamentais para sinalização simpática e consequente produção de melatonina (HENDEN et al., 1992). Karasek (2004) sugere que a melatonina, embora não possa ser reconhecida como um agente rejuvenescedor, poderia ser utilizada como uma alternativa terapêutica em

idosos, já que a diminuição de sua produção pode estar relacionada com a deterioração de muitos ritmos circadianos que desempenham um papel importante na homeostasia (como o ciclo sono/vigília, temperatura corporal, estado de alerta e a secreção de muitos hormônios) e com distúrbios do sono. Além disso, por ser um potente antioxidante, a diminuição da melatonina pode induzir, com a idade, um acúmulo de radicais livres, tendo repercussões não apenas no envelhecimento em si, mas também em diversas doenças relacionadas com a idade. A melatonina apresenta, ainda, propriedades imunoestimuladoras e, a imunossupressão, está envolvida na aceleração dos processos de envelhecimento (GINALDI et al., 1999; MAESTRONI, 2001). Dessa maneira, a diminuição dos níveis circulantes de melatonina pode levar a uma variedade de mudanças fisiológicas associadas com a idade (RASMUSSEN et al., 1999), como aumento da adiposidade, especialmente visceral, e dos níveis plasmáticos de insulina e leptina (BJÖRNTORP, 1995), intolerância à glicose, resistência insulínica, diabetes, dislipidemias e hipertensão (BODKIN et al., 1996; BUEMANN; TREMBLAY, 1996).

Sendo assim, a melatonina apresenta diversas funções relacionadas ao metabolismo energético, com efeitos anti obesogênicos. Evidências experimentais demonstram que este hormônio propicia a síntese, secreção e ação da insulina de maneira adequada. A melatonina aumenta a sensibilidade tecidual à insulina, por meio do aumento no nível de fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS1), aumento da PI3K (ANHÊ et al., 2004) e alterações na expressão gênica da proteína transportadora GLUT4 (MONTEIRO et al., 2000). Por ser um poderoso cronobiótico, é responsável, em parte, pela distribuição diária dos processos metabólicos, de modo que a fase de atividade / alimentação do dia está associada à alta sensibilidade à insulina e o repouso / jejum é sincronizado com a fase metabólica do dia resistente à insulina (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

1.2 Termorregulação

A termorregulação pode ser definida como o controle da temperatura do corpo em diversas condições ambientais. Este processo ocorre pelo equilíbrio dos mecanismos de produção e de dissipação de calor entre o corpo e o ambiente, por meio da utilização de mecanismos autonômicos e comportamentais (GORDON, 1990)**.** Essa manutenção da temperatura corporal é essencial para o aumento da eficiência de reações químicas e de processos fisiológicos, e consequentemente, da sobrevivência de qualquer grupo animal, desta forma todos os animais gastam energia com o objetivo de termorregular.

Devido a características morfo/fisiológicas, os animais endotérmicos apresentam intervalos de temperatura ambiental no qual estão em maior conforto térmico, ou seja, as trocas de calor com ambiente permitem gastar menor energia para a manutenção da temperatura corpórea dentro dos limites ideais, esse intervalo de temperatura ambiente com baixo gasto metabólico é chamado de zona de termoneutralidade.

Um ambiente com temperaturas abaixo desta zona termoneutra, são denominados subneutros ou frios, e induzem aumento da taxa da produção de calor metabólico por meio dos processos de termogênese. Por outro lado, um ambiente com temperaturas acima da zona termoneutra, são denominados supraneutros ou quentes, e induz aumento da dissipação de calor (GORDON, 1990).

Sendo assim, todos os animais endotérmicos, incluindo os roedores, conseguem manter a temperatura interna dentro de limites estreitos, independentemente das variações da temperatura ambiental. (BLIGH; JOHNSON, 1973). A capacidade de um organismo de manter a temperatura interna em uma faixa constante depende do mecanismo de integração da informação térmica interna e ambiental pelo sistema

nervoso central (SNC), gerando uma resposta termorregulatória apropriada (BOULANT, 1998). Em ratos, o sistema termorregulatório possui quatro componentes principais: (1) os receptores térmicos (sensores); (2) os neurônios integrativos e de controle do SNC (comparador); (3) os mecanismos efetores responsáveis pela produção, conservação e dissipação de calor (controlador); (4) e a temperatura da pele da cauda (sistema passivamente controlado) (GORDON, 1990).

Todos os animais endotérmicos necessitam reduzir ou aumentar as trocas de calor com o ambiente dependendo da temperatura em que estão expostos. Assim, membros ou estruturas com uma elevada razão superfície/volume, ausência de pelos, densa rede de vasos sanguíneos e presença de anastomoses arteriovenosas (comunicação direta entre arteríolas e vênulas) estão presentes em diferentes animais e são locais ótimos para trocas de calor (alta eficiência na termorregulação) e são chamados de janelas térmicas (ANDRADE, 2015). A cauda dos ratos apresenta essas características típicas de janelas térmicas, ou seja, representa 7% da área de superfície corporal total, é um tecido altamente vascularizado, não apresenta pelos e permite uma rápida modificação do fluxo sanguíneo durante situações de estresse térmico (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002), dessa forma, a cauda de roedores além de ser uma excelente estrutura utilizada para termorregulação, é um ótimo local para observação do conforto térmico do animal.

Assim, temperatura interna é o resultado do balanço térmico entre a produção de calor metabólico e a sua dissipação, sendo mantida através de um conjunto de ajustes comportamentais e autonômicos, denominados atividade termoefetora (CHEN et al., 1998; MAICKEL et al., 1991). Em ratos, os mecanismos autonômicos responsáveis pela dissipação de calor são o fluxo sanguíneo cutâneo e a perda evaporativa de calor (NAGASHIMA et al., 2000), enquanto aqueles responsáveis pela produção de calor são

a termogênese associada ao tremor e a termogênese não associada ao tremor. Em relação a este último, destaca-se a importância fisiológica dos adipócitos marrons e beges.

1.3 Tecido adiposo marrom e adipócitos beges

Em mamíferos, o tecido adiposo é encontrado sob duas formas básicas: tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM). Estes dois tecidos apresentam funções opostas em relação ao metabolismo corporal; enquanto o TAB possui a capacidade de armazenar energia na forma de triacilglicerol e liberar energia por meio de ácidos graxos livres e glicerol, o TAM tem a capacidade de dissipar energia na forma de calor por meio da oxidação de glicose e ácidos graxos (CANNON; NEDERGAARD 2004).

O TAM é o único órgão que é encontrado exclusivamente em mamíferos. Devido sua função principal, que é produzir calor, assegura a capacidade de adaptação às mudanças ambientais de temperatura, especialmente no frio (JANSKÝ, 1973). A preparação para reserva energética e alterações metabólicas em antecedência ao ambiente hostil (baixas temperaturas e disponibilidade inadequada de alimentos) apresentam efeitos benéficos em termos de sobrevivência. Sendo assim, o recrutamento e ativação do TAM durante o inverno é um processo natural que aumenta a probabilidade de sobrevivência da espécie (TAN et al., 2011).

Outro importante papel desse órgão é a manutenção do balanço energético por meio do aumento da produção de calor e, consequentemente, maior gasto calórico, como por exemplo, em situações de hiperfagia (ROTHWELL; STOCK, 1979), ou seja, a função da termogênese induzida pela dieta é transformar a energia química consumida

a partir dos alimentos em calor, em vez de estocá-la, por exemplo, sob a forma de gordura no TAB.

No TAM, faz-se necessária uma alta vascularização para o aporte adequado de nutrientes e oxigênio e para a dissipação do calor. Os limitados depósitos de triacilglicerol existentes no tecido são utilizados para um rápido suprimento energético e sua inervação simpática é necessária para uma rápida ativação. Para manutenção de termogênese prolongada, o TAM recebe substratos (ácidos graxos e glicose) a partir da circulação (CANNON; NEDERGAARD 2004).

Adipócitos marrons caracteristicamente expressam UCP1 (*uncoupling protein 1*). Essa proteína desacopladora é responsável por sequestrar os elétrons da cadeia respiratória, dissipando a energia sob a forma de calor ao invés de incorporá-la na forma de energia química nas moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) (GOLOZOUBOVA et al., 2001). Sendo assim, o TAM é altamente ativo metabolicamente e sua função termogênica tem como consequência deslocar o balanço energético no sentido do gasto calórico, retardando, deste modo, o ganho de peso e, em alguns casos, induzindo a perda. Acredita-se que a UCP1 seja a única proteína responsável por mediar a termogênese sem tremor, uma vez que camundongos deficientes em UCP1 são incapazes de ativarem o TAM quando expostos a baixas temperaturas (GOLOZOUBOVA et al., 2001) e, além disso, tornam-se obesos mesmo quando em condições de termoneutralidade, mostrando um potencial papel desta proteína também na regulação do dispêndio energético (FELDMANN et al., 2009).

A via de transdução que regula o recrutamento e ativação do TAM é mediada, principalmente, pela noradrenalina, o neurotransmissor do sistema nervoso simpático (SNS), que atua nos receptores de membrana noradrenérgicos β_3 e α_1. Os receptores β_3 encontram-se acoplados à proteína Gs; o estímulo simpático nestes receptores ativa a

adenilato ciclase e ocorre aumento intracelular de AMPc nos adipócitos marrons. Como resultado, a proteína quinase A (PKA) induz uma série de eventos que culminam, principalmente, no aumento da expressão gênica de PGC1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) e UCP1 (COSTFORD; GOWING; HARPER, 2007; SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009). Além disso, a ativação da PKA também estimula a lipase hormônio sensível, uma importante enzima da lipólise, que induz a liberação de ácidos graxos livres (AGL) a partir dos triglicérides. Esses AGL são substratos para a β-oxidação, que gera calor (via aumento da atividade da UCP1) na mitocôndria das células do TAM e, ainda, os AGL aumentam a atividade de UCP1**.** Já os receptores adrenérgicos do tipo α1 encontram-se, na membrana de adipócitos marrons, acoplados à proteína Gq e, quando estimulados, ativam a fosfolipase C que, em última instância, também é responsável pela ativação do aumento da expressão dos genes típicos do TAM (CANNON; NEDERGAARD, 2004a; MOHELL, 1984; SELL; DESHAIES; RICHARD, 2004), como PGC1α e PRDM16 *(PR domain containing 16)*, genes que codificam proteínas que são reguladoras transcricionais envolvidas no processo de diferenciação de adipócitos marrons (SEALE et al., 2008); Zfp516 (*Zinc-finger protein 516)*, cuja função principal é aumentar a ativação transcricional da UCP1, além de também promover diferenciação e ativação do TAM (SEALE, 2015) e Cidea (*Cell death activator CIDE-A)*, gene predominante expresso nas células de gordura marrom, onde regula a atividade da UCP1 e do metabolismo lipídico (SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009).

Acreditou-se por muito tempo que, em humanos, o TAM estava presente apenas em recém-nascidos, sendo responsável pela termogênese sem tremor apenas nesta fase da vida e que, ao longo do crescimento, sofria uma involução, sendo inexistente e/ou

irrelevante na idade adulta (LEAN et al., 1986). A presença de TAM ativo em humanos adultos e sua importância fisiológica foi primeiramente sugerida em 2007 (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007) e finalmente reconhecida em 2009 (CYPESS et al., 2009; SAITO et al., 2009; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009). Atualmente, há um consenso na literatura de que, em humanos adultos, o TAM existe de fato e apresenta função termogênica. Estima-se que este tecido, em adultos, possa ser responsável por um gasto calórico equivalente a 4.1 Kg por ano (VIRTANEN et al., 2009). A atividade do TAM parece diminuir com a idade (YONESHIRO et al., 2011), é inversamente proporcional ao índice de massa corpórea (IMC) e à adiposidade visceral (CYPESS et al., 2009; WANG et al., 2015) e, ainda, parece ser menor em homens do que em mulheres (COHADE; MOURTZIKOS; WAHL, 2003; CYPESS et al., 2009; WANG et al., 2015).

O tecido adiposo marrom vem sendo alvo de interesse de pesquisas recentes, graças à descoberta de que, além dos depósitos clássicos de TAM, células adiposas do tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo, apresentam características fenotípicas e funcionais típicas de adipócitos marrons, tanto em animais, quanto em humanos (BOSTRÖM et al., 2012a). Tais células são denominadas adipócitos beges, ou ainda, "*brite"* (*brown-in-white*) (WU et al., 2012). As células beges, assim como as células marrons, apresentam morfologia multilocular, são ricas em mitocôndria e expressam UCP1 e outros fatores que aumentam a transcrição de proteínas chaves para termogênese (KAJIMURA; SEALE; SPIEGELMAN, 2010). Apesar dessa semelhança com os adipócitos do TAM, estas células apresentam um perfil único de expressão gênica, que as diferencia tanto de adipócitos marrons, quanto de adipócitos brancos (GARCIA; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2016).

Este processo de transformação funcional do tecido adiposo branco recebe o nome de *browning* ou escurecimento, e o desenvolvimento desses adipócitos beges se dá principalmente em resposta ao frio e estímulo simpático. Nestas células, a interação da noradrenalina com receptores beta adrenérgicos, presentes na membrana plasmática das células, inicia uma cascata de transdução que culmina em aumento da expressão de UCP1 e outras proteínas termogênicas.

Um estudo publicado em 2012 mostrou ainda que o *"browning"* (ou escurecimento) do TAB também pode ser induzido por meio da irisina, uma miocina descoberta recentemente, que parece atuar no tecido adiposo branco subcutâneo (principalmente inguinal) via um receptor ainda desconhecido. Este mecanismo é regulado pelo coativador transcricional PGC1 – α, que também parece estimular, no sóleo, a produção de FNDC5 *(fibronectin type III domain containing 5)*, uma proteína de membrana do tipo I que é clivada, dando origem à irisina (BOSTRÖM et al., 2012a).

Assim como o aumento da atividade do TAM, o processo de *browning* também está associado à resistência à obesidade, diabetes tipo 2 e outras desordens metabólicas (SANCHEZ-DELGADO; MARTINEZ-TELLEZ; OLZA, 2015).

1.4 Melatonina e termogênese

Há evidências que indicam que a melatonina age sobre o TAM, sendo capaz de regular sua fisiologia, de maneira a aumentar seu recrutamento e elevar sua atividade metabólica em mamíferos (TAN et al., 2011).

A melatonina exerce seu papel no TAM tanto de maneira central, quanto de maneira periférica. Sabe-se que o TAM pode ser regulado por neurônios do núcleo supraquiamático (NSQ) que, por sua vez, apresenta receptores de melatonina,

especialmente MT1 (ANON, 1989; WU et al. 2006). Estudos mostram que a melatonina, no NSQ, é capaz de intensificar o estímulo simpático ao TAM e, como consequência, induzir aumento no *turnover* de noradrenalina e aumento da expressão dos genes UCP1, PPARγ e PGC1α (BAMSHAD; SONG; BARTNESS, 1999; BARTNESS; DEMAS; SONG, 2002). Em relação à regulação periférica, outros trabalhos sugerem a existência dos receptores de membrana MT1 e MT2 nos adipócitos marrons de hamster sírios que, quando ativados, facilitam o efeito estimulatório da noradrenalina (AARSETH; NORDØY; STOKKAN, 2001; MÅRTENSSON; ANDERSSON; BERG, 1996).

Outro importante sítio de atuação da melatonina é na mitocôndria dos adipócitos marrons, onde tal hormônio é encontrado em altas concentrações. Devido sua função antioxidante, especula-se que tanto a melatonina, quanto seu metabólito, são capazes de proteger a organela contra o dano oxidativo, aumentando, deste modo, o conteúdo de mitocôndria e, consequentemente, a função termogênica do TAM (LÓPEZ et al., 2009).

Além dessas ações centrais e periféricas, a interação da melatonina com outros hormônios para ativação do TAM deve ser considerada, principalmente o hormônio tireoidiano que, conforme estabelecido na literatura, é capaz de promover o aumento transcricional de UCP1 a ativação dos adipócitos marrons, onde a tiroxina (T4) é convertida a triiodotironina (T3) por meio da 5’ desiodase tiroxina do tipo 2 (5’ – D2) (OBREGON, 2008). Essa 5’-D2 é encontrada no TAM sob uma isoforma específica, presente apenas neste tecido, de maneira que a administração de melatonina é capaz de aumentar a ativação desta desiodase exclusivamente em adipócitos marrons, promovendo gasto energético via termogênese e limitando outra potencial consequência metabólica adversa graças a uma ativação anormal do hormônio tireoidiano em outros órgãos ou tecidos (PUIG-DOMINGO et al. 1989)**.**

A melatonina é uma molécula sinalizadora que transmite ao organismo informações ambientais externas, principalmente em relação ao fotoperíodo. Mudanças no fotoperíodo induzem a alterações no comportamento, na atividade fisiológica e no metabolismo de animais, mesmo quando mantidos em laboratório sob condições constantes de temperatura e disponibilidade alimentar e hídrica. Sendo assim, as durações do dia e da noite constituem-se no principal indicador da estação do ano. Neste contexto, a produção de melatonina (especialmente a duração do seu período secretório e perfil plasmático) reflete alterações no fotoperíodo ambiental, de maneira que episódios de longa duração (noites longas) ocorrem em fotoperíodos curtos (típicos do inverno), e episódios de menor duração (noites curtas) ocorrem em fotoperíodos longos (típicos do verão).

A diminuição da temperatura é o principal regulador da morfologia e função do TAM em mamíferos. Porém, trabalhos mostram que fotoperídos de curta duração (que predizem clima frio e escassez alimentar) mimetizam o efeito do frio no crescimento deste tecido; tal informação é essencial para hibernação e sinaliza recrutamento do TAM (MCELROY; WADE 1986; ZHAO; WANG 2005). Além disso, o tratamento crônico com melatonina em pequenos mamíferos mimetiza a exposição ao frio e/ou a fotoperíodos de curta duração (SINNAMON; PIVORUN, 1981).

