BRUNO HALPERN

**O papel da melatonina na regulação do tecido
adiposo marrom**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Corrêa Mancini

**SÃO PAULO
2018**

“A noite é mais pura do que o dia, é melhor para pensar, amar e sonhar. À noite tudo é mais intenso, mais verdadeiro. O eco das palavras que foram ditas durante o dia assume um significado novo e mais profundo. A tragédia do homem é não saber distinguir o dia da noite.”

Elie Wiesel

Dedico esta tese a você, pai, que muito mais do que pai, foi meu professor (de vida e medicina), incentivador, amigo e colega de trabalho.

A ideia original deste projeto nasceu com você e sua insuperável postura de fugir do lugar-comum e de abrir novos horizontes.

Infelizmente, pelas curvas tortuosas da vida e do destino, você não pôde estar aqui hoje, tendo nos deixado quando tanto ainda tinha a nos ensinar, a mim e a todos seus alunos, pacientes e admiradores. E essa sua falta é infinita.

Não há dúvidas, porém, que você me acompanha em todas as etapas desta Tese, com uma presença constante. Em memórias, em inspiração, em força para seguir, em tudo.

Aprendi, após tua partida, que apenas o amor é capaz de fazer com que uma falta infinita e uma presença constante possam conviver sem nenhum paradoxo.

“A vida significa tudo o que ela sempre significou, o fio não foi cortado.

Porque eu estaria fora de seus pensamentos, agora que estou apenas fora de suas vistas?”

Agostinho de Hippe

Dedico também esta tese à minha esposa, Cecilia, pelo amor e companheirismo em todos os momentos. Juntos, construímos e subimos vários degraus, feitos de sorrisos e lágrimas, mas sempre com força e unidos. Se cresci muito, pessoalmente e profissionalmente nesses últimos 5 anos, isso se deve muito a ela.

Agradeço a meu filho, Alfredo, por me mostrar como uma fagulha de felicidade pode se alastrar e iluminar a nossa vida.

Agradeço minha mãe, fonte de inspiração, que através do amor, me proporcionou equilíbrio, estabilidade para que pudesse galgar todas as etapas da vida da infância até o dia de hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marcio Corrêa Mancini, pela enorme ajuda desde o início até o fim para que esse projeto saísse do papel, sempre com paciência, disponibilidade e novas ideias.

Ao Grupo de Obesidade e Síndrome Metabólica, na figura dos chefes, alunos e colaboradores, que me acolheram ao longo desses anos, e em especial à Dra. Maria Edna de Melo, pela ajuda final com a parte estatística.

À equipe do Instituto de Ciências Biomédicas: Dra. Fernanda Amaral, Dra. Caroline Mendes, Julieta Scialfa, e demais alunos que de alguma forma me ajudaram na condução desse projeto.

À equipe da Medicina Nuclear: Prof. Dr. Carlos Buchpiguel, Dr. Marcelo Tatit Sapienza, Dr. Marcos Lima, Dra. Camila Longo Machado, Dra. Silvana Prando, Dra. Camila de Godoi Carneiro e a todos os técnicos, enfermeiras e secretárias do serviço.

Às Dras. Clarissa Bueno e Isabella Barcelos, que me forneceram os pacientes para estudo no Instituto da Criança, assim como ajudaram na coleta dos dados.

Aos Drs. Guilherme Gomes e Alexandre Aldred, pela realização das termografias e análises estatísticas.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que são minha casa há quase 18 anos, e mesmo que deixe de frequentá-las em algum momento da minha vida, continuarão a ser.

Ao Laboratório Aché, pela cessão, sem contrapartidas, dos comprimidos de melatonina

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. José Cipolla Neto, pela enorme ajuda no planejamento, desenvolvimento e na discussão desse projeto, sempre com enorme paciência, bom-humor e inteligência, me ensinando quase tudo que sei sobre a melatonina e o ritmo circadiano.

Agradeço ao Professor também pelo apoio financeiro ao projeto, visto que esta tese está Vinculada ao Temático 09/52920-0, “O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais, periféricas e a regulação circadiana da função metabólica” coordenado pelo Prof. Cipolla, e todos os aportes financeiros (com apoio FAPESP) vieram deste Temático.

Desta forma, embora extraoficial, considero o Dr. Cipolla meu coorientador nesse projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
2.1	Em Animais	9
2.2	Em Humanos	9
2.2.1	Objetivos primários	9
2.2.2	Objetivo secundário	10
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1	Tecido Adiposo Marrom	13
3.1.1	Conceito.....	13
3.1.2	PET-FDG e o tecido adiposo marrom em humanos: os primeiros estudos.....	18
3.1.3	O tecido adiposo marrom pode ser metabolicamente importante em humanos?	21
3.1.4	Qual a prevalência real de tecido adiposo marrom?.....	24
3.1.5	De onde vem o tecido adiposo marrom? A diferença entre o adipócito marrom e o bege.....	27
3.1.6	É possível estimular farmacologicamente o tecido adiposo marrom?	28
3.2	Melatonina e a Regulação do Metabolismo Energético	29
3.2.1	Fisiologia resumida da glândula pineal e da produção de melatonina	29
3.2.2	Ações da melatonina e seus receptores.....	33
3.2.3	A melatonina e a regulação metabólica: estudos em animais.....	36
3.2.4	Melatonina e a regulação metabólica em humanos	40
3.2.5	Uso clínico da melatonina.....	44
3.2.6	Estudos em humanos pinealectomizados	45
3.3	A Relação Entre a Melatonina e o Tecido Adiposo Marrom.....	48
3.4	Métodos de Detecção de Tecido Adiposo Marrom	56
3.4.1	PET-FDG (tomografia por emissão de prótons marcados com fluorodeoxiglicose realizado em conjunto com tomografia computadorizada [PET-TC] e PET-RM).....	56
3.4.2	Ressonância magnética	58
3.4.3	Termografia infravermelha.....	59
3.4.4	Marcadores séricos de tecido adiposo marrom: o papel do micro RNA mir92a	60