Ainda em relação a este assunto, Lynch e Epstein (1976) reportaram que o tratamento crônico com melatonina em camundongos intensificou a termogênese sem tremor com elevação da taxa metabólica basal e consumo de oxigênio. Em hamsters sírios, Viswanathan et al. (1986) observaram que a administração de melatonina induziu recrutamento do TAM, semelhantemente ao que ocorre em fotoperíodos curtos. Nesta mesma espécie de roedores, a remoção cirúrgica da glândula pineal (pinealectomia) impediu a hibernação induzida pela exposição ao frio e ao fotoperíodo de curta duração

e, ainda, reduziu substancialmente a massa do TAM (SMIT-VIS, 1972). Em conjunto, estes trabalhos revelam, portanto, a importância da glândula pineal e da melatonina na regulação da massa e da fisiologia do TAM e da termogênese.

Devido tais evidências dos efeitos termogênicos da melatonina nas células marrons, Jiménez-Aranda et al. (2013) investigaram se este hormônio atuaria também como um agente indutor de *browning* em ratos da linhagem Zucker, um modelo animal que apresenta obesidade relacionada ao diabetes tipo 2. Os resultados mostraram que a concentração de 10mg de melatonina/kg foi capaz de induzir o escurecimento do tecido adiposo branco inguinal, além de maior expressão proteica de UCP1 e maior atividade termogênica nesta região, sugerindo que o tratamento crônico com esta indolamina induz o surgimento de *brite* e, portanto, contribui também desta maneira para o controle do peso corporal e seus benefícios metabólicos.

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o número de indivíduos obesos aumentou exponencialmente, sendo a prevalência ainda maior em países desenvolvidos.

O tecido adiposo branco é a principal forma de se armazenar o excesso de energia provindo da alimentação, e esta capacidade fisiológica foi fundamental para garantir a sobrevivência mesmo durante os períodos de escassez alimentar (MONTANARI; POŠĆIĆ; COLITTI, 2017). Em contraste aos nossos ancestrais, nos tempos recentes a disponibilidade de alimentos tornou-se abundante e constante, e mais rica em conteúdo calórico. Além disso, o nível de atividade física da população moderna diminuiu drasticamente (TAN et al., 2011). Considerando a rapidez destas mudanças, o genoma humano foi incapaz de se adaptar a este tipo de estilo de vida e, como resultado, a proliferação da obesidade foi uma consequência inevitável que, em 2010, causou aproximadamente 3.4 milhões de mortes ao redor do mundo (NG et al., 2014). A obesidade está associada a diversas outras condições patológicas, como resistência à insulina, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2.

Diante deste contexto atual, é de fundamental importância buscar abordagens efetivas para o tratamento da obesidade. Neste sentido, estudos recentes indicam que a maior ativação do TAM e adipócitos beges parecem ser uma intervenção eficaz no combate desta doença. Tendo em vista que a melatonina desempenha uma importante função fisiológica na termogênese, propomos, com este trabalho, estabelecer uma relação funcional entre este hormônio, tecido adiposo marrom, *browning* e termorregulação em animais idosos obesos.

3 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo investigar o papel da melatonina sobre a regulação da temperatura corporal em animais idosos obesos da linhagem Wistar, que apresentam produção de melatonina prejudicada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os animais utilizados foram ratos machos albinos da linhagem Wistar do biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Estes animais foram alojados no biotério do Laboratório de Neurobiologia, em condições de ciclo claro-escuro 12 horas – 12 horas, temperatura regulada (24 ± 2 ºC) e com isolamento acústico. Os animais, durante os procedimentos experimentais, dependendo da exigência, ficaram isolados ou, no máximo, 2 por caixa maior, tratados com água e ração (balanceada Nuvital ®) "*ad libitum*".

Usamos para este trabalho animais envelhecidos, com 14 meses de idade, que foram divididos nos seguintes grupos: Controle, Melatonina 1 mg (Mel 1 m g) e Melatonina 10 mg (Mel 10 mg).

4.2 Tratamento com melatonina

O tratamento com melatonina foi por via oral. O hormônio foi solubilizada na água que os animais ingeriram à noite, em concentração tal, corrigida diariamente pelo volume ingerido, que garantisse a dosagem de 1 ou de 10 mg de melatonina/kg de peso corporal. A melatonina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) foi inicialmente diluída em 400 µl de etanol absoluto, adicionando 960 µl de água para um volume final de 1 ml. Após este procedimento, a melatonina preparada foi solubilizada na água dos bebedouros, seguindo a concentração mencionada acima (1 ou 10 mg/kg).

Os bebedouros com melatonina foram colocados alguns minutos antes da mudança do claro para o escuro e retirados alguns minutos antes do acender das luzes, trocando-os por bebedouros contendo água sem melatonina. Este tratamento teve a duração de 16 semanas.

Os grupos de animais idosos que receberam a suplementação com melatonina foram: Mel 1mg – receberam a dosagem de 1 mg de melatonina/kg de peso corporal – e Mel 10 mg – receberam a dosagem de 10 mg de melatonina/kg de peso corporal.

4.3 Determinação do peso corporal

Todos os animais foram pesados em balança digital semanalmente, durante todo o período experimental.

4.4 Obtenção de dados de temperatura superficial por meio de termografia

A avaliação da temperatura/termorregulação foi realizada utilizando-se de termopares do tipo K acoplados em datalogger de 4 canais modelo RDXL4SD Omega®, datalogger de umidade relativa e temperatura modelo RHT10 Extech®, além da utilização de uma câmera termográfica com visor infravermelho (Flir System® - SC640).

Esse experimento foi realizado nas dependências do biotério do Laboratório de Neurobiologia. As salas foram condicionadas em duas temperaturas diferentes nas quais os animais foram expostos: Temperatura Basal (24 ºC) e Frio (18 ºC).

Os animais nos diferentes tratamentos foram aclimatados na temperatura de estudo e feito duas rotinas de captura de imagens, a primeira captura foi 30 minutos após a sala

estar equilibrada na temperatura de avaliação e foi refeita as imagens após 2 horas que os animais estavam em contato com esse ambiente. Essas repetições foram necessárias para avaliar o tempo necessário para os animais se aclimatarem e também avaliar o efeito de estresse térmico e físico nos quais foram expostos durante a experimentação.

Para a obtenção da emissão térmica superficial de diferentes regiões corpórea dos animais analisados foi utilizado uma câmera infravermelha, modelo SC640 (Flir Systems). A temperatura média superficial das regiões de escolha foi obtida por meio de análise das termografias por rotinas específicas no programa Thermacam 2.9 (Flir Systems), e utilizamos emissividade de 0,98. A temperatura média das diferentes porções corpóreas foi obtida por ferramentas de área e linhas, a qual ofereceu mais de 50 pontos de temperatura por porção observada. As regiões aqui analisadas foram: região escapular (depósito de TAM); região inguinal (depósito de adipócitos beges); cauda (janela térmica de controle da temperatura corporal) e olho.

A temperatura da pele sobre o TAM foi também obtida por termopares do tipo K acoplados em registradores de 4 canais modelo RDXL4SD Omega®, sendo que os termopares foram posicionados na porção do dorso localizada sobre o depósito interscapular do TAM, e obtida por contato com a pele, entre os pelos.

Ao mesmo tempo, durante os experimentos, utilizamos medidos de umidade relativa e ponto de orvalho (datalogger de umidade relativa e temperatura modelo RHT10 Extech®) para obtenção de informações fundamentais para compreender os processos termodinâmicos existentes durante a termorregulação desses animais no ambiente que estavam expostos. Tendo em vista que a umidade relativa do ambiente pode auxiliar na evaporação de água e assim facilitar ou dificultar o fluxo de calor entre animal e ambiente.

4.5 Eutanásia dos animais

Após o término do protocolo de 16 semanas de tratamento com melatonina, os animais foram eutanasiados por decapitação no ZT 18 (6 horas após o início da fase escura) e, em seguida, os tecidos de interesse foram retirados para os testes biológicos.

4.6 Extração de RNA

Para que fosse realizada a extração do RNA, os tecidos (sóleo, tecido adiposo inguinal e tecido adiposo marrom interescapular) foram mantidos em gelo seco, para que seu RNA não degradasse. Em seguida cada tecido foi homogeneizado em 1 ml de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) com o auxílio de um Polytron (Kinematica, EUA). Esse macerado foi então deixado durante 5 min em temperatura ambiente. Adicionou-se em cada amostra 200 μL de clorofórmio e as amostras foram submetidas à homegenização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, EUA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 10 min (com homogenização a cada 2 min) e então levada à centrífuga refrigerada (*5417R*, Eppendorf, Alemanha) durante 15 min a 4 ºC e 12000 g. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs®. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e em cada uma foi acrescentado 500 μL de isopropanol. As amostras foram então levadas para a centrífuga durante 20 min a 4 ºC e 12000 g, para a formação do precipitado. Após a centrifugação jogou-se fora o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 1 ml de álcool etílico gelado a uma concentração de 75%. A seguir as amostras foram levadas à centrífuga durante 10 min a 4 ºC, 12000 g. O precipitado foi então localizado e o sobrenadante descartado, as

amostras foram deixadas por 10 min em temperatura ambiente, para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, foi adicionado em cada amostra 20 μL de H_2O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para dissolução do precipitado. As amostras sofreram então uma rápida agitação, para ter certeza de que o precipitado foi dissolvido. As amostras foram armazenadas a -80 ºC até a realização do tratamento com DNase.

Após a extração de RNA, as amostras sofreram tratamento com DNase, utilizando-se o kit Turbo DNA-*free*™ (Ambion, Austin, Texas, EUA). Utilizou-se de cada amostra um volume de 10 μL, e aí então foi adicionada à própria amostra 1 μL da enzima Turbo DNase e 1,1 μL de Tampão Turbo DNase. As amostras foram então misturadas por inversão e levadas à centrífuga para uma rápida centrifugação. Em seguida foram deixadas a 37 ºC por 30 min. Ao término desse período as amostras foram imediatamente colocadas em gelo, e sofreram a adição de 2 μL do reagente de inativação do kit. Foram mantidas em temperatura ambiente por 5 min, com constante homogeneização. A seguir foram centrifugadas por 1,5 min., 10000 g. O sobrenadante foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs®, e o precipitado foi então descartado.

As amostras de RNA, livres de DNA, foram quantificadas no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Os dados obtidos a partir dessa análise foram utilizados para calcular o volume necessário da amostra oriunda da extração de RNA total, (concentração de 1 μg/μL de RNA em um volume final de 11 μL) e para aferir a qualidade da amostra. Amostras com razão 260/280 menor de 1,8 não foram utilizadas.

4.7 Obtenção de cDNA

Com o RNA extraído, mensurado e avaliado, o passo seguinte consistiu na obtenção do cDNA através da reação de transcriptase reversa, para tal utilizou-se kit SuperScript™ III Antisense Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Às amostras foi adicionado 1 μL de dNTP mix e 1 μL de random primers, tendo portando como volume final 13 μL. As amostras foram colocadas no termociclador MyGene™ Series Gradient Thermal Cycler (LongGene®, EUA) que foi programado de acordo com as seguintes especificações de ciclo descritas pelo fabricante do kit: 65 ºC por 5 min (momento no qual as amostras foram retiradas e à elas adicionou-se 7 μL de um mix previamente preparado), 25 ºC por 5 min, depois a 50 ºC por 60 min e por fim 70 ºC por 15 min para a desnaturação da enzima. O mix continha para cada amostra: 4 μL de tampão de enzima, 1 μL de DDT, 1μL de transcriptase reversa e 1 μL de H_2O estéril. Ao término da reação as amostras foram armazenadas a -20 ºC.

4.8 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho QuantStudio 6 Flex® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 4 μL de cDNA (20 ng) previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 6,25 μL de Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,25 μL de água MilliQ e 400 nM dos primers específicos para cada gene.

Os primers usados foram desenhados de modo que sua localização lhes desse a característica de flanquearem um íntron (*intron-spanning*), o que impossibilita a

amplificação de DNA genômico. Os primers, número de acesso no GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), seqüências do sense e do antisense, tamanho dos fragmentos amplificados e a localização estão listados na tabela 1.

Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 50°C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos, 2) 40 ciclos que incluíram a desnaturação a 95 °C por 15 segundos; o anelamento dos primers e a extensão a 60 °C por 1 minuto (temperatura ótima para todos os pares de primers usados), e 3) 1 ciclo para análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 30 segundos; 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de *melting*.

O limiar para desconsideração do ruído na fluorescência foi determinado automaticamente pelo software Real – Time PCR v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que também determinou as curvas de *melting* e gerou o Ct de cada amostra para comparação e determinação da expressão gênica segundo o método do $2^{-\Delta Ct}$, usando diversos genes (listados na tabela de primers) como constitutivos para normalização dos dados (LIU; SAINT, 2002; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Na sessão dos resultados, a média dos genes constitutivos serão referidas como *housekeeping* (HK).

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.

Primer	NºAcesso	Sequências (5'-3')
Ucp1	NM_012682.2	GCCAAGACAGAAGGATTGCC CAGCCGAGATCTTGCTTCCC
Fndc5	NM_001270981.1	TGAAGGAGATGGGGAGGAA GCGGCAGAAGAGAGCTATAACA
Pgc1-α	NM_031347	AGCCACTACAGACACCGCAC CCTTTCAGACTCCCGCTT C
Zfp516	XM_017600873	CACCTTCGGGCACACACAG CAGTGTGGTCTCTCCCTTGTTTAG
Prdm16	XM 017593884	CCACACAGAAGAGCGTGAGTACAA TGTGAACACCTTGACGCAGTTT
Cidea	NM_001170467	TTCCTCGGCTGTCTCAATGT GCCCGCATAAACCAGGAAC
Hdac1	NM_001025409.1	TGGTCTCTACCGAAAAATGGAAA GTCGTCGCTGTGGTACTTGGT
Rpl37a	NM_001108801	CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG GCCACTGTTTTCATGCAGGAAC
Gama actina	NM_001127449	TACCCTATTGAGCACGGCAT CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT

Nessa tabela estão listados os primers utilizados, desenhados a partir das informações obtidas pela GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), sendo informados também as sequências sense e antisense, Fonte: NCBI – NHI, Bethesda, EUA.

4.9 Extração proteica e *imunoblotting*

Após a coleta, os coxins adipócitos da região inguinal e o tecido adiposo marrom foram homogeneizados em tampão RIPA (Sigma) enriquecido com coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Sigma). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 14.000 RPM, o sobrenadante foi separado e dosado quanto ao conteúdo protéico usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific). Após quantificação, 30 μg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida (10% SDS-PAGE) e, em seguida, foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência e o ciclos de lavagens, foi feito o bloqueio durante 1 hora com 5% de BSA. As membranas foram incubadas overnight à 4 °C com o anticorpos primários: UCP1 e α - Tubulina em 1% de BSA diluído em TBS-T (25 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20). Após 3 ciclos de lavagens de 10 min cada, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IRDye 800CW ou IRDye 680CW (1:10,000, Li-COR) durante 45 minutos, diluído em TBS-T. Após 3 ciclos de lavagens de 10 min as proteínas foram visualizadas e analisadas utilizando o sistema Odyssey (Li-COR). As expressões proteicas foram normalizadas de acordo com a α – Tubulina.

4.10 Histologia do tecido adiposo branco inguinal

As amostras foram colocadas em um cassete com a identificação do órgão. O material foi fixado em formol à 10% por aproximadamente 48 horas. Após esta fixação, as amostras passaram por um processo de desidratação, permanecendo por 1 hora em Álcool 70%, 1 hora em álcool 96% e, por fim, 1 hora em álcool absoluto para total

desidratação. Em seguida, foram passadas em reagente xilol por, aproximadamente, 2 horas e, em seguida, foram colocadas em um banho de parafina por 3 horas. Concluído o processo, as amostras foram mantidas em gelo. Em seguida, as lâminas foram marcadas com a mesma identificação do cassete e então colocadas no micrótomo, onde foram feitos cortes seriados entre 3 e 4 micras. A fita produzida pelo micrótomo foi colocada em um banho maria com temperatura aproximada de 56 ºC. Após esticar a fita no banho, foi retirado o nº de fragmentos necessários e colocados sobre a lamina. Em seguida, a lâmina foi para uma estufa com temperatura variável entre 60 ºC e 70 ºC por aproximadamente 30 minutos. Após este processo, foi feita a coloração das lâminas, que consistiu em: 3 xilóis por 5 minutos, 5 cubas de álcool, lavadas em água corrente por 5 minutos e colocadas em corante Hematoxilina por aproximadamente 1 minuto e contra corante Eosina, também por aproximadamente 1 minuto. Para finalizar o processo de coloração, foi necessário fazer algumas passagens em álcool absoluto e xilol. Foi colocada uma cola sobre cada fragmento, que recebeu uma lamínula para proteção e melhor visualização no microscópio. A lâmina foi então etiquetada conforme identificação inicial.

4.11 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada por análise de variância unifatorial (one-way ANOVA), e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni e por teste T, prefixando-se o nível de significância em 95% ($p<0,05$). Os valores estão representados como média ± erro padrão da média. Os testes estatísticos foram realizados usando-se o programa GraphPad Prism, v.5.0.

5 RESULTADOS

A figura 2 nos mostra o delta da massa corporal (diferença do peso final pelo peso inicial) (A) e peso dos coxins dos adipócitos brancos (B e C). As diferentes concentrações de melatonina não induziram resultados de maneira dose-resposta, ou seja, os grupos mel 1 mg e mel 10 mg não foram diferentes em relação a estes parâmetros, porém, ambos grupos suplementados apresentaram diferenças em relação aos animais controles no delta da massa corporal e no peso do coxim retroperitoneal. Quanto ao peso do TAB periepididimal, não houve diferenças estatísticas entre os animais dos diversos grupos.

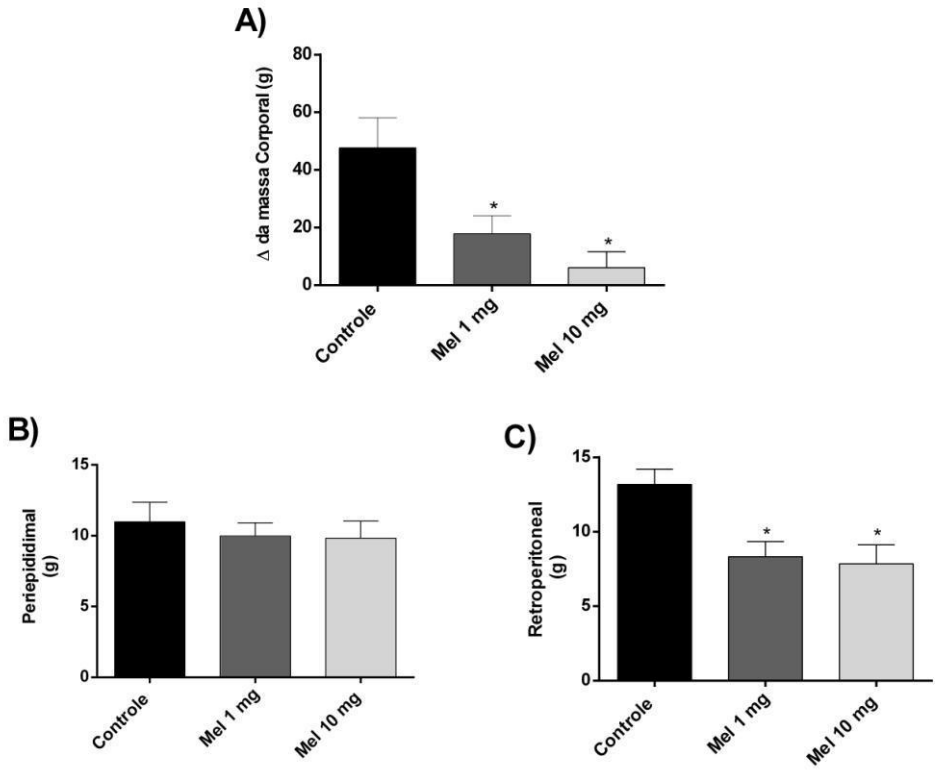

Figura 2 - A) Diferença entre o peso corporal final e inicial (Δ) dos animais; B) Peso do tecido adiposo branco periepididimal; C) Peso do tecido adiposo branco retroperitoneal. (n = 8 por grupo). Significância: * vs Controle, (p < 0,05). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

A figura 3 (A – E) nos mostra o conteúdo do mRNA no TAM de diversos genes relacionados à termogênese. Apesar de maior tendência de expressão nos animais suplementados com melatonina (tanto 1 mg quanto 10 mg), não houve diferença estatística entre os grupos.

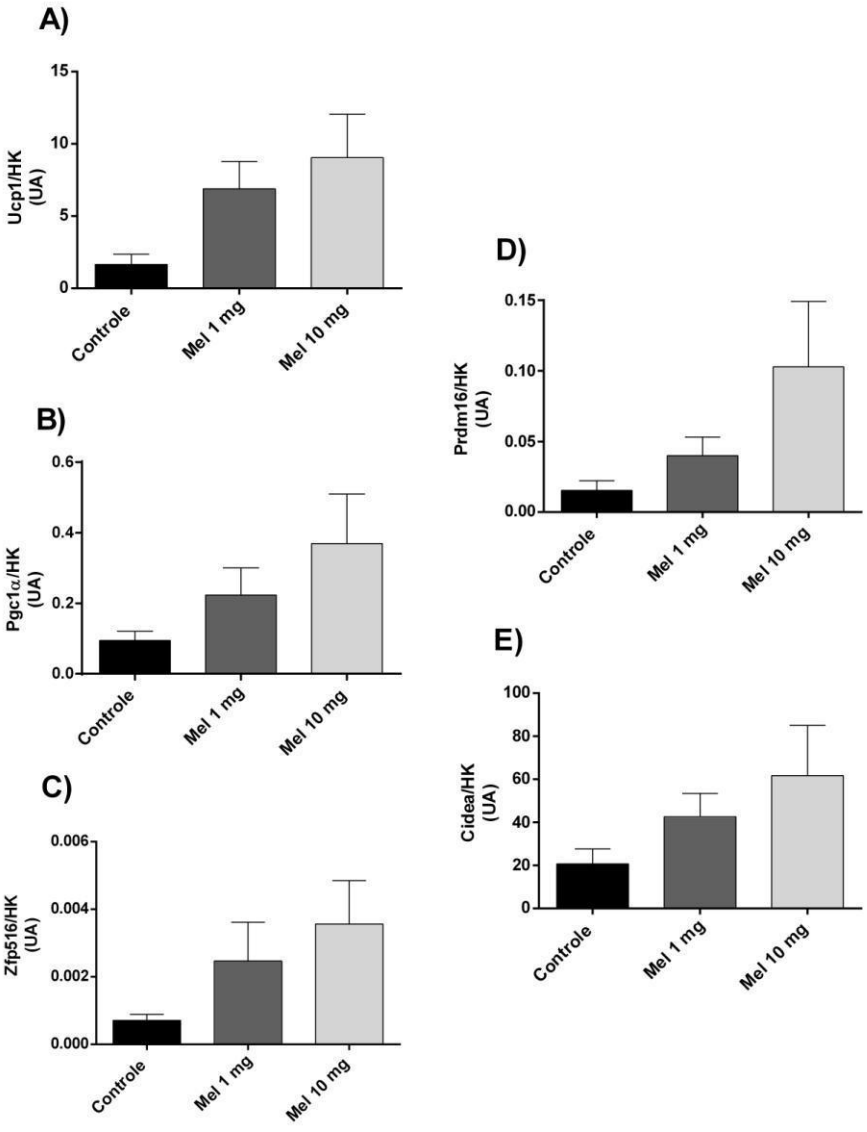

Figura 3 - A) Expressão gênica de Ucp1 no TAM dos animais; B) Expressão gênica de Pgc1α no TAM dos animais; C) Expressão gênica de Zfp516 no TAM dos animais; D) Expressão gênica de Prdm16 no TAM dos animais; E) Expressão gênica de Cidea no TAM dos animais. (*n* = 8 por grupo). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Verificamos também que, em relação à expressão gênica de Pgc1α e Fndc5 no músculo sóleo, não houve diferença significativa entre os diversos grupos experimentais (Figuras 4A e B).

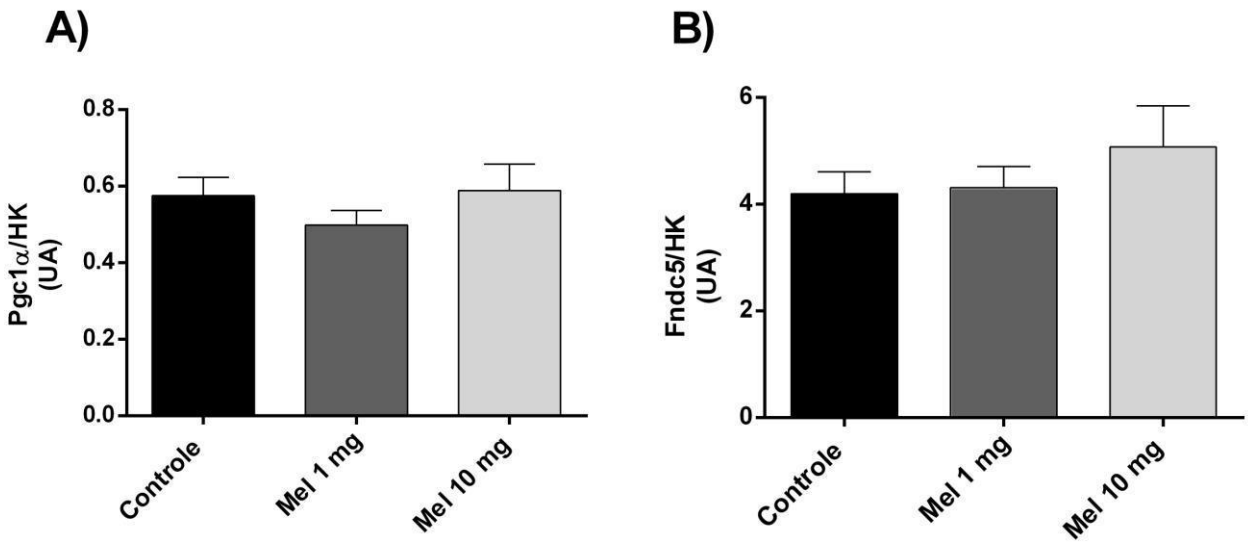

Figura 4 - A) Expressão gênica de Pgc1α no músculo sóleo dos animais; B) Expressão gênica de Fndc5 no músculo sóleo dos animais. (*n* = 8 por grupo). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Analisamos, por western *blotting*, o conteúdo proteico de UCP1 nos adipócitos marrons e beges. As figuras 5A e B nos mostram que não houve diferença significativa no TAM e no TABi dos animais, respectivamente.

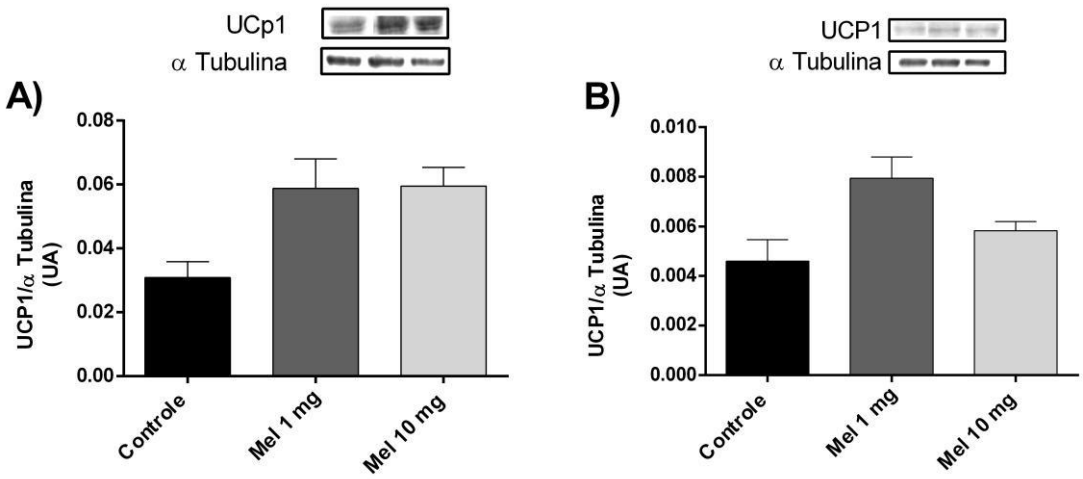

Figura 5 - A) Conteúdo proteico de UCP1 no TAM dos animais; B) Conteúdo proteico de UCP1 no TABi dos animais. (*n* = 8 por grupo). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Bem como as variáveis acima, a temperatura da pele sobre o TAM (Figuras 6A e B) não foi diferente entre os grupos, tanto no basal, quanto no frio (todos os valores são mostrados como diferença entre a temperatura da estrutura corporal e a temperatura do ambiente - T), tampouco a intensidade de *browning*, analisada por meio densitometria óptica em cortes histológicos (figura 6C).

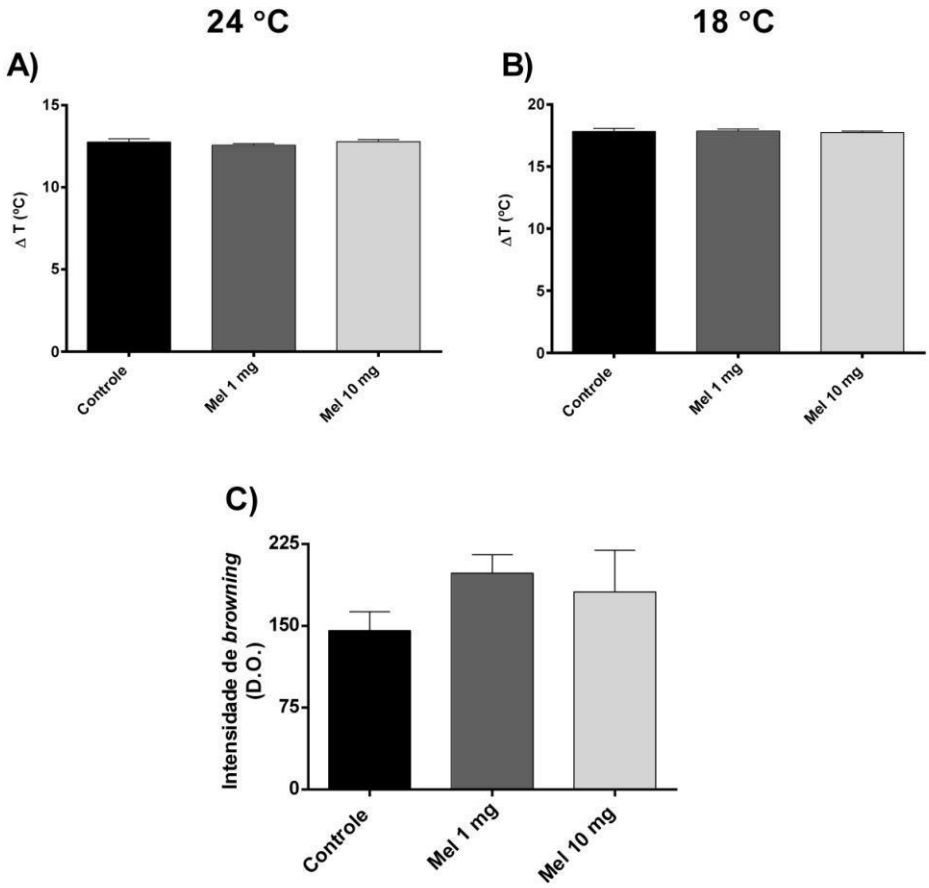

Figura 6 - A) ΔT por condução da pele sobre o TAM no basal; B) ΔT por condução da pele sobre o TAM no frio; C) Intensidade de browning do TABi em cortes histológicos. (n = 8 por grupo). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

A figura 7 nos mostra a temperatura da pele por radiação (termografia) das diversas regiões analisadas. Os valores são mostrados como diferença entre a temperatura da estrutura corporal e a temperatura do ambiente (T). A 24 ^{0}C, notamos menor T, em ambos grupos suplementados, no olho e no TABi, quando em comparação com o grupo Controle. Ainda nesta temperatura, notamos também que apenas o grupo Mel 10 mg apresentou menor T na cauda em relação aos animais controles. Já no frio (18 ^{0}C) os grupos Mel 1 mg e Mel 10 mg apresentaram redução significativa do T no olho e na cauda, quando comparados aos animais controles.

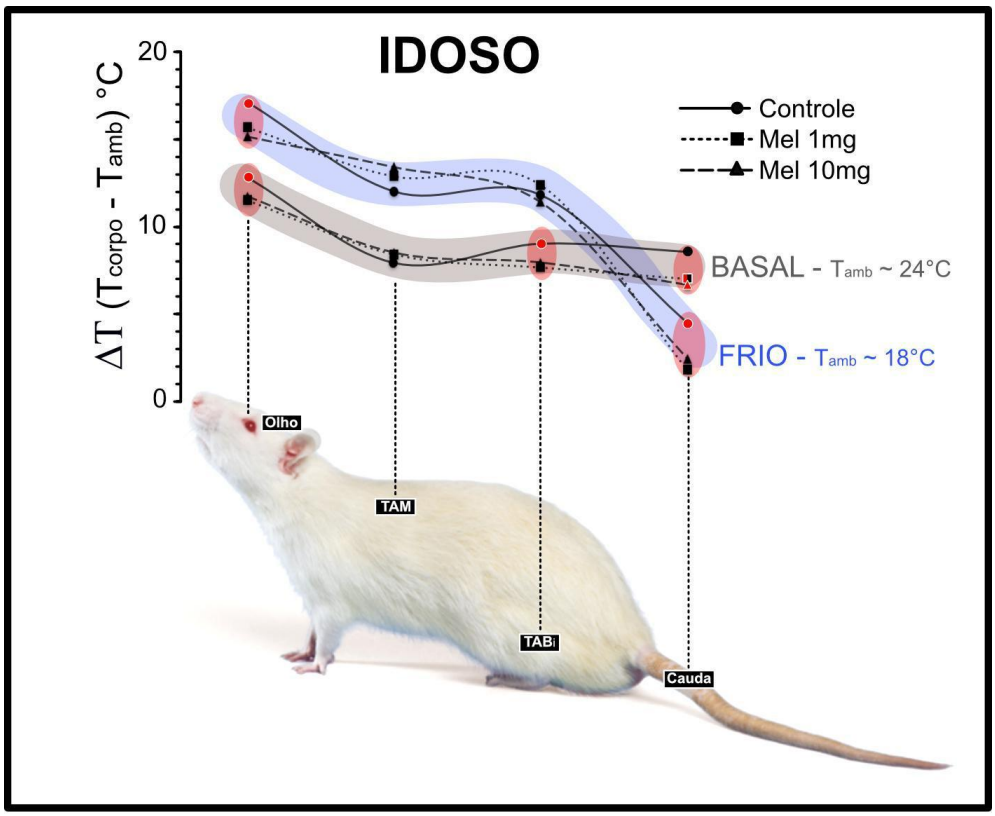

Figura 7 - ΔT das diversas regiões corporais na temperatura basal (24 ^{0}C) e no frio (18 ^{0}C). (n = 8 por grupo). O círculo vermelho representa diferença significativa em relação ao controle, dentro da mesma temperatura ambiente; ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média.