4	MÉTODOS.....	63
4.1	Estudo em Animais de Experimentação.....	65
4.1.1	Divisão dos grupos	65
4.1.2	Pinealectomia.....	66
4.1.3	Reposição de melatonina.....	66
4.1.4	PET-TC em temperatura ambiente e após exposição ao frio	67
4.1.5	Análise de expressão de RNA de UCP-1.....	68
4.1.6	Análise estatística	70
4.2	Estudo em Humanos	71
4.2.1	Recrutamento.....	71
4.2.2	Descrição dos pacientes	72
4.2.3	Coleta e dosagem de melatonina salivar	75
4.2.4	Coleta de exames de sangue.....	75
4.2.5	PET-RM.....	76
4.2.6	Processamento e análise das imagens.....	79
4.2.7	Termografia infravermelha	80
4.2.8	Reposição de melatonina.....	81
4.2.9	Análise estatística	82
5	RESULTADOS	83
5.1	Estudo em Animais	85
5.2	Estudo em Humanos	92
5.2.1	Níveis de melatonina ao início do experimento e análise de adesão	92
5.2.2	Tecido adiposo marrom por PET-RM	93
5.2.3	Análise de gordura hepática por RM.....	99
5.2.4	Exames laboratoriais	100
5.2.5	Peso corporal	103
5.2.6	Resposta do paciente com disautonomia.....	105
5.2.7	Termografia infravermelha e comparação com PET-RM	107
6	DISCUSSÃO	115
7	CONCLUSÕES	145
8	ANEXOS	149
9	REFERÊNCIAS	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(BMP)-7	- Proteína morfogenética do osso
(FGF)-21	- Fator de crescimento de fibroblasto 21
18F-FDG	- 18F-fluorodeoxiglicose
5'D2	- 5'deiodinase do tipo 2
6SMu	- 6-sulfatoximelatonina urinária
AGLs	- Ácidos graxos livres
ASMT	- Serotonina-acetil-metil-transferase
ATP	- Adenosina trifosfato
C	- Grupo experimental (ratos Wistar) controle, que recebeu água de beber convencional
cAMP	- Monofosfato cíclico de adenosina
cDNA	- DNA complementar
CF	- Grupo controle (C) exposto ao frio
CM	- Grupo experimental controle (ratos Wistar), que recebeu reposição de melatonina na água de beber noturna (avaliado apenas na análise de UCP-1 e que não realizou PET-TC)
CMA	- Central Imaging Array
Col T	- Colesterol total
CQ	- Grupo controle (C) à temperatura ambiente
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DM2	- Diabetes mellitus tipo 2
DP	- Desvio-padrão
FBP	- Método de retroprojeção filtrada
FDG	- 2-fluorodeoxi-D-glicose
FOV	- Campo de visão
GH	- Hormônio do crescimento
Gi	- Proteína Gi inibitória
Glic	- Glicemia de jejum
GLP-1	- Peptídeo glucagon similar tipo 1
GLUT4	- Transportador de glicose tipo 4
Gs	- Proteína G estimulatória
HCFMUSP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	- Lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HDL-c	- Lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol
HIOMT	- Hidroxindol-O-metil-transferase

HK	- <i>House keeping genes</i>
HNU	- <i>Head Neck Unit</i>
ICB-USP	- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IE	- Região interescapular
IMC	- Índice de massa corporal
IP	- Intraperitoneal
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LDL-c	- Lipoproteína de baixa densidade ligada ao colesterol
LED	- Diodos de emissão de luz
miR	- Micro ácido ribonucleico
MRAC	- Técnica DIXON de correção de atenuação de Ressonância Magnética (colocar no texto também)
MT1	- Receptor de melatonina do tipo 1 ou 1a
MT2	- Receptor de melatonina do tipo 2 ou 1b
MT3	- Receptor de melatonina do tipo 3
myf5	- Fator miogênico 5
NASH	- Doença hepática gordurosa não alcoólica
NAT	- N-acetil-transferase
NPV	- Núcleo paraventricular
NSQ	- Núcleo supraquiasmático
OTC	- Medicação vendida no balcão, sem necessidade de receita (<i>over-the-counter</i>)
P	- Grupo experimental (ratos Wistar) submetido à pinealectomia que recebeu água de beber convencional
PCR	- Reação de cadeia de polimerase de transcriptase reversa
PET-TC	- Tomografia por emissão de prótons marcados com fluorodeoxiglicose realizado em conjunto com tomografia computadorizada
PET-FDG	- Tomografia por emissão de prótons marcados com fluorodeoxiglicose
PET-RM	- Tomografia por emissão de prótons marcados com fluorodeoxiglicose realizado em conjunto com ressonância nuclear magnética
PF	- Grupo pinealectomizado sem reposição (P) exposto ao frio
PINX	- Grupo experimental (ratos Wistar) submetidos à pinealectomia
PKA	- Proteína-quinase A
PM	- Grupo experimental (ratos Wistar) submetido à pinealectomia que recebeu reposição de melatonina na água de beber noturna
PMF	- Grupo pinealectomizado repostado com melatonina (PM) exposto ao frio
PMQ	- Grupo pinealectomizado repostado com melatonina (PM) à temperatura ambiente

Pós-mel	- Pós-melatonina
PQ	- Grupo pinealectomizado (P) à temperatura ambiente
Pré-mel	- Pré-melatonina
QT	- Quimioterapia
RM	- Ressonância magnética
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro
ROI	- Regiões de interesse em exames de tomografia por emissão de prótons
RT	- Radioterapia
SC	- Subcutâneo
SCL	- Supraclavicular
SiPM	- Tecnologia de fotomultiplicador de silício (colocar no texto também)
SNC	- Sistema nervoso central
SNS	- Sistema nervoso simpático
SUV	- Valor padrão de captação dos exames de PET (<i>Standard uptake value</i>)
T3	- Triiodotironina
T4	- Tetraiodotironina
TAB	- Tecido adiposo branco
TAM	- Tecido adiposo marrom
TCAP	- Transtorno da compulsão alimentar periódica
TG	- Triglicérides
TIV	- Termografia infravermelha
TOF	- Técnica <i>time of flight</i>
UAA	- <i>Upper</i> anterior abdominal
UCP-1	- Proteína desacopladora tipo 1
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>very low density lipoprotein</i>)
VLDL-c	- Lipoproteína de muito baixa densidade ligada ao colesterol

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Prevalência de positividade em PET-FDG em temperatura ambiente e após exposição ao frio em diferentes populações e regiões geográficas	24
Quadro 2 - Compilação de estudos que avaliaram a suplementação de melatonina na massa e atividade de TAM de animais (principalmente hibernantes).....	50
Quadro 3 - Temperatura média do ambiente na manhã do exame-fonte.....	98
Quadro 4 - Exames laboratoriais dos pacientes antes e após a intervenção com melatonina	101
Quadro 5 - Variação de peso corporal nos quatro pacientes da análise principal	104
Quadro 6 - Volume total e atividade total de TAM do paciente excluído da amostra principal antes e após reposição com melatonina	105
Quadro 7 - Análise dos lípidos do paciente excluído da amostra principal antes e após reposição com melatonina.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e desvio-padrão de todos os seis modelos experimentais	88
Tabela 2 - Dados de TAM (volume total e atividade total medida pelo volume x SUV médio e a razão de incremento após suplementação com melatonina) por PET-RM dos 4 pacientes da análise principal, considerando um limiar de SUV de 2,0	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática da mitocôndria do TAM.....	14
Figura 2 - Diferenças, à microscopia, do tecido adiposo branco, composto de células uniloculares, com vacúolos únicos e núcleo rechaçado e o tecido adiposo marrom.....	16
Figura 3 - O tecido adiposo marrom.....	16
Figura 4 - Melatonina age em vários pontos da via energética.....	39
Figura 5 - Mecanismos pelo qual a melatonina ativa o tecido adiposo marrom.....	52
Figura 6 - Imagens de PET-RM do paciente 1 antes e após a suplementação de melatonina	97
Figura 7 - Análise visual do paciente 1 à termografia após mergulho de mãos em água gelada antes (E) e após (D) suplementação com melatonina 3 mg.....	114