Os resultados acima nos mostraram que, em nenhuma das variáveis aqui analisadas, houve diferença significativa entre os grupos Mel 1 mg e Mel 10 mg, ou seja, as diferentes concentrações de melatonina não induziram resultados de maneira dose-resposta.

Sendo assim, agrupamos os resultados de todos os animais que foram suplementados com o hormônio (independentemente da concentração) em um único grupo, chamado Melatonina. Apresentaremos a seguir, portanto, a comparação entre 2 grupos, o Controle (sem suplementação hormonal; n = 8) e o Melatonina (suplementação hormonal com 1 e 10 mg de melatonina por kg; n = 16).

5.1 Massa corporal e coxins de gordura

A massa corpórea dos animais foi avaliada semanalmente ao longo de todo período do protocolo experimental.

Na figura 8A, temos a evolução da massa corpórea ao longo das 16 semanas do período experimental.

O ganho ou a perda de peso durante esse período foram calculados pela diferença dos pesos final e inicial (Δ) dos animais. Na figura 8B, observa-se que a melatonina foi capaz de induzir redução significativa da massa corporal após 16 semanas de tratamento, além do percentual do coxim de gordura retroperitoneal em relação à massa corporal, bem como o peso bruto deste tecido (figuras 9A e B). Em relação ao tecido adiposo branco periepididimal, não houve diferença significativa entre os grupos, conforme mostram as figuras 10A e B.

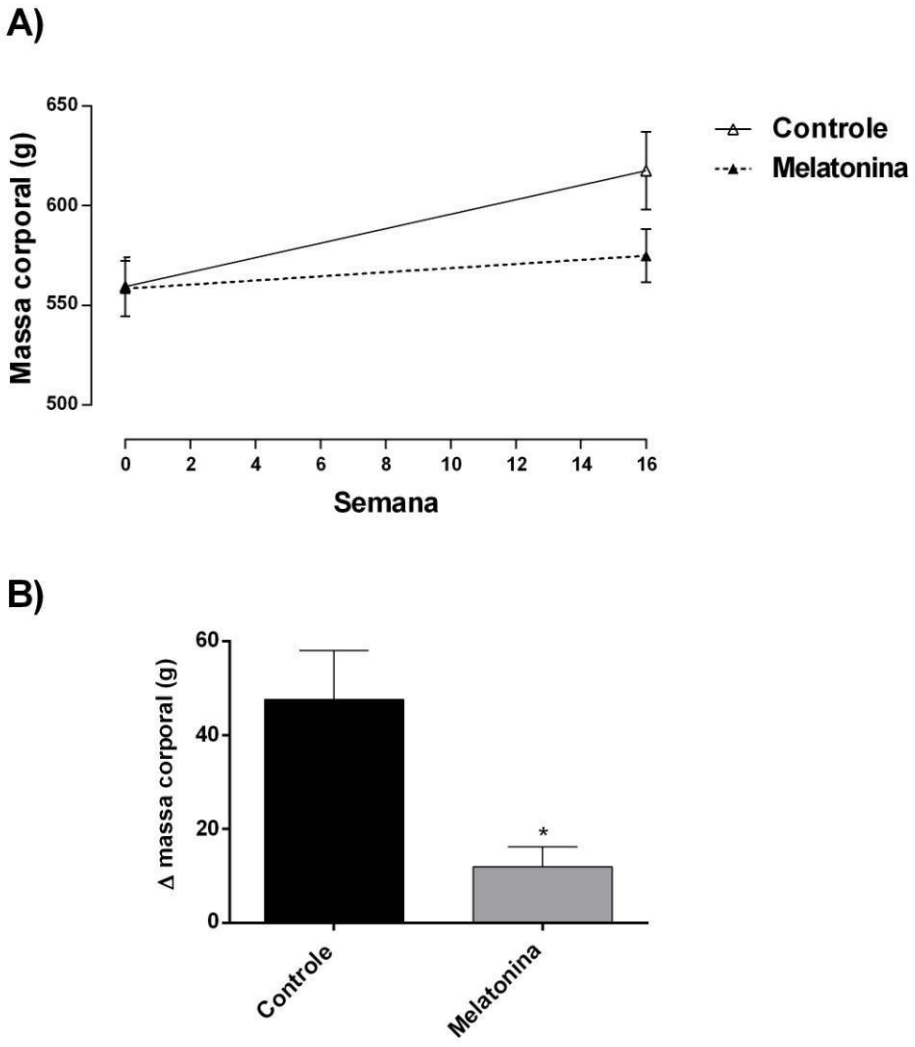

Figura 8 - A) Evolução da massa corporal dos animais, ao longo das 16 semanas do protocolo experimental; B) Diferença entre o peso corporal final e inicial (Δ) dos animais. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

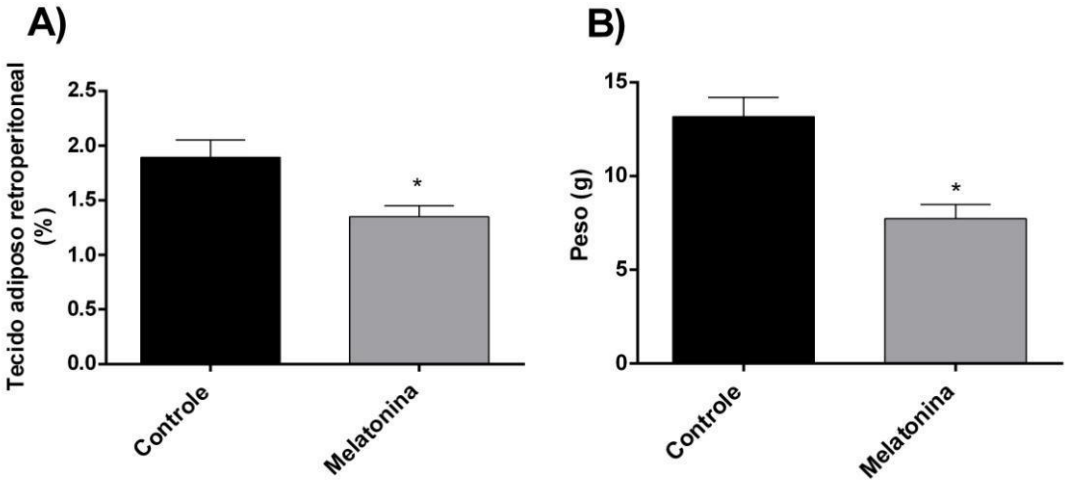

Figura 9 - A) Porcentagem do tecido adiposo retroperitoneal em relação à massa corpórea; B) Peso do tecido adiposo branco retroperitoneal. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

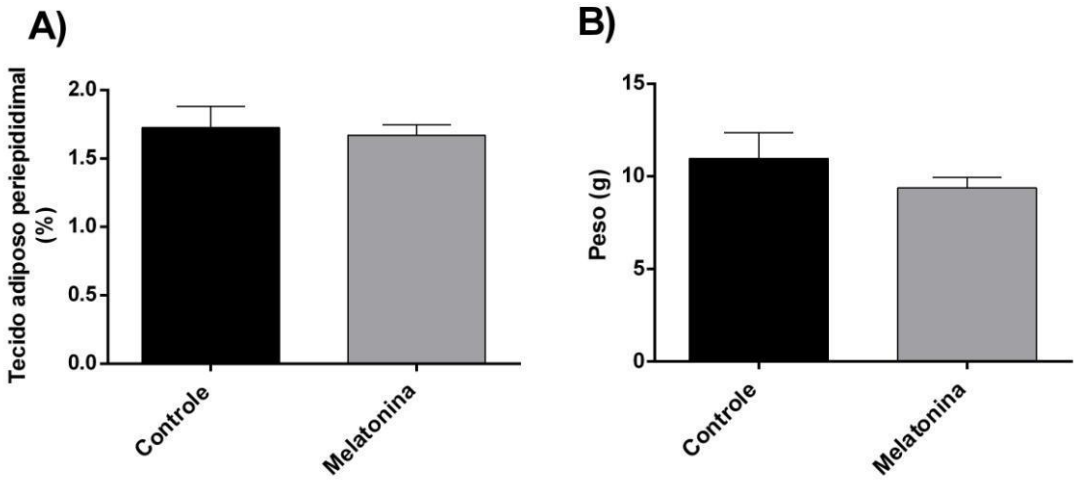

Figura 10 - A) Porcentagem do tecido adiposo periepididimal em relação à massa corpórea; B) Peso do tecido adiposo branco periepididimal. Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

5.2 Expressão gênica

Verificamos que o conteúdo do mRNA de todos genes termogênicos analisados no TAM, foi maior grupo Melatonina em comparação ao grupo Controle, conforme mostram as figuras 11A - E.

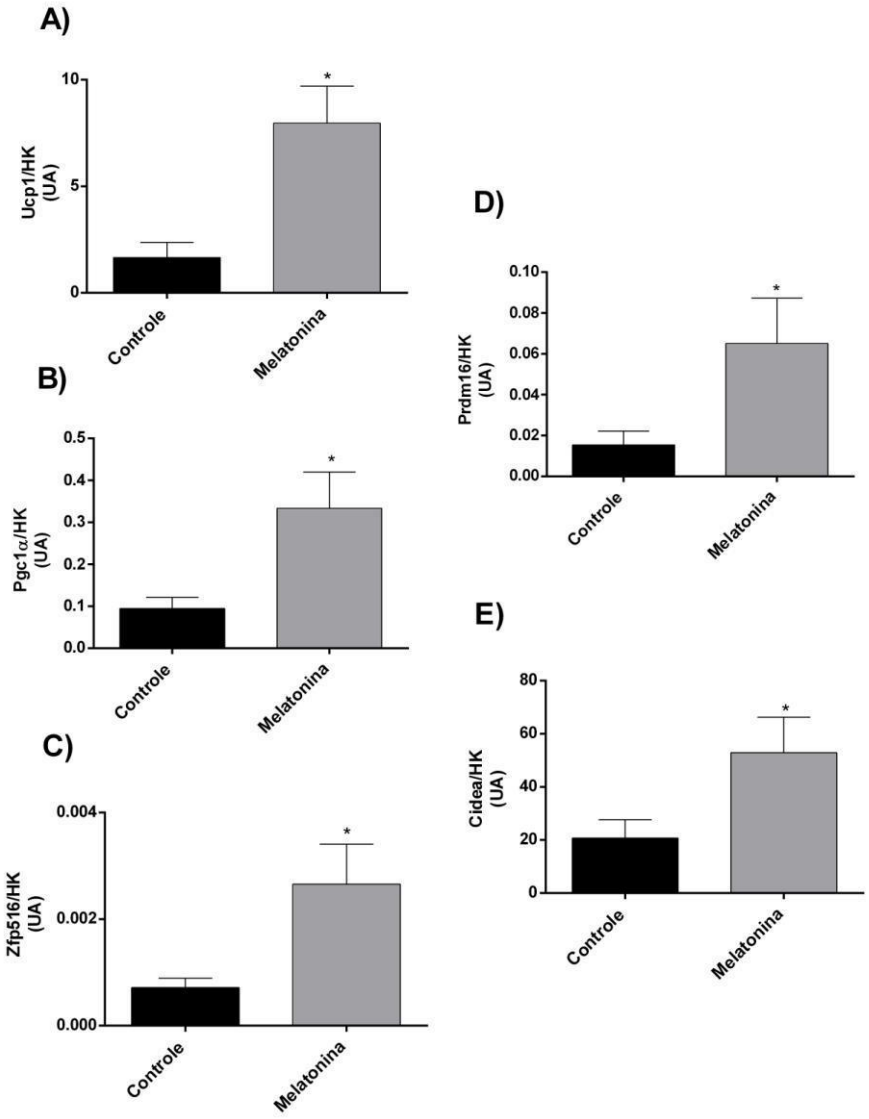

Figura 11 - A) Expressão gênica de Ucp1 no TAM dos animais; B) Expressão gênica de Pgc1α no TAM dos animais; C) Expressão gênica de Zfp516 no TAM dos animais; D) Expressão gênica de Prdm16 no TAM dos animais; E) Expressão gênica de Cidea no TAM dos animais. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Verificamos também a expressão gênica de PGC1α e Fndc5 no músculo sóleo dos animas. As figuras 12A e B mostram que não houve diferença significativa entre os grupos.

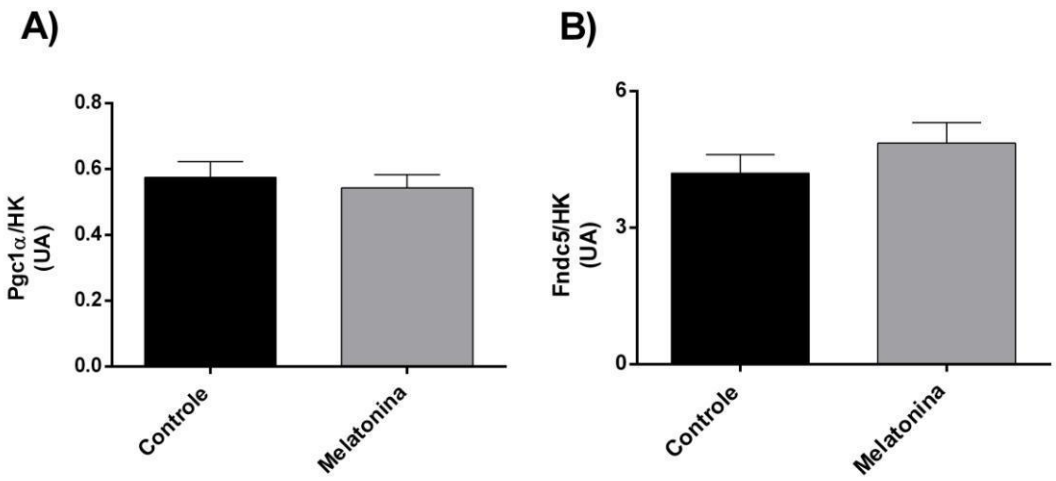

Figura 12 - A) Expressão gênica de Pgc1α no músculo sóleo dos animais; B) Expressão gênica de Fndc5 no músculo sóleo dos animais. Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

5.3 Conteúdo proteico

Analisamos, por *western blotting*, o conteúdo da proteína UCP1 no TAM e no TABi dos animais, conforme ilustrado nas figuras 13A e B, respectivamente.

Assim como o conteúdo de RNA mensageiro, o conteúdo proteico de UCP1 também foi maior no TAM dos animais idosos que receberam suplementação com melatonina por 16 semanas, bem como no TABi.

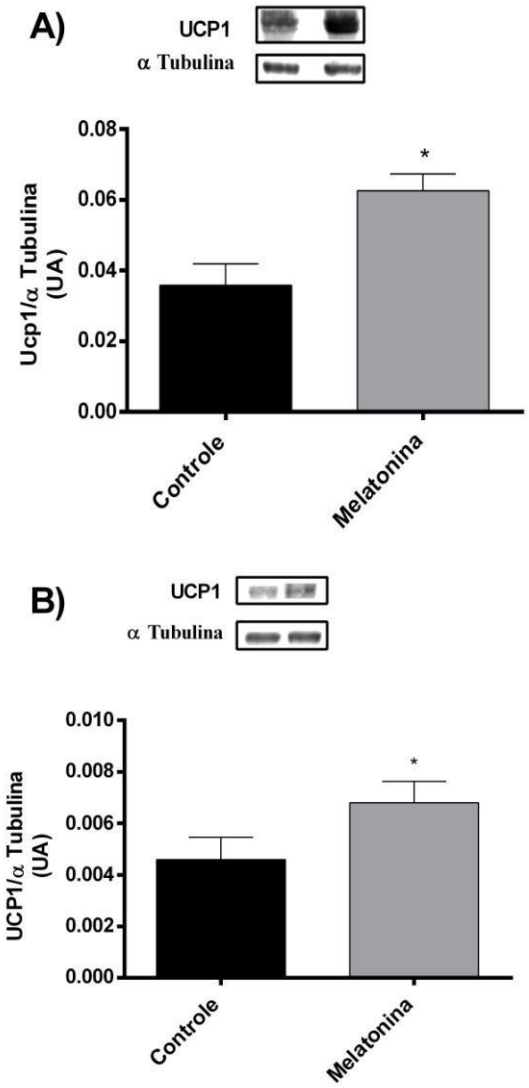

Figura 13 - A) conteúdo proteico de UCP1 no TAM dos animais; B) Conteúdo proteico de UCP1 no TABi dos animais. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

5.4 Intensidade de *browning*

Por meio de cortes histológicos (figura 14A), analisamos a intensidade de *browning* do TABi por densitometria óptica, mediante software ImageJ. A figura 14B nos mostra que os animais do grupo melatonina apresentaram maior escurecimento deste tecido em comparação com o grupo controle. Estes resultados são confirmados pela imagem macroscópica da região inguinal, na qual podemos visualizar maior intensidade de browning no grupo melatonina (figura 14C).