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - SUV Máximo ($\times 10^4$) de animais que realizaram os experimentos em ambas as condições, em todos os grupos.....	86
Gráfico 2 - SUV Máximo ($\times 10^4$) à temperatura ambiente	87
Gráfico 3 - SUV Máximo ($\times 10^4$) após exposição ao frio	87
Gráfico 4 - Razão de incremento do SUV Máximo do exame após exposição ao frio/Exame à temperatura ambiente	88
Gráfico 5 - Expressão de UCP-1 (RNA) em região interescapular (IE).....	91
Gráfico 6 - Volume de TAM pré e pós-melatonina (SUV >2,0), em mL	94
Gráfico 7 - Trajetória individual do volume de TAM dos pacientes antes e após melatonina	95
Gráfico 8 - Atividade total de TAM pré e pós-melatonina (SUV máximo>2,0) (volume x SUV Médio).....	95
Gráfico 9 - Trajetória individual da atividade de TAM dos pacientes antes e após melatonina	96
Gráfico 10 - Volume de TAM analisando a temperatura no dia do exame (SUV máximo>2,0), em mL	98
Gráfico 11 - Fração de gordura hepática (em %) medida por RM (método FAT Frac).....	99
Gráfico 12 - Valores de colesterol total antes e após reposição de melatonina	102
Gráfico 13 - Valores de triglicérides em jejum antes e após suplementação com melatonina.....	102
Gráfico 14 - Delta Temperatura (graus Celsius) entre região supraclavicular (direita ou esquerda) e região intercostal média, por termografia infravermelha, antes e após desafio ao frio.....	108
Gráfico 15 - Atividade de TAM em Watts antes e após desafio ao frio em todos os grupos	109

Gráfico 16 - Diferença entre temperatura supraclavicular (Esquerda ou Direita) e a região intercostal média antes e após a suplementação de melatonina.....	110
Gráfico 17 - Atividade de TAM (W) por TIV após mergulho das mãos em água gelada antes e após suplementação com melatonina.....	111
Gráfico 18 - Atividade de TAM (W) por TIV em temperatura ambiente pré e após suplementação com melatonina.....	111
Gráfico 19 - Correlação (teste de Pearson) entre a razão de aumento de atividade de TAM pós/pré melatonina, comparando o PET-RM com a TIV.....	113
Gráfico 20 - Correlação (teste de Pearson) entre a razão de aumento de atividade de TAM pós/pré melatonina medida por W e o IMC dos pacientes.....	114

RESUMO

Halpern B. *O papel da melatonina na regulação do tecido adiposo marrom* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O tecido adiposo marrom (TAM), caracterizado pela presença da proteína termogênica UCP-1, é conhecido há muitas décadas como um tecido termogênico em mamíferos, porém sua significância clínica em humanos era considerada pequena, com exceção de neonatos, até que o desenvolvimento e uso de métodos de PET-FDG terem demonstrado que humanos adultos também possuem TAM ativo, especialmente após exposição ao frio. Essa descoberta levou a um enorme aumento nas pesquisas sobre o assunto, já que sua ativação, levando a um aumento do gasto energético, poderia, pelo menos na teoria, ser uma possível arma no tratamento da obesidade e diabetes tipo 2 e sua redução ou ausência ser uma causa de ganho de peso. Muitos compostos vêm sendo estudados como possíveis recrutadores e ativadores desse tecido. A melatonina é um deles, embora nenhum estudo tenha sido feito em humanos. A melatonina, um hormônio pineal sintetizado à noite com um papel crítico na sincronização do ritmo circadiano, é estudado há várias décadas como um regulador chave do metabolismo energético em diversas espécies animais. Ratos pinealectomizados ganham peso e tem distúrbios metabólicos durante sua vida, e a suplementação noturna de melatonina, reverte estas alterações, sem redução da ingesta alimentar. Devido a isso, uma hipótese é que o papel central da melatonina no metabolismo energético inclui sua função no gasto energético, possivelmente relacionado à ativação do TAM. Muitos modelos experimentais, a maioria em animais hibernantes, demonstraram o papel da melatonina no recrutamento do TAM. Nesse estudo, o objetivo é determinar se a suplementação de melatonina para indivíduos e animais de experimentação (ratos Wistar) deficientes de melatonina aumenta sua ativação. Foi encontrado que, em ratos Wistar, animais pinealectomizados possuem uma capacidade termogênica do TAM reduzida após exposição ao frio comparado com a temperatura ambiente, e a suplementação de melatonina normaliza essa capacidade termogênica. Esse dado sugere um papel da melatonina na resposta máxima de ativação do TAM após um desafio ao frio agudo. Também foi observado um aumento de expressão de UCP-1 (RNA) em animais repostos com melatonina, tanto em controles como em pinealectomizados, e animais pinealectomizados não repostos apresentam uma expressão de UCP-1 menor que um grupo controle. Em humanos, a suplementação de melatonina aumenta o volume e atividade do TAM em quatro indivíduos pinealectomizados (por tumores pineais) com baixo nível de melatonina no basal, analisado por tomografia de emissão de prótons acoplada a ressonância magnética (PET-RM).

Embora a análise do TAM em ambos os protocolos tenha sido distinta, seus resultados apontam para a mesma regulação positiva do TAM pela melatonina. A termografia infravermelha (TIV) foi também realizada em humanos, com aumento de atividade de TAM após exposição ao frio, porém a correlação entre as respostas com a TIV e o PET-RM foi moderada e não significativa. Diferenças entre o protocolo frio e limitação da TIV em indivíduos mais obesos podem ter contribuído para esses resultados. Uma relação positiva da suplementação de melatonina nos lípides (principalmente colesterol e triglicérides) também foi encontrada, porém sem impacto na gordura hepática.

Descritores: tecido adiposo marrom; melatonina; obesidade; diabetes mellitus tipo 2; ritmo circadiano; glândula pineal; neuroendocrinologia; hipercolesterolemia; hipertrigliceridemia.

ABSTRACT

Halpern B. *The role of melatonin in the regulation of brown adipose tissue* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Brown adipose tissue (BAT), characterized by the presence of the thermogenic protein UCP-1 have long been known as a thermogenic tissue in mammals, however its significance in humans was considered minor, with the exception of newborns, until FDG-PET exams demonstrated that human adults still have active BAT, especially after cold exposure. This prompted to an incredible increase in research on the field, since its activation, leading to increased energy expenditure could, at least theoretically, be a possible tool for the treatment of obesity and type 2 diabetes and its reduction or absence be a cause of weight gain. Many compounds aiming to recruit and activate BAT have been studied. Melatonin has been one of them, although no study has been performed in humans. Melatonin, a pineal hormone synthesized at night with a critical role in the synchronization of circadian rhythms, has long been studied as a key regulator of energy metabolism in many animal species. Pinealectomized rats gain weight and have metabolic disturbances during life, and the circadian supplementation of melatonin, at night, reverts these alterations, without decrease in energy intake. Due to that, it is hypothesized that a main role of melatonin in energy metabolism includes its action on energy expenditure, possibly related to activation of BAT. Many experimental models, mainly in hibernating animals, have shown a role of melatonin on BAT recruitment. In the present study, we ought to determine if the supplementation of melatonin for melatonin deficient subjects and experimental animals (Wistar rats) increases BAT activation. We found, in Wistar rats, that pinealectomized animals have a reduced BAT thermogenic capacity after acute cold exposure compared with ambient temperature, and melatonin supplementation in this animals leads to normalization of BAT thermogenic capacity. This data suggests a role of melatonin in improving the maximal response of BAT after an acute challenge. We also found that melatonin supplementation increases UCP-1 RNA expression both in control and pinealectomized rats, and pinealectomized rats without supplementation have a reduced UCP-1 expression compared with controls. In humans, we found that melatonin supplementation increased BAT volume and activity in four pinealectomized (due to pineal tumors) individuals with low melatonin at baseline, analyzed by Positron Emission Tomography associated with magnetic resonance (PET-MR). Although the analysis of BAT in both studies was different, their results point to the same positive regulation of BAT by melatonin. We also performed infrared thermography (IRT) in humans, but the results were not conclusive since although we also found an increase in BAT

activity measured in Watts, the correlation between the methods was moderate. The difference may be due to different protocols of cold exposure between methods, probably inadequate in IRT, as well as maybe to a limitation of IRT in more obese individuals. We also found that melatonin supplementation in melatonin deficient humans may have a positive impact on blood lipid concentrations, (mainly total cholesterol and triglycerides) but, at least for the time studied, does not appear to have an impact on liver fat.

Descriptors: adipose tissue, brown; melatonin; obesity; type 2 diabetes; circadian rhythm; pineal gland; neuroendocrinology; hypercholesterolemia; hypertriglyceridemia.

1 INTRODUÇÃO

O tecido adiposo marrom (TAM), presente unicamente em mamíferos, tem como maior função dissipar calor a partir do desacoplamento mitocondrial, com função primária de termorregulação¹. Embora fundamental para a sobrevivência de espécies mamíferas que vivem em ambientes gelados, ou mesmo para animais de pequena área ou volume corporal, até pouco tempo a sua presença em humanos, com exceção do período neonatal (onde a razão área/volume é alta e o recém-nascido tem uma capacidade limitada de se defender do frio), era desconhecida^{2,3}. Com o advento de novos testes diagnósticos, como a tomografia de emissão de prótons marcado com fluorodeoxiglicose (PET-FDG), capaz de detectar tecidos metabolicamente ativos através de isótopos de glicose radioativos, descobriu-se que ao menos uma fração dos humanos possuem TAM metabolicamente ativo e que a exposição ao frio aumenta consideravelmente essa atividade na maioria dos indivíduos^{4,5}. Considerando sua função termogênica, uma quantidade maior de TAM seria um fator protetor de ganho de peso e hiperglicemia, visto que o TAM ativo utiliza glicose e ácidos graxos livres (AGLs) como substrato para a produção de calor, e uma redução de sua quantidade, por diversas razões, um fator que potencializaria o ganho de peso^{1,3,6-8}. Considerando o aumento exponencial das taxas de obesidade na maioria dos países nas últimas

décadas⁹, e que causas não óbvias ou não clássicas de ganho de peso na população existem e já foram descritas^{10,11}, outra hipótese sugerida é que a redução da presença e atividade de TAM possa ter contribuído, de alguma forma, para essa epidemia^{1,4,6}. Mais ainda, descobrir substâncias capazes de aumentar e ativar o TAM pode ser, no futuro, uma estratégia eficaz para evitar o ganho de peso em situações de risco, ou mesmo como um tratamento efetivo para a obesidade¹²⁻¹⁴.

Paralelamente a isto, nas últimas décadas, a urbanização e a tecnologia aumentaram a exposição à luz noturna, sabidamente associada a uma perturbação circadiana e à redução da produção de melatonina pela glândula pineal¹⁵⁻¹⁸. A melatonina é um hormônio produzido à noite, com múltiplas funções, como a sincronização circadiana, isto é, possibilitar ao organismo ajustar seus relógios biológicos internos ao dia e à noite^{17,19-21}. A exposição à luz no período noturno, como dito, inibe a produção desse hormônio, com múltiplas consequências ainda não totalmente elucidadas^{15,17,22-23}. Estudos em animais sugerem um papel fundamental da melatonina na regulação metabólica, em órgãos como pâncreas, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo^{19,24-29}. A melatonina aumenta a massa de TAM em animais hibernantes e não hibernantes³⁰⁻⁴⁰, e a sua ausência (como, por exemplo, em procedimentos de pinealectomia) leva a aumento do peso corporal sem aumentar a ingestão calórica^{19,30,41}. Dessa forma, uma hipótese formulada seria que a redução da melatonina circulante em um mundo moderno cada vez mais dependente de tecnologia e iluminação poderia ser uma causa associada a um aumento corporal, por redução do TAM.

Nesse sentido, o presente estudo se vale dessas hipóteses para gerar uma prova de conceito. O objetivo é avaliar se em animais e indivíduos pinealectomizados, cuja produção de melatonina é nula ou desprezível, há aumento da atividade de TAM após exposição ao frio.

No entanto, é importante ressaltar que, embora essa população sirva como prova de conceito, ela é, por si só, muito pouco estudada e a despeito de possuírem uma deficiência hormonal (ausência de melatonina circulante), muito poucos estudos avaliaram a reposição da melatonina nessa população. Nesse sentido, o estudo também tem como objetivo avaliar aspectos metabólicos da reposição de melatonina nessa população, visando com que, em um futuro não tão distante, estudos maiores possam levar a uma recomendação formal de melatonina para esses indivíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 Em Animais

- Avaliar o papel da melatonina na ativação do TAM em temperatura ambiente e após exposição ao frio em ratos Wistar, comparando grupos pinealectomizados, pinealectomizados repostos com melatonina na água noturna e controles.

- Avaliar o papel da melatonina no recrutamento do TAM avaliado pela expressão de RNA da proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) em TAM interescapular após sacrifício dos animais, comparando os mesmos grupos citados acima mais um grupo de animais controle com suplementação de melatonina na água noturna.

2.2 Em Humanos

2.2.1 Objetivos primários

- Avaliar se a reposição de melatonina na dose de 3 mg noturna por 3 meses aumenta o volume e atividade do TAM em indivíduos pinealectomizados devido a tumores pineais, avaliado por tomografia por emissão de prótons marcados com fluorodeoxiglicose realizado em conjunto com ressonância nuclear magnética (PET-RM).

- Avaliar se a reposição de melatonina na dose de 3 mg noturna por 3 meses aumenta a temperatura supraclavicular (SCL) e a atividade de TAM medido por Watts, avaliado por Termografia Infravermelha (TIV) e comparar a TIV com o PET-RM.

2.2.2 Objetivo secundário

- Avaliar o metabolismo dos lípidos, glicemia e gordura hepática (esta última avaliada por ressonância magnética [RM]) dos indivíduos pinealectomizados antes e após a suplementação de melatonina na dose de 3 mg noturna por 3 meses.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão, será discutida de forma mais aprofundada sobre o TAM e o avanço do seu conhecimento nos últimos anos, seguido por uma discussão sobre a fisiologia da melatonina, seu papel na regulação energética e seu uso clínico até o presente. Em seguida, serão discutidos os estudos que correlacionam melatonina e TAM. Será feita também uma discussão sobre os poucos artigos de literatura que avaliam pacientes pinealectomizados. Posteriormente, serão abordados os métodos de detecção de TAM disponíveis, e que permitem sua avaliação nesta tese.