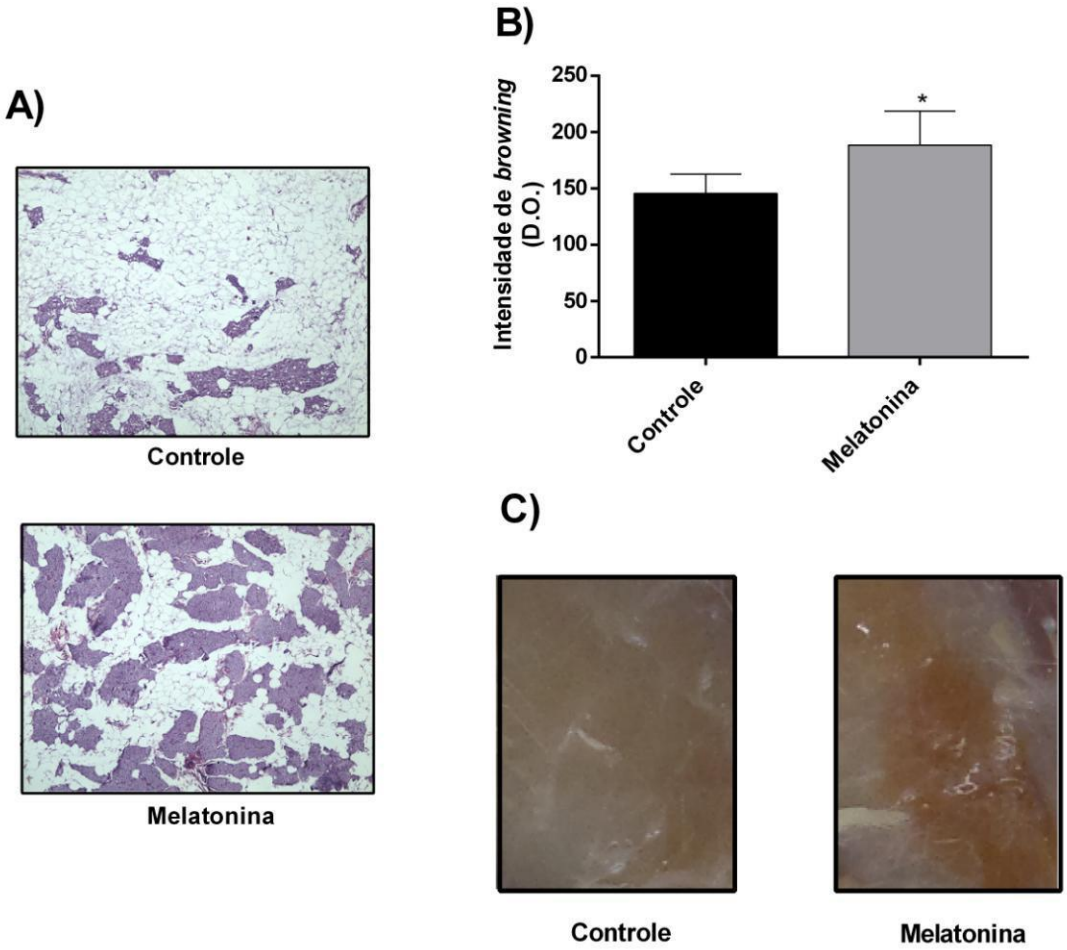

Figura 14 - A) Cortes histológicos representativos do TABi; B) Intensidade de *browning* por densitometria óptica do TABi dos animais; C) Imagem macroscópica representativa do TABi dos animais. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

5.5 Temperatura superficial por meio de termografia, temperatura da pele sobre o TAM e imagens térmicas representativas

Na figura 15A, as análises por termografia nos mostram a diferença (T) entre a temperatura das diversas regiões do corpo (olho, TAM, TABi e cauda)) e a temperatura do ambiente, tanto na temperatura basal, a 24^0C, quanto no frio, a 18^0C. No basal, o tratamento crônico com melatonina induziu menor T no TABi e na cauda, e maior no TAM. No frio, observa-se que o grupo suplementado apresentou menor T no olho e na cauda. Já a figura 15B nos mostra a variação percentual do T das diversas partes do corpo do animal, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Essa variação foi significativamente diferente no grupo melatonina nas regiões do TAM , TABi e na cauda.

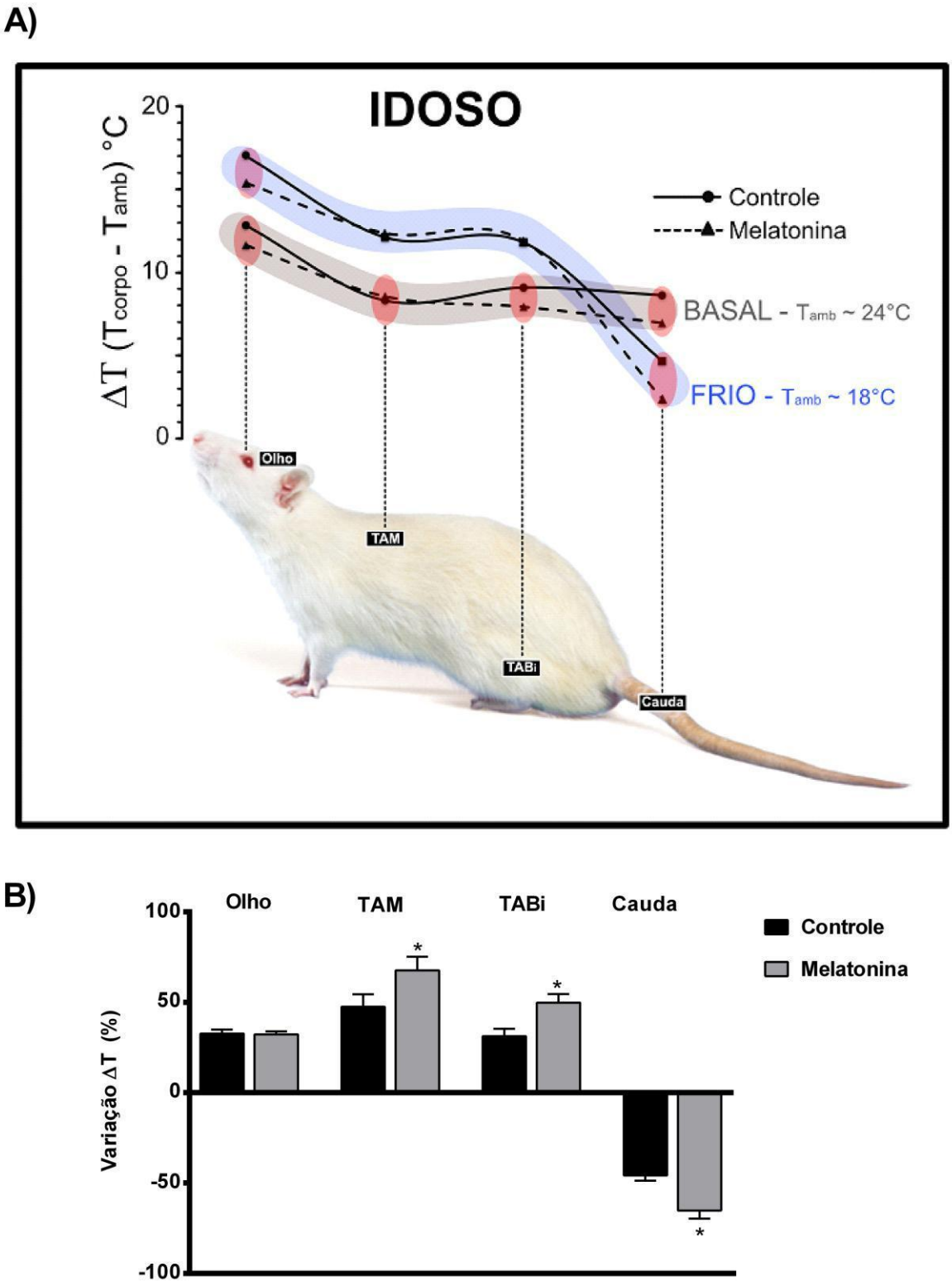

Figura 15 - A) ΔT das diversas regiões corporais na temperatura basal e no frio, o círculo vermelho representa diferença significativa entre os grupos dentro da mesma temperatura ambiente; B) Variação percentual do ΔT das diversas partes do corpo do animal, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Não houve diferença significativa no T do TAM em relação à temperatura da pele sobre o TAM, obtida por termopares, tanto na temperatura basal, quanto no frio (figuras 16A e B). Porém, quando na mudança de temperatura ambiental de 24 ^{0}C para 18 ^{0}C, a variação percentual de T foi estatísticamente diferente no grupo Melatonina, como mostra a figura 16C.

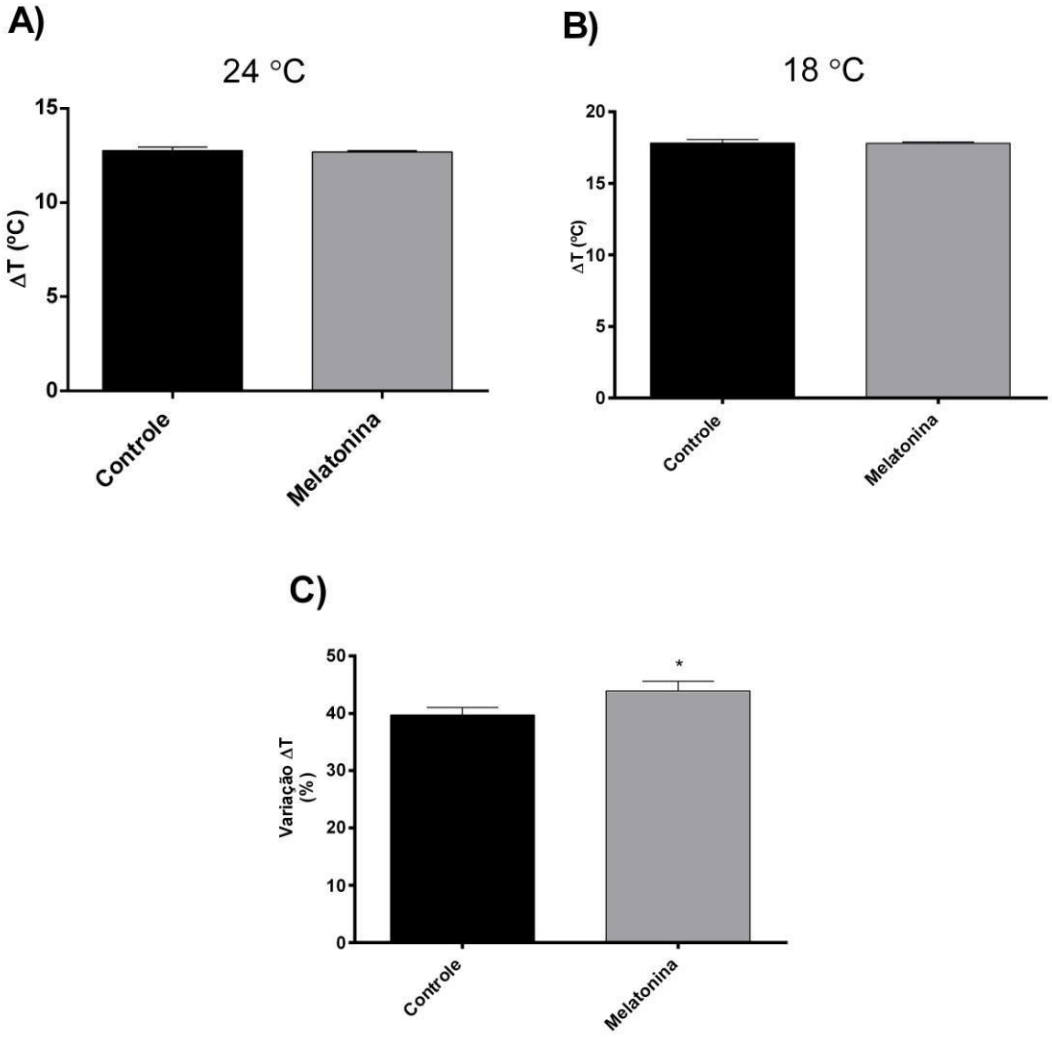

Figura 16 - A) ΔT por condução da pele sobre o TAM no basal; B) ΔT por condução da pele sobre o TAM no frio; C) Variação percentual do ΔT por condução da pele sobre o TAM, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Significância: * vs Controle, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Nas figuras 17A - C, temos a imagem térmica representativa de um animal por grupo, na temperatura basal e no frio, das regiões dorsal, ventral e da cauda. A região dorsal escapular, representa um depósito de adipócitos marrons, enquanto a região ventral, próximo à área inguinal, representa um depósito de adipócitos beges. As imagens térmicas apresentadas a seguir, confirmam os dados de T da figura 15A.

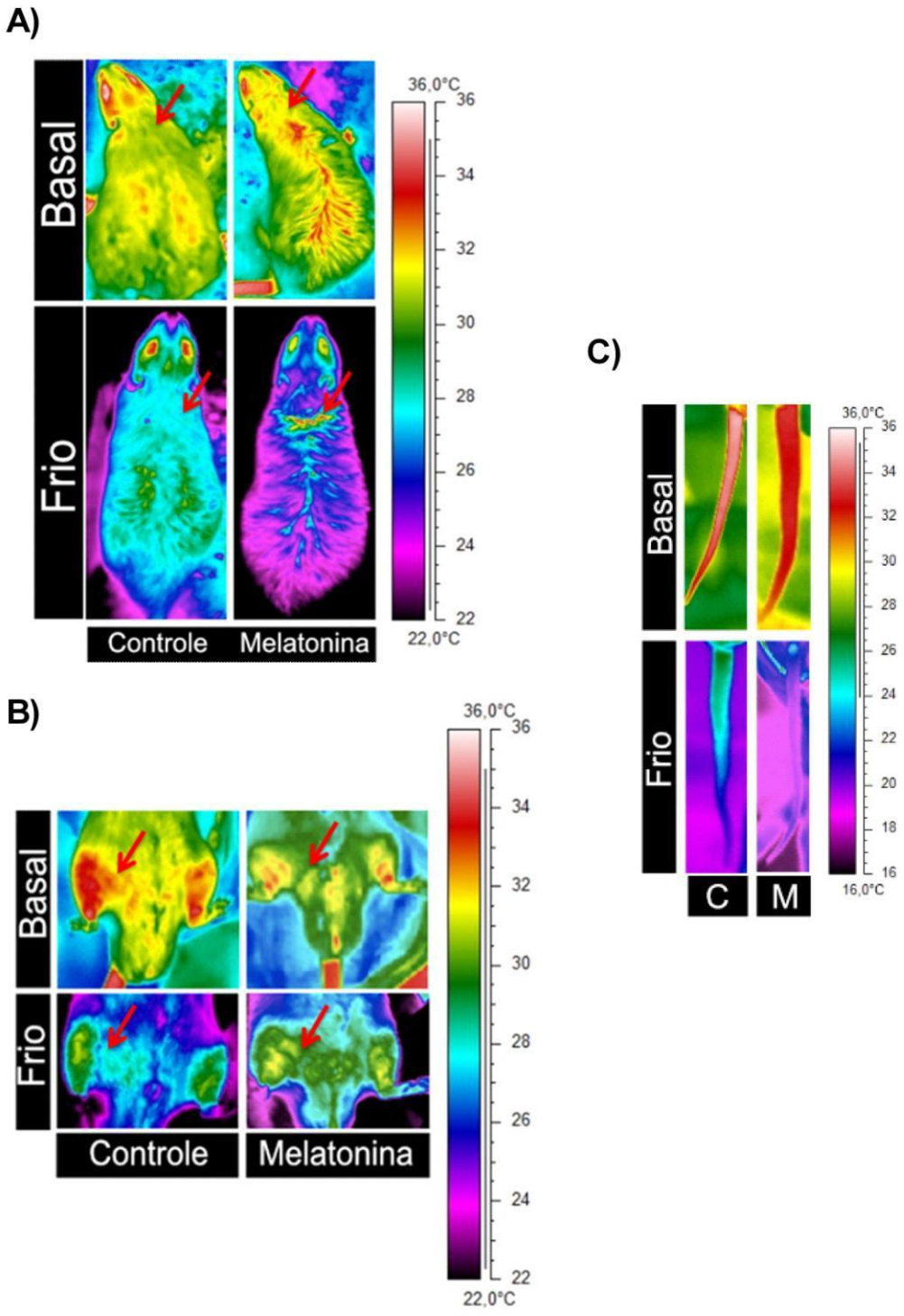

Figura 17 - A) Imagem térmica representativa de um animal por grupo da região dorsal dos animais na temperatura basal e no frio. As setas indicam região correspondente ao TAM; B) Imagem térmica representativa de um animal por grupo da região ventral dos animais na temperatura basal e no frio. As setas indicam região correspondente ao TABi; C) Imagem térmica representativa de um animal por grupo da cauda dos animais na temperatura basal e no frio.

5.6 Temperatura superficial por meio de termografia antes e após o protocolo experimental

Os gráficos a seguir, mostram o T das diversas regiões corpóreas antes e após o período experimental de 16 semanas.

No TAM, observamos que os animais controles apresentaram redução do T após o protocolo experimental, enquanto os animais suplementados não exibiram diferença estatística (figura 18A). Já no frio, apenas o grupo Melatonina apresentou maior produção de calor por este tecido após o mesmo período (figura 18B). A figura 18C, nos mostra que a variação de temperatura do basal para o frio (T Frio – T Basal) foi maior apenas nos animais que receberam tratamento hormonal por 16 semanas.