3.1 Tecido Adiposo Marrom

3.1.1 Conceito

A primeira descrição do TAM data de 1551 quando Gessner, em um livro de anatomia de mamíferos, descreveu um tecido como *nec pinguitudo nec caro*, isto é, “nem gordura nem carne”¹. Apesar dessa descrição de quase cinco séculos, o seu reconhecimento como um órgão específico dos mamíferos e com função de termogênese tem menos de meio século².

O TAM é um tecido de alta demanda metabólica existente unicamente em mamíferos². Acredita-se que sua função principal seja de termorregulação, contribuindo dessa forma, para a manutenção da temperatura interna do

organismo em situações em que a temperatura ambiente é menor^{1,2,4}. Dessa forma, não é difícil compreender que animais de regiões frias, e animais hibernantes necessitam ter um TAM competente, assim como animais pequenos, cuja razão área/volume seja maior, por possuir maior área de superfície corporal de dissipação de calor em relação ao seu volume interno^{2,42}.

A capacidade termogênica do TAM deve-se à presença de uma proteína desacopladora, a UCP-1 (do inglês *uncoupling protein-1*), localizada na membrana mitocondrial interna. A UCP-1 permite que prótons passem pelo gradiente eletroquímico, impedindo a formação de adenosina trifosfato (ATP) por evitar a sua exposição com a ATP-sintase, o que ocasiona um desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial e consequente dissipação de energia na forma de calor^{2,43-45}. Na Figura 1, pode-se ver de maneira esquemática a presença da UCP1 na membrana da mitocôndria do TAM, desviando a fosforilação oxidativa da produção de ATP para a geração de calor.

Figura 1 - Ilustração esquemática da mitocôndria do TAM - Sob estímulo noradrenérgico, ácidos graxos livres são oxidados na mitocôndria, porém a presença da enzima UCP-1 leva ao desacoplamento mitocondrial, transformando a energia em calor

Os principais substratos de oxidação são AGLs e glicose, presentes na circulação e que são desviados para o TAM em situações de maior atividade². Essa ativação do TAM dá-se via noradrenalina pelo sistema nervoso simpático (SNS), agindo principalmente em receptores beta-3, embora outros receptores também tenham capacidade de ativá-lo^{2,46}. O maior ativador desse sistema noradrenérgico, como pode-se presumir, é o frio; todavia, há tempo já se supõe que alimentos também podem levar à sua ativação⁴⁷⁻⁵⁰. Nesse contexto, o TAM poderia possuir um efeito metabólico, dissipando em calor o excesso de AGLs e glicose circulantes, mantendo assim o equilíbrio energético, o que já está demonstrado em ratos alimentados com dieta hipercalórica^{48,51}. Dessa forma, ele poderia ser um mecanismo protetor quanto ao ganho de peso excessivo de organismos em situação de excesso energético, na qual o acúmulo de gordura seria contraproducente por questões mecânicas e reprodutivas^{2,51,52}.

Ao se observar o TAM à microscopia, encontra-se células com múltiplos vacúolos de gordura e múltiplas mitocôndrias com expressão positiva para UCP-1 com o núcleo centralizado. Ele se diferencia do tecido adiposo branco (TAB), armazenador de energia, que conta com um único e grande vacúolo de gordura, com núcleo rechaçado para a periferia da célula e poucas mitocôndrias que não expressam essa proteína^{2,53,54}. Desta maneira, fica clara a diferença de funções de ambos os tecidos no metabolismo energético (Figuras 2 e 3).

Fonte: Adaptado de Tam *et al.*³

TAM: Tecido adiposo marrom; TAB: Tecido adiposo branco

Figura 2 - Diferenças, à microscopia, do tecido adiposo branco, composto de células uniloculares, com vacúolos únicos e núcleo rechaçado e o tecido adiposo marrom

Fonte: Cannon e Nedergaard²

Figura 3 - O tecido adiposo marrom. Observa-se uma célula multilocular (múltiplos vacúolos de gordura e alta concentração de mitocôndrias), que expressam a proteína desacopladora-1 (UCP-1)

Embora a massa total de TAM no organismo seja geralmente pequena, estudos (alguns deles realizados há mais de meio século) demonstraram que essa ativação pode quaduplicar o gasto energético dos animais, principalmente por um aumento de perfusão tecidual do órgão que passa então não apenas a oxidar os ácidos graxos presentes nos vacúolos do tecido adiposo, mas também começam a captar AGLs e glicose da circulação, aumentando exponencialmente o seu potencial de gerar termogênese⁵⁵⁻⁵⁸. Esse mecanismo é reconhecidamente importante para animais hibernantes, que possuem uma necessidade rápida de aumentar a temperatura corpórea após os microdespertares que ocorrem durante o período de hibernação². Deve-se lembrar que, durante a hibernação, o metabolismo do animal está extremamente lentificado, com hipotermia, e deve atingir a termorregulação o mais rápido possível após os microdespertares ou após o fim do ciclo hibernante³⁰. Apenas um tecido com alta capacidade de gerar termogênese em tempo curto seria capaz de conseguir essa situação².

Em humanos, no entanto, por muitos anos questionou-se se adultos possuíam ou não TAM^{1,2}. Em recém-nascidos, sua presença é conhecida há bastante tempo, como um mecanismo fundamental para termorregulação no ambiente extrauterino, no qual o recém-nascido tem poucas formas de se defender da temperatura externa mais baixa⁵⁹. Acreditava-se que na transição de neonato para lactente o TAM sofreria atrofia⁵⁹.

Nos últimos anos, contudo, principalmente devido à ativação de “*hotspots*” (áreas metabolicamente ativas) em exames de PET-FDG em condições que induzem necessidade de geração de calor, a presença do TAM em adultos foi comprovada^{4,5,60-62}.

3.1.2 PET-FDG e o tecido adiposo marrom em humanos: os primeiros estudos

A tomografia computadorizada de emissão de pósitrons marcada com 18-fluorodesoxiglicose (PET-FDG) é um exame funcional que caracteriza-se pela capacidade de detectar áreas metabolicamente ativas, isto é, áreas que captam a glicose marcada com o radioisótopo e que desse modo podem ser detectadas no exame de imagem^{44,55,63-65}. Seu uso passou a se popularizar na década de 1990, com o intuito de visualizar tumores e metástases, que caracterizam-se por possuir uma alta taxa metabólica⁶⁵. O exame também mostra, de maneira consistente, uma grande captação em cérebro e coração, áreas que sabidamente são grandes utilizadoras de glicose mesmo em jejum (que é obrigatório para uma possível interpretação do mesmo). Porém, observou-se, em alguns indivíduos áreas de captação que foram, a princípio de difícil interpretação⁶⁰. Tratavam-se de áreas simétricas e bilaterais, de captação em região supraclavicular, cervical e para-esternal, que pelas características não se comportavam como tumores^{1,66,67}. Comparando imagens do PET com tomografias simples, percebeu-se que as áreas de captação correspondiam a áreas de atenuação semelhante ao tecido adiposo⁶⁰. A detecção destas imagens em PET-FDGs em indivíduos com feocromocitoma, uma condição sabidamente de intensa atividade noradrenérgica pela produção de catecolaminas pelo tumor, aumentou a suspeita de que as imagens visualizadas fossem o próprio TAM, que teria proliferado sob estímulo noradrenérgico crônico^{66,68}.

Em 2007, um grupo sueco pela primeira vez publicou um artigo em uma revista de fisiologia metabólica, documentando com evidências claras,

de um ponto de vista funcional, de que tais áreas correspondiam a TAM⁶⁰, mas foi em 2009 com a publicação de três artigos na mesma edição do *New England Journal of Medicine* que a comunidade científica passou a aceitar que pelo menos uma parcela de adultos humanos possuía TAM^{4,5,58}.

Cypess *et al.*⁴ analisaram um banco de 3640 PET-FDGs realizados para detecção de imagens suspeitas de neoplasias, e verificaram que detectava-se áreas captantes que sugeriam a presença de TAM em 7,5% das mulheres e 3,1% dos homens. Além disso, idade, obesidade, níveis glicêmicos e uso de betabloqueadores eram condições com relação inversa com a captação, isto é quanto maior a idade, o índice de massa corporal (IMC) e a glicemia, ou se o indivíduo fazia uso de betabloqueador, menor a possibilidade de se encontrar um indivíduo com captação. Tecidos obtidos dessa região de alguns pacientes demonstraram a expressão de UCP-1.

No segundo artigo, van Marken Lichtenbelt *et al.*⁵ optaram por realizar PET-FDGs em 24 indivíduos saudáveis após exposição aguda ao frio, isto é 16°C por 2 horas, utilizando roupas leves e evitando tremores. O que os autores observaram foi que após a exposição, 96% dos indivíduos possuíam algum grau de ativação de TAM que, da mesma maneira que no trabalho de Cypess *et al.*⁴, mostrou uma relação inversa entre grau de captação do PET-FDG medido por quilobequeréis (KBq) e IMC ou porcentagem de gordura corporal. O único indivíduo que não mostrou nenhuma captação apresentava obesidade.

O último trabalho original presente na edição da revista, de Virtanen *et al.*⁵⁸ demonstrou que áreas de captação positiva em PET-FDG visualizada

em três indivíduos saudáveis apresentavam expressão positiva de UCP-1 após biópsia, confirmando que a imagem trata-se mesmo de TAM. O grupo finlandês foi além, e através de cálculos matemáticos avaliando o grau de captação de FDG no tecido e determinando que apenas em torno de 10% do que um determinado TAM capta é glicose, sendo AGLs o principal substrato do TAM, sugeriu que o aumento do gasto energético nesses indivíduos poderia corresponder a 7%, ou 4,1 kg de peso em um ano.

Nenhum dos estudos foi desenhado para se mostrar qual a relação causa-efeito entre obesidade e a presença ou ausência de TAM e várias hipóteses poderiam ser formuladas. Uma delas, de que obesos, por possuir maior capa gordurosa, sentiriam menos frio e, portanto, captariam menos. Outra, a de que com o aumento do peso corporal, em consequência da necessidade de locais para depósito de energia, adipócitos marrons seriam convertidos em adipócitos brancos, promovendo uma diminuição do TAM. Porém, os estudos claramente apontaram para uma hipótese interessante, e que mereceria certamente ser investigada, de que a ausência ou diminuição de TAM poderia ser, ao menos em parte, responsável pelo ganho de peso e pela piora glicêmica de um subgrupo de indivíduos¹.

3.1.3 O tecido adiposo marrom pode ser metabolicamente importante em humanos?

Sabe-se que a massa total de TAM em humanos não ultrapassa 60 a 100 gramas, muito pouco comparando com o TAB⁵⁵. Desta forma, uma dúvida é se esta pequena quantidade de TAM seria suficiente para ter importância metabólica. Como comentado anteriormente, estudos em animais demonstraram a grande capacidade de ativação e perfusão deste tecido sob estímulo específico, captando glicose e AGLs da periferia, capacitando o tecido não apenas para ser um puro utilizador de energia como também, eventualmente, para melhorar o metabolismo glicêmico, tanto pela captação de glicose independente de insulina como pela remoção de AGLs circulantes que sabidamente são uma causa de resistência à ação da insulina^{2,55,69,70}.

Há vários estudos que avaliaram a capacidade de aumento do gasto energético, tanto por mensuração como por cálculos matemáticos, e demonstram que, uma vez ativado, o TAM pode aumentar o gasto energético de 5% a 77%^{55,58,70-72}. No entanto, há de se levar em conta que, de acordo com a hipótese do “adipostato”, um aumento no gasto energético deve levar a um aumento na ingestão e, portanto, uma análise sobre o efeito final sobre o peso corpóreo torna-se bem mais complexa⁷³. Porém, mesmo sem evidências contundentes, existe um racional para imaginarmos que há um mecanismo fisiológico convincente que nos ajudaria a explicar o TAM como importante na regulação do peso corpóreo e da glicemia¹.

Mais ainda, um conceito antigo e por muito tempo esquecido, o de termogênese induzida por dieta, pode ter o TAM como ator principal⁴⁸.

Em 1979, em um artigo seminal da revista *Nature*, hoje com mais de mil citações, Rothwell e Stock⁴⁸ demonstraram que ratos alimentados cronicamente com uma “dieta de cafeteria”, isto é, com alto valor energético, rica em gorduras e carboidratos e pobre em proteínas apresentavam, após a alimentação, um aumento do gasto energético desproporcional ao aumento relacionado apenas ao custo energético do alimento, e ganhavam menos peso do que o previsto, sugerindo que parte das calorias extras ingeridas estava sendo dissipada de alguma forma e desperdiçada na forma de calor. A temperatura retal e interescapular desses ratos aumentava consideravelmente no período pós-prandial e, após sacrifício, comprovou-se que esses animais, em relação ao grupo controle que recebia uma dieta normocalórica e balanceada, apresentavam 2,6 vezes mais TAM em peso seco, sugerindo que a ineficiência metabólica experimentada por eles decorria de recrutamento e ativação desse tecido.

Apesar do impacto do estudo, o assunto foi pouco avaliado a partir de então, menos ainda em humanos, mas o próprio Stock, em 1999, fez uma compilação de trabalhos com hiperalimentação em humanos, com o intuito de avaliar as diferenças interindividuais no ganho de peso⁷⁴. De acordo com possíveis diferenças de composição corpórea (porcentagem de massas magra e gorda), calculou-se que o valor energético para o aumento de um quilo deveria se situar entre 30 e 45 kilojoules (kJ). Entretanto a variabilidade era grande, havendo indivíduos que necessitavam de valores próximos de 100 kJ/kg de ganho de peso. De acordo com o autor, não haveria outra explicação para essa variabilidade que não fosse um mecanismo de

ineficiência metabólica e termogênese⁷⁴. Mais recentemente, Wijers *et al.*⁵² demonstraram que havia uma correlação linear individual entre uma necessidade calórica alta para aumento de peso e o aumento de gasto calórico após exposição ao frio, sugerindo que há um mecanismo comum entre essas duas situações, provavelmente a presença de TAM em maior ou menor quantidade.