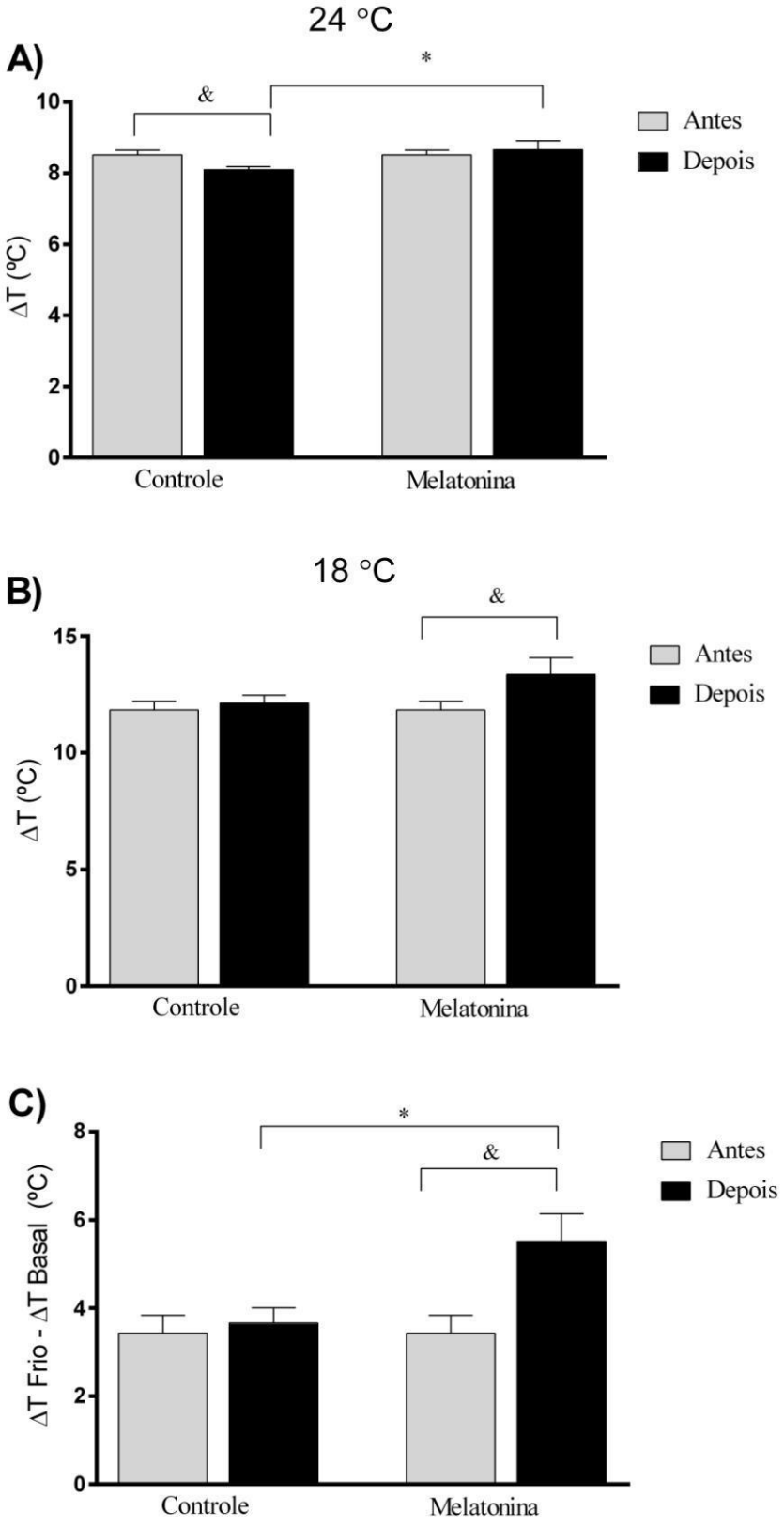

Figura 18 - A) ΔT do TAM antes e após o protocolo experimental a 24 ^{0}C; B) ΔT do TAM antes e após o protocolo experimental a 18 ^{0}C; C) Variação da temperatura no TAM antes e após o protocolo experimental, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Significância: * vs Controle; & vs Antes, (p < 0,05). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Em contrapartida, os adipócitos beges apresentaram redução significativa na produção de calor após as 16 semanas, em ambos os grupos, tanto no basal (figura 19A), quanto no frio (figura 19B). A 24 ^{0}C, os animais suplementados com melatonina apresentaram uma redução na produção de calor ainda maior que os animais controles. No entanto, a variação da produção de calor quando na mudança de ambiente, do basal para o frio, foi significativamente menor apenas no grupo Controle após o protocolo experimental, conforme a figura 19C.

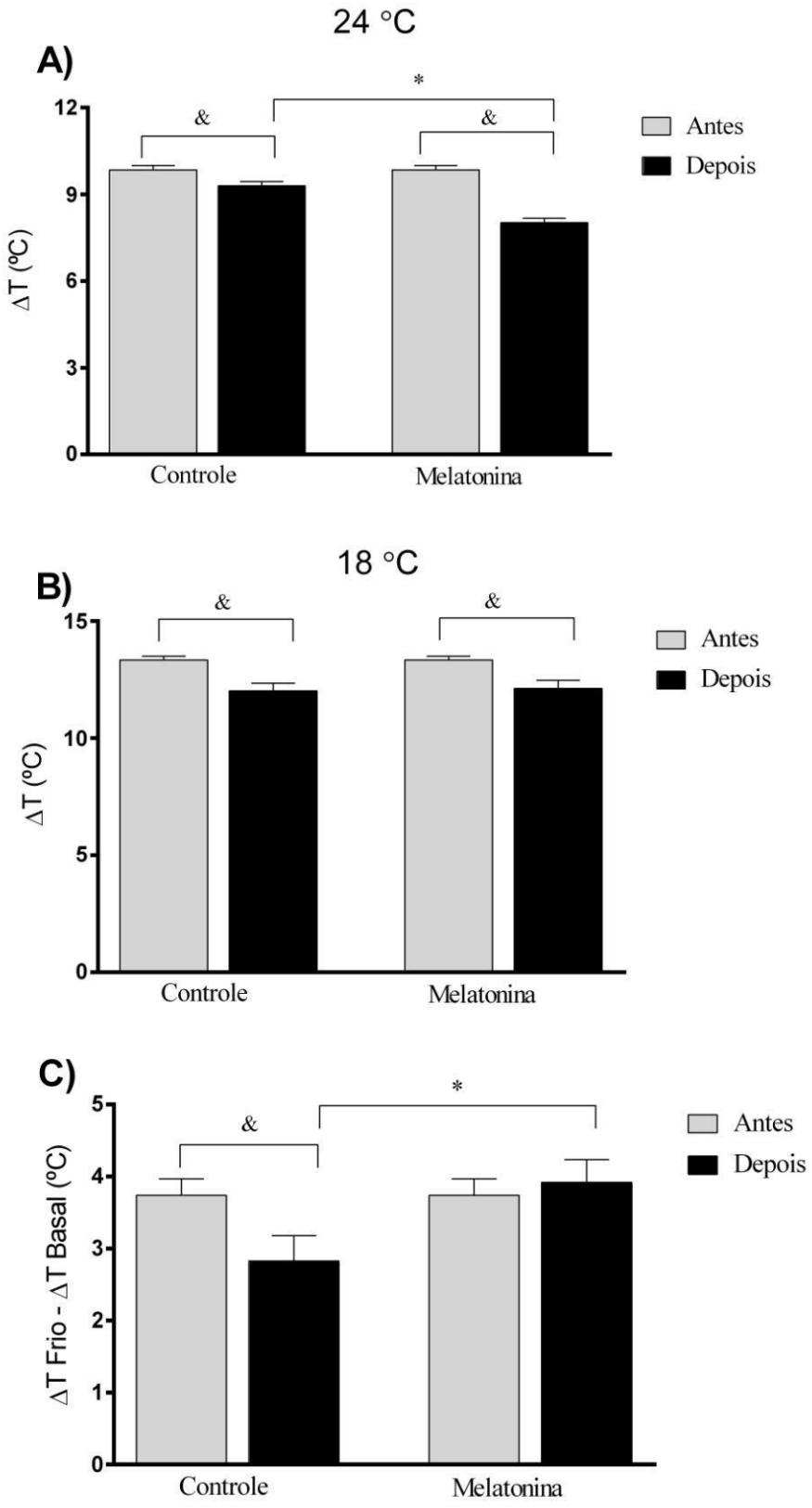

Figura 19 - A) ΔT do TABi antes e após o protocolo experimental a 24 ^{0}C; B) ΔT do TABi antes e após o protocolo experimental a 18 ^{0}C; C) ΔT do TABi antes e após o protocolo experimental, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Significância: * vs Controle; & vs Antes, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

As figuras 20A - C nos mostram o ΔT da cauda dos animais, estrutura responsável por regular a troca de calor com o ambiente. Na temperatura basal do biotério, os animais controles apresentaram maiores valores nesta estrutura após as 16 semanas e, a suplementação com melatonina, impediu este aumento. Já no frio, apenas o grupo Melatonina exibiu redução substancial da temperatura. Quando na mudança de ambiente, a variação foi maior em ambos os grupos após o período experimental, sendo mais intensa nos animais suplementados.

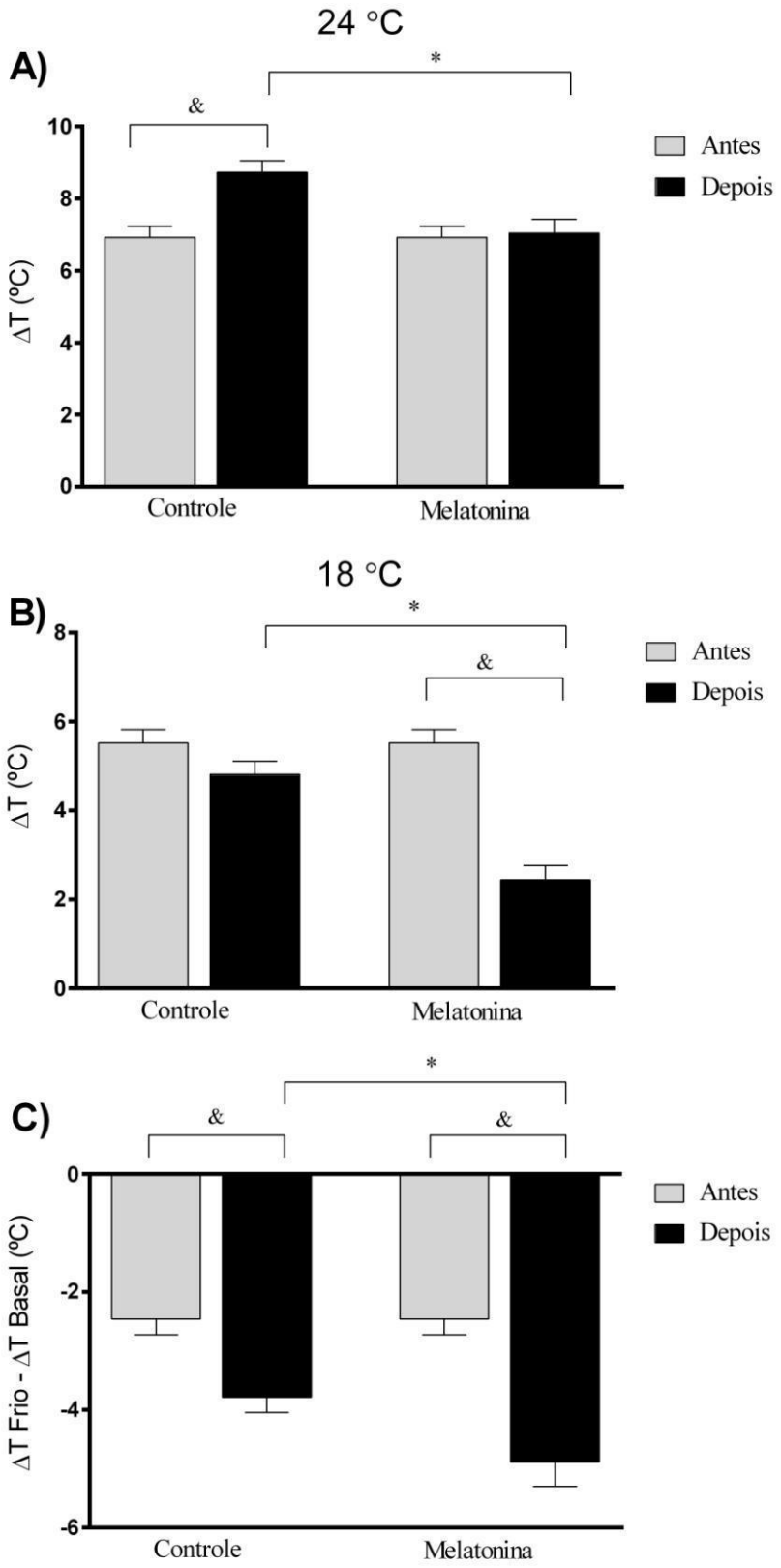

Figura 20 - A) ΔT da cauda antes e após o protocolo experimental a 24 ^{0}C; B) – ΔT da cauda antes e após o protocolo experimental a 18 ^{0}C; C) Variação do ΔT da cauda antes e após o protocolo experimental, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Significância: * vs Controle; & vs Antes, (p < 0,05). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

Segundo Vogel et al (2016), a temperatura do olho correlaciona-se à temperatura corpórea central dos animais. No presente trabalho, verificamos que a 24 ^{0}C ocorreu aumento da temperatura desta região nos animais controles após o período experimental, e o tratamento com melatonina impediu este aumento, conforme mostra a figura 21A. Já quando desafiados ao frio de 18 ^{0}C, apenas o grupo Melatonina exibiu menor ΔT do olho após as 16 semanas (figura 21B). Na mudança de temperatura de 24 para 18 ^{0}C, ambos os grupos apresentaram menores valores após o período experimental, sendo que o tratamento com melatonina induziu uma diminuição significativa em comparação aos animais controles (figura 21C).

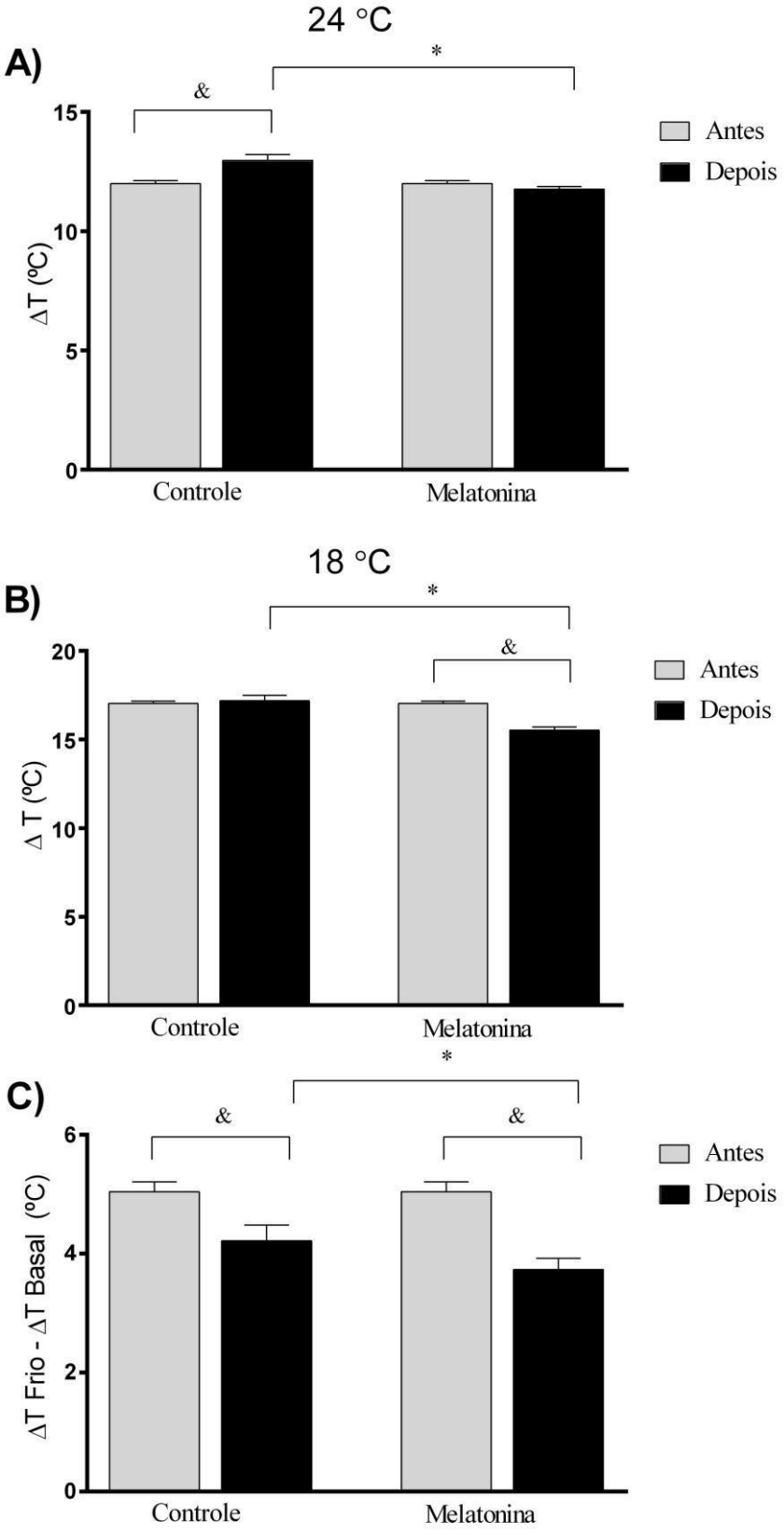

Figura 21 - A) ΔT do olho antes e após o protocolo experimental a 24 ^{0}C; B)) ΔT do olho antes e após o protocolo experimental a 18 ^{0}C; C) Variação do ΔT do olho antes e após o protocolo experimental, quando na mudança de ambiente do basal para o frio. Significância: * vs Controle; & vs Antes, ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos o efeito da suplementação com melatonoina na termorregulação de animais idosos obesos.