Um estudo com PET-FDG realizado após alimentação, com todas as dificuldades de interpretação do exame devido à grande captação pós-prandial para o tecido esquelético, também sugere que, em relação a termoneutralidade, o TAM é ativado após uma alimentação hipercalórica e hipoproteica, semelhante ao que ocorre após ativação pelo frio⁷⁵. Além disso, um estudo com indivíduos com magreza constitucional mostrou uma captação de TAM, mesmo em termoneutralidade, até 16 vezes maior que indivíduos controle de peso normal. Em contraste, indivíduos com anorexia nervosa e peso semelhante aos dos indivíduos com magreza constitucional possuíam captação próxima a zero⁷⁶.

Embora ainda não seja um conceito aceito consensualmente pelos estudiosos em metabolismo⁷⁷, o conceito de que o TAM pode gerar energia extra em calor e dificultar o ganho de peso em alguns indivíduos é fascinante e pode nos abrir caminho para investigação de possíveis fármacos que ativem esses mecanismos. Outro debate que se abre é por que alguns indivíduos teriam mais ou menos TAM que seus semelhantes.

3.1.4 Qual a prevalência real de tecido adiposo marrom?

Como já ressaltado anteriormente, o estudo de Cypess *et al.*⁴, de 2009 mostrou, em temperatura ambiente, uma prevalência de TAM de 7,5% nas mulheres e 3,1% em homens. Estudos posteriores realizados em condições termoneutras encontraram resultados semelhantes, com pequenas variações⁵⁵. Após ativação aguda ao frio, porém, a prevalência chegou a 96% no estudo de Van Marken Lichtenbelt na Holanda⁵, mas não passou de 40% em uma população japonesa^{1,72} e não há dados publicados em população brasileira. O Quadro 1 mostra a prevalência de TAM em diversas regiões geográficas^{4,5,55,58,63,72,78-83} em temperatura ambiente ou após exposição aguda ao frio. Qual seria a razão para essas diferenças considerando-se que os protocolos de frio foram semelhantes?

Quadro 1 - Prevalência de positividade em PET-FDG em temperatura ambiente e após exposição ao frio em diferentes populações e regiões geográficas

Região geográfica	Porcentagem de captação
Temperatura ambiente	
Estados Unidos da América (Cohade <i>et al.</i> ⁷⁸)	13,7%
Estados Unidos da América (Yeung <i>et al.</i> ⁶³)	3,7%
Estados Unidos da América (Cypess <i>et al.</i> ⁴)	3,1% homens
	7,5% mulheres
Reino Unido (Au-Yong <i>et al.</i> ⁷⁹)	7,2%(inverno) 2,5% (verão)
Canadá (Ouellet <i>et al.</i> ⁸⁰)	6,8%
Alemanha (Stefan <i>et al.</i> ⁸²)	3,05%
Exposição aguda ao frio	
Holanda (van Marken Lichtenbelt <i>et al.</i> ⁵)	97%
Finlândia (Virtanen <i>et al.</i> ⁵⁸)	100%
Japão (Saito <i>et al.</i> ⁸³)	53%
Japão (Yoneshiro <i>et al.</i> ⁷²)	46%

Fonte: Adaptado de Halpern *et al.*¹.

Para melhor entender essas diferenças, deve-se voltar à fisiologia e ao estudo de animais de experimentação^{2,84}. Quando o camundongo vive em total termoneutralidade e é exposto agudamente ao frio, sua primeira resposta para proteger a temperatura interna é tremer². Nesse momento, o animal ainda não possui TAM pronto para ser ativado. Conforme o período de exposição ao frio aumenta, o animal começa a recrutar TAM e ativá-lo, diminuindo progressivamente os tremores (embora a resistência muscular também melhore para manter os músculos capazes de tremer sem fadiga). Quando o recrutamento atinge o máximo, o animal para de tremer e toda sua produção de calor passa a ser derivada do desacoplamento mitocondrial da UCP-1, via TAM. Nesse momento, ele tem o tecido adiposo recrutado. Após a retirada do animal do frio, ele volta à termoneutralidade, mas ainda possui, por algum tempo, o TAM pronto para ser ativado em qualquer eventualidade, o que é demonstrável injetando-se noradrenalina antes e depois do estímulo frio crônico. O aumento de gasto energético após o recrutamento é sensivelmente maior, demonstrando-se que o frio crônico recrutou o tecido, tornando-o pronto a ser ativado na eventualidade de um estímulo agudo^{2,85-87}.

Esse conceito é fundamental, pois explica porque existem diferenças de captação entre várias populações provavelmente a exposição diária crônica ao frio recruta o TAM que estará plenamente ativo quando de uma exposição aguda ao frio. Essa tese foi recentemente demonstrada por dois grupos, que mostraram aumento importante de ativação de TAM após uma exposição crônica e diária a períodos de frio, assim como aumento do gasto

energético durante exposição aguda após estimulação crônica *versus* exposição aguda no início do experimento^{88,89}.

Outros estudos mostram, como seria de esperar pelo que foi comentado acima, uma maior prevalência de captação de TAM nos meses de inverno, e um dado interessante e fascinante emerge^{30,83}. Os meses de maior captação não são necessariamente os mais frios, mas sim aqueles com as noites mais longas, sugerindo que o tamanho do fotoperíodo também influencia no recrutamento do tecido, não sendo possível descartar um possível papel da melatonina nessa ativação, no que pese os dados em humanos serem ausentes e os estudos animais em sua imensa maioria sejam muito antigos^{19,30-40,90-95}.

A hipótese fisiológica para esta observação é bastante interessante: o animal deve iniciar o recrutamento de TAM antes da chegada do frio para não depender do tremor para manter a termorregulação. Sendo assim, a gradual diminuição do período diurno que ocorre entre os equinócios seria um fator antecipatório para que o tecido já esteja ao menos minimamente ativado quando as temperaturas começarem a cair³⁰. A relação entre o TAM e a melatonina será discutida de forma mais abrangente em momento oportuno.

3.1.5 De onde vem o tecido adiposo marrom? A diferença entre o adipócito marrom e o bege

Pesquisas de pré-adipócitos e células progenitoras sugerem que o TAM clássico e o TAB derivam embriologicamente de regiões distintas⁹⁶⁻⁹⁸. O TAM clássico deriva do mesoderma paraxial, de pré-adipócitos conhecidos como adipócitos positivos para fator miogênico 5 (*myf5*, do inglês *myogenic factor 5*), por expressar esse gene⁹⁶. Essa linhagem celular é a mesma que leva à formação de miócitos, porém distinta da capaz de gerar TAB, que tem origem no mesoderma lateral, com adipócitos brancos conhecidos como negativos para *myf5*. Desta maneira, acreditava-se que para a diferenciação e recrutamento de TAM, seria necessário vencer todas as etapas da diferenciação desde pré-adipócitos até adipócitos maduros.