Durante processo fisiológico do envelhecimento, a via de sinalização à insulina encontra-se prejudicada, o que contribui para resistência à este hormônio e, consequentemente, intolerância à glicose. Estes fatores são responsáveis, pelo menos em parte, pelo ganho de peso associado à idade. Dentro deste contexto, demonstrou-se recentemente (ZANUTO et al., 2013) que a suplementação rítmica com melatonina em animais envelhecidos recuperou a sensibilidade à insulina (tanto de maneira central, quanto de maneira periférica) antes mesmo destes animais apresentarem mudanças no peso corporal. No presente estudo, nós demonstramos que, após as 16 semanas do período experimental, todos animais exibiram aumento na massa corporal, porém, a suplementação crônica com melatonina, induziu um aumento substancialmente menor. Além disso, os animais do grupo Melatonina também apresentaram menor quantidade de gordura, em particular, do coxim adiposo retroperitoneal. Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios do nosso grupo, que mostram redução significativa do peso corpóreo de animais envelhecidos, quando suplementados com melatonina também por 16 semanas (MENDES et al., 2013). Além disso, Alonso-vale et al., (2004) observaram um papel anti lipogênico da melatonina por meio da inibição da diferenciação de pré adipócitos em adipócitos, reduzindo, portanto, provavelmente, o número de células. Ainda dentro deste contexto, Rasmussen et al., (1999) também verificaram que a administração diária de melatonina diminui a gordura visceral em ratos de meia idade.

Este efeito anti obesogênico da melatonina se deve, provavelmente, ao seu papel regulatório do balanço energético, atuando principalmente no aumento do gasto calórico (CIPOLLA-NETO et al., 2014)**,** já que, apesar de não haver consenso na literatura, este hormônio parece não alterar, de forma significante, a ingestão alimentar (TAN et al., 2011). Tal efeito também é resultado do reestabelecimento da distribuição circadiana do metabolismo energético, da recuperação da sensibilidade à insulina e, consequentemente, recuperação da tolerância à glicose.

Em animais jovens, com a glândula pineal intacta, em dados de nosso grupo ainda não publicados, observamos que a suplementação farmacológica com melatonina (concentração de 10mg/kg) também induziu redução significativa do delta do peso corporal (diferença entre peso final pelo peso incial) após 16 semanas de suplementação hormonal, quando em comparação a animais jovens que não receberam o tratamento hormonal, confirmando os dados da literatura (CIPOLLA-NETO et al., 2014) que demonstram que a administração de melatonina em animais jovens, com produção normal de melatonina pineal, reduz em 25% o ganho de peso e, ainda, reduz em 50% o tamanho de adipócitos viscerais.

Cipolla-neto et al. (2014) sugerem que tais resultados na redução de peso corporal e gordura visceral não estão correlacionados com a diminuição do consumo alimentar ou alteração de algum hormônio que poderia influenciar no metabolismo energético, como testosterona, hormônio tireoidiano e fator de crescimento relacionado à insulina (IGF-I), porém, animais tratados com melatonina, apresentam redução plasmática dos hormônios insulina e leptina.

O balanço energético é resultado, basicamente, do total de energia adquirida e o total de energia despendida pelo corpo. O aumento de peso é a consequência de um desequilíbrio neste processo, no qual a energia ingerida excede a energia gasta; o

contrário também ocorre e, quando o gasto energético excede a energia ingerida, tem-se uma redução do peso corporal. Dentro deste contexto, já que a melatonina parece não influenciar no consumo energético, a redução de peso provocada pela suplementação hormonal estaria relacionada, portanto, ao aumento do dispêndio calórico. Tan et al. (2011) sugerem um potencial envolvimento do TAM como sendo um dos grandes responsáveis pelo aumento do gasto energético e consequente diminuição do peso corporal em resposta ao tratamento com melatonina. Devido ao seu papel termogênico e alta atividade metabólica, os adipócitos marrons utilizam muitas calorias com a finalidade principal de produzir calor, sendo assim, isto provoca um aumento do consumo de glicose e ácidos graxos e diminuição de depósitos de gordura branca (RICHARD; PICARD, 2011). Em nossos resultados, verificamos que o tratamento com melatonina por 16 semanas, em animais idosos, induziu aumento no conteúdo de RNA mensageiros de diversos genes relacionados à função termogênica do TAM, dentre eles PGC1α e PRDM16, genes que codificam proteínas que são reguladoras transcricionais envolvidas no processo de diferenciação de adipócitos marrons (SEALE et al., 2008); Zfp516, cuja função principal é aumentar a ativação transcricional da UCP1, além de também promover diferenciação e ativação do TAM e adipócitos beges (SEALE, 2015); Cidea, gene predominante expresso nas células de gordura marrom, onde regula a atividade da UCP1 e do metabolismo lipídico (SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009); além do aumento da expressão gênica e proteica da própria UCP1. Em relação à produção de calor do TAM, analisada neste trabalho por termografia, verificamos que a atividade metabólica deste tecido diminui com o processo de envelhecimento, como é observado nos animais do grupo controle após as 16 semanas do período experimental. De fato, este tecido parece tornar-se menos funcional conforme o envelhecimento (CYPESS; KAHN, 2010). No entanto, demonstramos aqui que a suplementação com

melatonina impediu este processo típico do envelhecimento, uma vez que não observamos tal diminuição da produção de calor pelo TAM nos animais tratados na temperatura basal e, quando expostos ao frio, o ΔT foi maior no grupo Melatonina. Estes dados em conjunto, por outro lado, confirmam, portanto, esta postulada função da melatonina em induzir redução do peso corporal por meio do aumento do gasto energético via TAM.

Em Hamster Sírios, Viswanathan et al. observaram que o tratamento com melatonina induziu, no animal, maior capacidade de termogênese sem tremor, no entanto, poucas mudanças ocorreram de fato na produção de calor. Outro estudo demonstrou ainda, que a administração com melatonina não induziu qualquer alteração em relação à termogênese sem tremor em roedores (FEIST; FEIST, 1986). Tan et al. (2011) sugerem que tais resultados se devem à propriedade da melatonina em elevar o recrutamento do TAM, mas não necessariamente induzir aumento da produção de calor por este tecido em alguns tipos de roedores, já que a função primária deste hormônio é apenas aumentar a capacidade termogênica do animal, ou seja, prepará-lo para o inverno iminente. De fato, no presente estudo, verificamos no grupo Melatonina maiores alterações na produção de calor pelo TAM principalmente quando os animais foram desafiados ao frio (figura 18B). Além disso, a variação percentual do ΔT por condução da pele próxima ao TAM, quando na mudança de ambiente do basal para o frio, foi significativamente maior no grupo melatonina (figura 16C). Quanto ao TABi, apesar de aumento da expressão proteica de UCP1 e maior nível de browning, os dados termográficos mostraram que este tecido apresentou menor ΔT na temperatura basal nos animais suplementados, porém, quando estes animais foram submetidos ao ambiente frio, o percentual de variação do ΔT foi significativamente maior em relação aos controles. Estes achados corroboram com a hipótese de que a melatonina apresenta uma

função em induzir maior capacidade de suportar ao frio, devido, provavelmente, à melhora na eficiência termogênica.

Ainda em relação à melatonina e sua função na termogênese, Viswanathan et al. reportaram, em ratos, a existência de receptores deste hormônio nas artérias caudais, sabidamente envolvidas na termorregulação (YOUNG; DAWSON, 1982). Este hormônio, por meio de sua ação no tônus da musculatura destes vasos, é capaz de induzir ajustes circulatórios nas artérias caudais, de maneira a promover a vasoconstrição e, consequentemente, redução da dissipação do calor da pele da cauda para o ambiente. Em nossos resultados, pudemos observar este efeito vasoconstritor da melatonina na cauda dos animais, tanto a 24 quanto a 18 ^{0}C. Em relação à comparação entre antes e depois do período experimental, a figura 20A nos mostra que ao longo destas 16 semanas, houve aumento do ΔT (ou seja, menor vasoconstrição) na cauda dos animais controles provavelmente devido, não só à redução gradativa de melatonina conforme o enevlhecimento, mas também à redução dos receptores de melatonina neste local conforme à idade (LAITINEN et al., 1992). Confirmando essa hipótese, a suplementação hormonal, em níveis farmacológicos, impediu este efeito. Além disso, quando desafiados ao frio, a melatonina fez com que os animais tratados apresentassem menor ΔT caudal, ou seja, estes animais sofreram maior constrição arterial na cauda, garantindo assim maior retenção de calor corporal. Deste modo, estes dados confirmam, portanto, que a suplementação com melatonina no animal idoso, impediu o avanço dos distúrbios termorregulatórios provocados pelo envelhecimento garantindo, no caso, que o animal idoso tratado com melatonina possa se adaptar melhor ao frio, melhorando assim, sua condições de sobrevivência.

Em relação ao contexto melatonina, termogênese e temperatura corporal, ainda não há um consenso na literatura, já que a regulação da temperatura corpórea em

mamíferos pode ser determinada por diversos fatores. Em humanos, alguns estudos relatam a melatonina como um agente hipotermiante (BURGESS et al., 2001), porém, parece que este hormônio, ao reduzir a temperatura corpórea de maneira central, concomitantemente, induz aumento da temperatura periférica. Além disso, parece não haver relato que indique que o efeito hipotérmico da melatonina na temperatura central de humanos seja resultado da redução da produção de calor (termogênese) e sim uma consequência de sua ação dilatadora de vasos periféricos, facilitando assim a perda de calor (GILBERT et al., 1999). Ainda em humanos, identificou-se receptores de melatonina no centro termorregulador hipotalâmico, onde o hormônio parece regular para baixo o *set point* da temperatura central e, perifericamente, induzir dilatação de pequenos vasos (WEAVER et al., 1993). Em roedores, alguns trabalhos reportam aumento da temperatura corpórea via administração de melatonina graças ao aumento da termogênese sem tremor (HAIM; FOURIE, 1982), suas ações na atividade tireoidiana (PADMAVATHAMMA; JOSHI,) ou sua capacidade de promover aumento da atividade locomotora (WOLDEN-HANSON et al., 2000). Já outros estudos, mostram um efeito hipotermiante da melatonina em ratos e hamsters sírios (BRUNO et al., 2005; RAGHAVENDRA; AGREWALA; KULKARNI, 1999). No presente trabalho, além dos tecidos adiposos marrom e branco inguinal, envolvidos no processo de termogênese sem tremor, e da cauda, estrutura caracterizada como a janela térmica do animal, verificamos também, por termografia, a temperatura máxima optica dos roedores (TMO). Em trabalho recente, Vogel et al. (2016) sugerem que a temperatura máxima da superfície ocular de ratos, analisada por termografia, representa um método alternativo e não invasivo da determinação da temperatura retal, ou seja, a TMO poderia corresponder à temperatura corpórea central. Apesar de, segundo nossos resultados, o animal submetido ao tratamento crônico com melatonina parecer estar mais apto a

suportar o frio, observamos que o grupo suplementando, após 16 semanas, apresentou menor ΔT da TMO quando em comparação ao grupo controle. Uma possível explicação para este achado poderia estar relacionada com a diferença no índice de massa corpórea (IMC) entre os 2 grupos, já que, ao final do tratamento, os animais suplementados apresentaram peso corpóreo substancialmente menor que seus homólogos controles. Em relação à essa hipótese, Alexander et al. (2015) revisaram sobre a camada de gordura localizada ao redor do corpo, logo abaixo da derme, o chamado tecido adiposo branco dérmico. Estes adipócitos atuam como potentes isolantes, de maneira a diminuir a perda de calor corporal devido sua baixíssima condutância térmica. Esta camada adiposa parece aumentar de acordo com o IMC e suprimir a ativação do TAM. Ao compararmos o antes e depois do período experimental, a figura 21A nos mostras que, em temperatura basal, o aumento do ΔT da TMO foi significativamente maior apenas no grupo controle, que apresentou intenso aumento da massa corporal ao final do protocolo.

Conforme mencionado anteriormente, nosso biotério de experimentação animal apresenta uma temperatura aproximada de 24 ^{0}C. Postula-se que, para animais da linhagem Wistar, a zona termoneutra encontra-se na faixa de 29.5-30.5 ^{0}C (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002), porém, vários fatores podem influenciar e modular este parâmetro, como por exemplo, taxa de metabolismo basal, consumo alimentar recente e variáveis relacionadas ao tamanho corporal e área superficial. Neste âmbito, Speakman et al. (2012) questionam a temperatura considerada termoneutra para camundongos (também por volta de 30 ^{0}C) e relata que há uma forte correlação negativa entre a margem inferior da zona de termoneutralidade e peso corporal, conforme ilustrado na figura 22 do anexo. Além disso, Maskrey et al. (2001) reportaram que animais obesos apresentam maior preferência por ambientes com

menores temperaturas, quando em comparação com animais magros, provavelmente devido à maior proteção térmica isolante e, ainda, diferenças no *set point* da temperatura corpórea central, que no animal obeso encontra-se alterado independentemente da idade, gênero ou temperatura prévia de aclimatação (MASKREY; MEGIRIAN; FARKAS, 1998; MASKREY; WIGGINS; FRAPPELL, 2001). A figura 23 do anexo mostra que, antes mesmo do início do protocolo experimental de 16 semanas, os animais idosos apresentavam massa corporal significativamente maior que animais jovens, com 3 meses idade. Sendo assim, tendo como base estes dados, inferimos que nossos animais envelhecidos estavam em uma faixa de temperatura que se aproximava da termoneutralidade, quando em comparação com os jovens roedores.

Além disso, quando comparamos o ΔT do TAM antes e após o período experimental, podemos observar que a exposição dos animais idosos à temperatura de 24 ^{0}C do biotério, não induziu qualquer aumento na produção de calor por parte deste tecido em resposta adaptativa ao frio (figuras 18A e 18B).

Alguns trabalhos sugerem que os adipócitos marrons e beges, ambos responsáveis pela termogênese sem tremor, atuam de maneira sincronizada. PAN et al. (2014), utilizando camundongos transgênicos, mostraram que a superexpressão do micro RNA 378 promove aumento da adipogênese apenas no TAM e consequente expansão deste tecido, o que induziu a supressão do desenvolvimento de adipócitos beges no TABi. Esta expansão do TAM, por si só, foi suficiente para prevenir a obesidade genética ou induzida por dieta, mesmo diante da diminuição da atividade dos adipócitos beges. Por outro lado, Schulz et al. (2013) demonstraram, também por meio de camundongos transgênicos, que a supressão do desenvolvimento do TAM, via abolição dos receptores da proteína BMP (*bone morphogenetic protein*, fundamental para formação e atividade termogênica do TAM) levou a um aumento da sinalização

simpática no TABi, promovendo, portanto, a formação de adipócitos beges. Nestes animais, esse mecanismo compensatório foi suficiente para manter a homeostase da temperatura corporal e induzir resistência contra a obesidade. Ainda utilizando animais transgênicos, Kopecky et al. (1995) reportaram que a expressão ectópica de Ucp1 no TAB inibiu a expressão endógena deste gene no TAM. Já em camundongos selvagens, Kalinovich et al. (2017) em trabalho recente, relataram que estes animais apresentaram maior conteúdo gênico e proteico de UCP1 nos adipócitos beges apenas quando seus adipócitos marrons já estavam em sua capacidade máxima de ativação, sugerindo que o TABi é um tecido acessório para termorregulação. Em nossos resultados, as análises por meio de termografia (figura 15A) nos mostram que, em uma situação basal, a produção de calor pelos adipócitos beges foi menor devido à suplementação com melatonina, apesar de seu maior potencial termogênico, evidenciado pelo maior nível de *browning* e aumento do conteúdo proteico de UCP1. Nestes mesmos animais, a termogênese do TAM, no basal, foi maior. O grupo Controle, por sua vez, também em temperaturas basais, exibiu redução do ΔT do TAM após 16 semanas, mas em compensação, a redução do ΔT no TABi, após este período, foi menos intensa que no grupo Melatonina. Estes achados demonstram de maneira fisiológica, sem qualquer intervenção genética ou cirúrgica, a provável existência de um importante *cross-talk* entre adipóctios marrons e beges, que assegura um mecanismo compensatório de termorregulação de maneira coordenada. Sugerimos ainda, que esta sofisticada maquinaria de controle da temperatura corporal, participa do controle do balanço energético e, indiretamente, do controle de doenças metabólicas.

O mecanismo por trás deste *cross-talk* entre adipócitos ainda não está muito bem elucidado. Especula-se que esteja relacionado com alterações no comando simpático dos tecidos termogênicos, ou ainda, alteração na expressão de genes importantes para

diferenciação celular e produção de calor, como Prdm16 (PAN et al., 2014).(PAN et al., 2014).

Interessantemente, o escurecimento do TAB também pode ser induzido por meio da irisina, uma miocina descoberta recentemente, que parece atuar no tecido adiposo branco subcutâneo (principalmente inguinal) via um receptor ainda desconhecido. Este mecanismo é regulado pelo coativador transcricional PGC1α, que, por sua vez, parece estimular a produção de FNDC5, uma proteína de membrana do tipo I que é clivada, dando origem à irisina (KELLY, 2012). Este processo parece ser estimulado pela contração muscular principalmente durante exercício. Diversos experimentos mostram que exercício/FNDC5/irisina são capazes de aumentar, em adipócitos brancos, além de outros fatores, a expressão de UCP1, PGC1α (principal regulador transcricional dos genes envolvidos na termogênese) e o número de gotículas multiloculares (típicas do TAM), aumentando, deste modo, a termogênese e o gasto energético, promovendo, portanto, proteção contra obesidade (BOSTRÖM et al., 2012b). Neste mesmo trabalho, demonstrou-se também que certos depósitos de tecido adiposo branco são mais propensos a desenvolverem *browninig* que outros, sendo o TABi o mais propenso ao escurecimento. Em nossa pesquisa, nos propusemos a verificar se o tratamento com melatonina poderia induzir aumento da expressão gênica de Pgc1α e Fndc5 no músculo sóleo, já que, conforme demonstrado em trabalho prévio de nosso grupo, este hormônio medeia todas as adaptações ao exercício aeróbio em animais idosos (MENDES et al., 2013). Apesar de observamos uma tendência de aumento no conteúdo do RNA mensageiro de Fndc5 nos animais suplementados com melatonina, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais. Apesar de Fndc5 ser dependente de Pgc1α, não observamos, neste trabalho, uma tendência de aumento também na expressão deste gene, provavelmente devido ao fato de que outros coativadores transcricionais, como

ERRα (e*strogen-related receptor alpha)*, também regulam a expressão de Fndc5 (WRANN et al., 2014).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, nossos principais resultados mostram que suplementação com melatonina em animais idosos impede os efeitos do envelhecimento sobre a capacidade termorregulatória de animais idosos. Além disso, sugerem que o processo termogênico ocorre de forma global e coordenada, de maneira que, havendo mobilização do tecido adiposo marrom e produção de calor adequada e suficiente para manutenção da homeostasia, a termogênese via adipócitos beges não seria efetivada. Mas quando, por algum motivo, faz-se necessário o aumento da produção de calor, como por exemplo, em uma situação de exposição ao frio, ou ainda, quando por algum motivo não há mobilização suficiente do TAM, os adipócitos beges são recrutados de maneira acessória ou compensatória. Nossos resultados mostram também que no animal idoso, a melatonina participa ativamente deste processo, de maneira que, quando administrada terapeuticamente, aumenta o potencial termogênico do animal, garantindo sua sobrevivência em situações de menores temperaturas ambientais, além de, concomitantemente, participar da regulação do balanço energético.

REFERÊNCIAS*

AARSETH, J. J.; NORDØY, E. S.; STOKKAN, K. A. Melatonin potentiates the vasoconstrictive effect of noradrenaline in renal artery from newborn hooded seals (Cystophora cristata) and harp seals (Phoca groenlandica). **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 171, n. 6, p. 491–496, ago. 2001.

ALEXANDER, C. M. et al. Dermal white adipose tissue: a new component of the thermogenic response. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 11, p. 2061–2069, nov. 2015.

ALONSO-VALE, M. I. C. et al. Pinealectomy alters adipose tissue adaptability to fasting in rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 53, n. 4, p. 500–506, abr. 2004.

ANDRADE, D. V. Thermal windows and heat exchange. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 451–451, 2 out. 2015.

ANHÊ, G. F. et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. **Journal of neurochemistry**, v. 90, n. 3, p. 559–566, ago. 2004.

BAMSHAD, M.; SONG, C. K.; BARTNESS, T. J. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 6 Pt 2, p. R1569-R578, jun. 1999.

BARTNESS, T. J.; DEMAS, G. E.; SONG, C. K. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 227, n. 6, p. 363–376, jun. 2002.

BJÖRNTORP, P. Neuroendocrine ageing. **Journal of internal medicine**, v. 238, n. 5, p. 401–404, nov. 1995.

BLIGH, J.; JOHNSON, K. G. Glossary of terms for thermal physiology. **Journal of applied physiology**, v. 35, n. 6, p. 941–961, dez. 1973.

BODKIN, N. L. et al. Hyperleptinemia: relationship to adiposity and insulin resistance in the spontaneously obese rhesus monkey. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme**, v. 28, p. 674–678, 1996.

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

BOSTRÖM, P. et al. A PGC1a dependent myokine that derives browning of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012a.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 108–115, 29 set. 1998.

BRUNO, V. A. et al. Melatonin treatment counteracts the hyperthermic effect of lipopolysaccharide injection in the Syrian hamster. **Neuroscience letters**, v. 389, n. 3, p. 169–172, 9 dez. 2005.

BUEMANN, B.; TREMBLAY, A. Effects of exercise training on abdominal obesity and related metabolic complications. **Sports Med**, v. 21, p. 191–212, 1996.

BURGESS, H. J. et al. Effects of bright light and melatonin on sleep propensity, temperature, and cardiac activity at night. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 3, p. 1214–1222, set. 2001.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, jan. 2004a.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. A. N. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004b.

CHEN, X. M. et al. New apparatus for studying behavioral thermoregulation in rats. **Physiology & behavior**, v. 64, n. 3, p. 419–424, 1 jun. 1998.

CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of pineal research**, v. 56, n. 4, p. 371–381, maio 2014.

COHADE, C.; MOURTZIKOS, K. A.; WAHL, R. L. "USA-Fat": prevalence is related to ambient outdoor temperature-evaluation with 18F-FDG PET/CT. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1267–1270, ago. 2003.

COSTFORD, S.; GOWING, A.; HARPER, M.-E. Mitochondrial uncoupling as a target in the treatment of obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 671–678, nov. 2007.

CYPESS, A. M. et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009.

CYPESS, A. M.; KAHN, C. R. The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 4, p. 478–484, ago. 2010.

DIAZ, B.; BLÁZQUEZ, E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 18, n. 4, p. 225–229, abr. 1986.

EKSTRÖM, P.; MEISSL, H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the

fate of neuroendocrine photoreceptors. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 358, n. 1438, p. 1679–700, 29 out. 2003.

FEIST, D. D.; FEIST, C. F. Effects of cold, short day and melatonin on thermogenesis, body weight and reproductive organs in Alaskan red-backed voles. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 156, n. 5, p. 741–746, 1986.

FELDMANN, H. M. et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell metabolism**, v. 9, n. 2, p. 203–209, fev. 2009.

FRASCHINI, F. et al. Melatonin and immunity. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 29, n. 6, p. 775–776, jan. 1990.

GARCIA, R. A.; ROEMMICH, J. N.; CLAYCOMBE, K. J. Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 24, 18 dez. 2016.

GILBERT, S. S. et al. Peripheral heat loss: a predictor of the hypothermic response to melatonin administration in young and older women. **Physiology & behavior**, v. 66, n. 2, p. 365–370, abr. 1999.

GINALDI, L. et al. Immunological changes in the elderly. **Aging (Milan, Italy)**, v. 11, n. 5, p. 281–286, out. 1999.

GOLDMAN, B. D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **Journal of biological rhythms**, v. 16, n. 4, p. 283–301, 2001.

GOLOZOUBOVA, V. et al. Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 11, p. 2048–2050, 2001.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 5, p. 963–991, maio 1990.

HAIM, A.; FOURIE, F. L. Effects of melatonin on heat production and enzymatic activity in diurnal and in nocturnal rodents. **Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology**, v. 71, n. 3, p. 473–475, jan. 1982.

HENDEN, T. et al. Age-associated reduction in pineal beta-adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. **Biological Signals**, v. 1, n. 1, p. 34–39, 1992.

JANSKÝ, L. Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 48, n. 1, p. 85–132, fev. 1973.

JIMÉNEZ-ARANDA, A. et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of pineal research**, v. 55, n. 4, p. 416–423, nov. 2013.

JOHNSON, R. F.; MORIN, L. P.; MOORE, R. Y. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. **Brain research**, v. 462, n. 2, p. 301–312, 18 out. 1988.

KAJIMURA, S.; SEALE, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional Control of Brown Fat Development. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 257–262, 7 abr. 2010.

KALINOVICH, A. V et al. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. **Biochimie**, v. 134, p. 127–137, mar. 2017.

KARASEK, M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. **Experimental gerontology**, v. 39, n. 11–12, p. 1723–1729, jan. .

KELLY, D. P. Irisin, Light My Fire. **Science**, v. 336, n. 6077, p. 42–43, 2012.

KOPECKY, J. et al. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 6, p. 2914–2923, dez. 1995.

LAITINEN, J. T. et al. Differential regulation of the rat melatonin receptors: selective age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. **Endocrinology**, v. 130, n. 4, p. 2139–2144, abr. 1992.

LEAN, M. E. et al. Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 71, n. 3, p. 291–297, set. 1986.

LIEBERMAN, H. R. Behavior, sleep and melatonin. **Journal of neural transmission. Supplementum**, v. 21, p. 233–241, jan. 1986.

LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. **Analytical biochemistry**, v. 302, n. 1, p. 52–59, 1 mar. 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LÓPEZ, A. et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. **Journal of pineal research**, v. 46, n. 2, p. 188–198, mar. 2009.

LYNCH, G. R.; EPSTEIN, A. L. Melatonin induced changes in gonads; pelage and thermogenic characters in the white-footed mouse, Peromyscus leucopus. **Comparative biochemistry and physiology. C: Comparative pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 67–68,

jan. 1976.

MOLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **Microscopy Research and Technique**, v. 21, n. 3, p. 188–204, 1 maio 1992.

MAESTRONI, G. J. The immunotherapeutic potential of melatonin. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 10, n. 3, p. 467–476, mar. 2001.

MAICKEL, R. P. et al. Antagonism of physostigmine induced hypothermia and neuroendocrine changes following exposure to different environmental temperatures. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 873–884, 1991.

MÅRTENSSON, L. G.; ANDERSSON, R. G.; BERG, G. Melatonin together with noradrenaline augments contractions of human myometrium. **European journal of pharmacology**, v. 316, n. 2–3, p. 273–275, 5 dez. 1996.

MASKREY, M.; MEGIRIAN, D.; FARKAS, G. A. Effect of changing body temperature on the ventilatory and metabolic responses of lean and obese Zucker rats. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 2 Pt 2, p. R531-R540, ago. 1998.

MASKREY, M.; WIGGINS, P. R.; FRAPPELL, P. B. Behavioral thermoregulation in obese and lean Zucker rats in a thermal gradient. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 281, n. 5, p. R1675-R1680, nov. 2001.

MCELROY, J. F.; WADE, G. N. Short photoperiod stimulates brown adipose tissue growth and thermogenesis but not norepinephrine turnover in Syrian hamsters. **Physiology & behavior**, v. 37, n. 2, p. 307–311, jan. 1986.

MENDES, C. et al. Adaptations of the aging animal to exercise: Role of daily supplementation with melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 55, p. 229–239, 2013.

MOHELL, N. Alpha 1-adrenergic receptors in brown adipose tissue. Thermogenic significance and mode of action. **Acta physiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 530, p. 1–62, jan. 1984.

MONTANARI, T.; POŠĆIĆ, N.; COLITTI, M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 18, n. 5, p. 495–513, maio 2017.

MONTEIRO, P. et al. artigo original A Glândula Pineal e o Metabolismo de Carboidratos. 2000.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1–3, p. 18–25, 20 dez. 2000.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology**

Endocrinology Metabolism, v. 293, p. 444–452, 2007.

NG, M. et al. Global , regional , and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 – 2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. v. 384, 2014.

OBREGON, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 18, n. 2, p. 185–195, fev. 2008.

PADMAVATHAMMA, K.; JOSHI, B. N. Thermotrophic effect of melatonin in adrenalectomized and thyroidectomized rats. **Biological signals**, v. 3, n. 1, p. 53–58, jan. 1994.

PAN, D. et al. MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity. **Nature communications**, v. 5, p. 4725, 22 ago. 2014.

PANG, S. F. et al. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging. **Journal of pineal research**, v. 8, n. 2, p. 179–192, jan. 1990.

PUIG-DOMINGO, M. et al. Melatonin specifically stimulates type-II thyroxine 5'-deiodination in brown adipose tissue of Syrian hamsters. **The Journal of endocrinology**, v. 122, n. 2, p. 553–556, ago. 1989.

RAGHAVENDRA, V.; AGREWALA, J. N.; KULKARNI, S. K. Role of centrally administered melatonin and inhibitors of COX and NOS in LPS-induced hyperthermia and adipsia. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 60, n. 4, p. 249–253, abr. 1999.

RASMUSSEN, D. D. et al. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 1009–12, fev. 1999.

REITER, R. J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions*. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 2, p. 151–180, maio 1991.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**,. **Retinohypothalamic tract stimulation activates thermogenesis in brown adipose tissue in the rat,** v. 49, n. 8, p. 654–664, 15 ago. 1993

RICHARD, D.; PICARD, F. Brown fat biology and thermogenesis. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 1233–1260, jan. 2011.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 92, n. 6, p. 2667–2679, 1 jun. 2002.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, n. 5726, p. 31–5, 6 set. 1979.

SAITO, M. et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1526–1531, jul. 2009.

SANCHEZ-DELGADO, G.; MARTINEZ-TELLEZ, B.; OLZA, J. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. p. 21–32, 2015.

SCHULZ, T. J. et al. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 379–383, 13 mar. 2013.

SEALE, P. et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 961–967, 21 ago. 2008.

SEALE, P. Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2369–2375, jul. 2015.

SEALE, P.; KAJIMURA, S.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 788–797, 1 abr. 2009.

SELL, H.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 11, p. 2098–2104, nov. 2004.

SINNAMON, W. B.; PIVORUN, E. B. Melatonin induces hypertrophy of brown adipose tissue in Spermophilus tridecemlineatus. **Cryobiology**, v. 18, n. 6, p. 603–607, dez. 1981.

SMIT-VIS, J. H. The effect of pinealectomy and of testosterone administration on the occurrence of hibernation in adult male golden hamsters. **Acta morphologica Neerlando-Scandinavica**, v. 10, n. 3, p. 269–282, nov. 1972.

SPEAKMAN, J. R.; KEIJER, J. Not so hot: Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans. **Molecular metabolism**, v. 2, n. 1, p. 5–9, 8 nov. 2012.

SPEH, J. C.; MOORE, R. Y. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. **Brain research. Developmental brain research**, v. 76, n. 2, p. 171–181, 17 dez. 1993.

TAN, D.-X. et al. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 12, n. 3, p. 167–188, mar. 2011.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 2009.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1518–1525, 9 abr. 2009.

VISWANATHAN, M.; HISSA, R.; GEORGE, J. C. Effects of short photoperiod and melatonin treatment on thermogenesis in the Syrian hamster. **Journal of pineal research**, v. 3, n. 4, p. 311–321, jan. 1986.

VISWANATHAN, M.; LAITINEN, J. T.; SAAVEDRA, J. M. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 16, p. 6200–6203, ago. 1990.

VOGEL, B. et al. Touch-free measurement of body temperature using close-up thermography of the ocular surface. **MethodsX**, v. 3, p. 407–416, 2016.

WANG, Q. et al. Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123795, 2015.

WEAVER, D. R. et al. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 76, n. 2, p. 295–301, fev. 1993.

WOLDEN-HANSON, T. 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**, v. 141, n. 2, p. 487–497, fev. 2000.

WRANN, C. D. et al. Pathway. v. 18, n. 5, p. 617–632, 2014.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366–376, 20 jul. 2012.

WU, Y.-H. et al. Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. **The Journal of comparative neurology**, v. 499, n. 6, p. 897–910, 20 dez. 2006.

YONESHIRO, T. et al. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 19, n. 9, p. 1755–1760, 2011.

YOUNG, A. A.; DAWSON, N. J. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 392–398, mar. 1982.

ZANUTO, R. et al. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. **Journal of Pineal Research**, v. 55, p. 156–165, 2013.

ZHAO, Z.; WANG, D. Short photoperiod enhances thermogenic capacity in Brandt's voles. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 2, p. 143–149, 2 jun. 2005.

ANEXOS

A - Correlação entre termoneutralidade e peso corporal

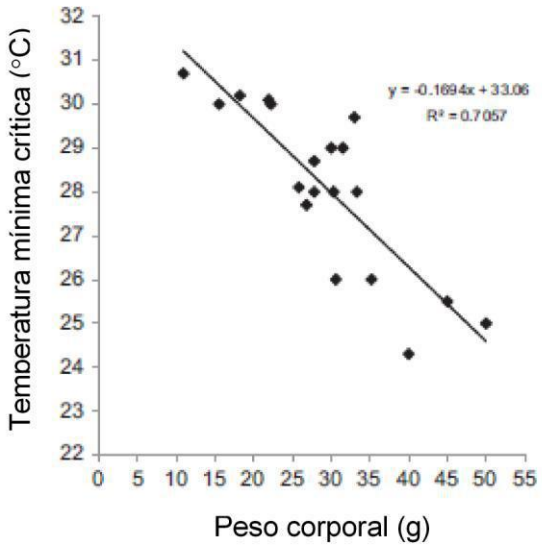

Figura 22 - Temperatura minima crítica de camundongos plotada contra o peso corporal. Modificada de Speakman 2012.

B - Massa corporal de animais jovens e idosos

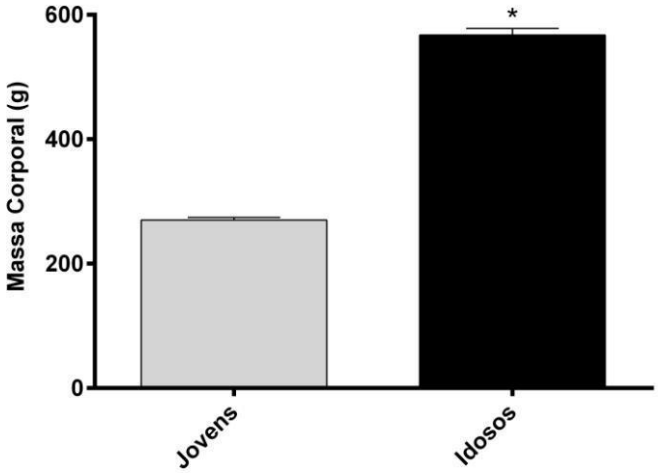

Figura 23 - Massa corporal de animais jovens (n=14) e idosos (n=24) antes do período experimental. Significância * vs Jovens; ($p < 0,05$). Os valores são mostrados como média ± erro padrão.