Uma descoberta, porém, que revolucionou o estudo do TAM foi que células localizadas em áreas de TAB, sob estímulos específicos (como frio crônico ou noradrenalina) poderiam passar a expressar UCP-1 e gerar termogênese, levando à hipótese de uma transdiferenciação do tecido adiposo^{97,99,100}. Essas células, aparentemente brancas em sua aparência quando não estimuladas foram intituladas de gordura bege ou “brite” (do inglês *brown-in-white*) e seu estudo cresceu de maneira vertiginosa nos últimos dez anos^{47,96,99,101-105}.

A primeira dúvida, ainda não totalmente esclarecida é se toda e qualquer gordura branca seria capaz de expressar UCP-1 sob estímulo específico ou se seria uma linhagem específica^{47,106}. As evidências atuais apontam para uma linhagem específica, visto que Wu *et al.*⁹⁹ observaram padrão de expressão gênica distinta entre os adipócitos brancos que não expressaram UCP-1 após estímulo e os adipócitos beges.

Provavelmente, a maior implicação em se fazer essa diferenciação entre adipócitos marrons e beges para o não especialista seja a possível terapêutica que pode surgir a partir deste conhecimento^{1,107,108}. Enquanto fazer diferenciação de células embrionárias em pré-adipócitos e adipócitos maduros para a formação de adipócitos marrons clássicos parece muito trabalhoso e demorado, levar à diferenciação de adipócitos beges já presentes em áreas de TAB para que expressem UCP-1 e tornem-se ativos surge como uma possibilidade mais factível¹.

3.1.6 É possível estimular farmacologicamente o tecido adiposo marrom?

Existem diversas possibilidades terapêuticas que envolvem a ativação do TAM, para tratamento tanto da obesidade quanto do diabetes mellitus tipo 2 (DM2)^{108,109}. Alguns estudos avaliam a resposta termogênica e de gasto energético após o próprio estímulo frio. Dados em humanos mostram que aclimação ao frio por período curto de tempo (10 dias), com exposição ao frio ao redor de 6 horas por dia, leva a recrutamento de TAM em indivíduos obesos que inicialmente não captavam no PET-FDG^{110,111}. Esta poderia ser uma maneira de recrutar TAM e, após esse recrutamento, usar substâncias capazes de ativá-lo. Um exemplo é a capsaicina, que aumenta o gasto energético de indivíduos TAM-positivos, mas não TAM-negativos, porém também pode ser capaz de induzir o “escurecimento” (tradução livre do inglês *browning*) de um tecido adiposo aparentemente branco^{112,113}.

Outras substâncias são candidatas para ativação do TAM e/ou diferenciação de adipócitos brancos em beges^{13,108,114}. Sabe-se que

agonistas noradrenérgicos têm um alto poder de ativação do TAM, porém seus conhecidos efeitos colaterais (já observados em antigas medicações), impediriam seu uso clínico¹¹⁵⁻¹¹⁷. Ácidos biliares foram estudados, com resultados interessantes e acredita-se inclusive que esse pode ser um dos possíveis mecanismos que leva à perda de peso sustentada com a cirurgia bariátrica¹¹⁸⁻¹²¹. Outras substâncias que já foram estudadas incluem a irisina, o fator de crescimento de fibroblasto 21 [(FGF)-21], a proteína morfogenética do osso [(BMP)-7] e o resveratrol^{50,103,108,109,122-125}.

Nesse contexto, a melatonina surge como um potencial recrutador e/ou ativador do TAM, baseando-se em estudos antigos com animais hibernantes e mais recentemente, com novos dados que aparentam corroborar essa hipótese^{19,30,39,126-129}.

3.2 Melatonina e a Regulação do Metabolismo Energético

3.2.1 Fisiologia resumida da glândula pineal e da produção de melatonina

A glândula pineal foi reconhecida como um órgão cerebral próprio no século IV a.C., por Galeno, que a denominou *konareion*, devido a sua forma em cone, de onde também deriva o nome “pineal”, pela semelhança com uma pinha dos pinheiros^{17,130}. Ao longo da história, a glândula pineal chegou a ser reconhecida por Renée Descartes como “a sede da alma humana”, antes de ser delegada a um plano menor, no século XIX, quando muitos pesquisadores passaram a vê-la apenas como um mero órgão residual¹³¹. No século XX, porém, houve um renascimento do estudo da glândula pineal, devido a muitos achados de biologia em animais, como rãs, lampreias e

lagartos, e que culminaram, na década de 1950, com a identificação da N-acetil-5-metoxitriptamina, batizada melatonina por sua capacidade de escurecer a pele de rãs (do latim *melas*), pelo pesquisador Aaron Lerner¹⁷. Posteriormente, descobriu-se que a secreção de pinealócitos era de alguma forma regulada pela luz¹⁷.

A melatonina é uma molécula presente de forma ubíqua na natureza, e, em humanos, é produzida pela glândula pineal durante a noite e sob baixa intensidade de iluminação ambiente, sob controle do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo através de estímulo noradrenérgico^{17,19,132}. Embora haja descrições na literatura de sua produção extrapineal, os níveis de melatonina no plasma são abolidos pela pinealectomia e, portanto, refletem basicamente a produção pela glândula pineal¹³³⁻¹³⁵.

Sua produção pode ser resumida da seguinte forma: pinealócitos captam triptofano do sangue e o converte em serotonina por hidroxilação e decarboxilação; posteriormente a serotonina é convertida a N-acetil-serotonina pela enzima N-acetil-transferase (NAT), que é uma enzima limitante e fundamental para a produção de melatonina^{19,20,27}. A seguir, a N-acetil-serotonina é metilada a melatonina pela enzima hidroxindol-O-metil-transferase (HIOMT), também chamada de serotonina-acetil-metil-transferase (ASMT). A síntese e/ou ativação (dependendo da espécie) de NAT, a enzima limitante, ocorre de maneira circadiana, através de uma regulação determinada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ). No início do período noturno, a menor atividade do NSQ, leva a uma desinibição do NPV, que, por mobilização do simpático torácico alto e consequente estímulo noradrenérgico, leva à maior produção e/ou ativação de NAT e, portanto, à

síntese de melatonina. No entanto, a presença de luz no período noturno leva à inibição da melatonina, pois sinais fóticos retinianos atingem o NSQ, ativando-o, com consequente inibição do NPV e da produção/ativação de NAT²⁷. Dessa forma, é bem reconhecido que a presença de luz noturna reduz a produção endógena de melatonina e altera sua cinética, com consequências ao organismo^{18,136-138}. Tecnologias modernas, como luzes e TVs de diodos de emissão de luz (LED, do inglês *light emitting diode*), além dos tablets (do inglês *tablets*) eletrônicos, possuem intensidade luminosa suficiente para uma inibição poderosa dessa fisiologia básica^{138,139}.

É importante notar também que a regulação circadiana de melatonina, com sua maior secreção noturna ocorre em todos os organismos, independente do período de atividade destes^{19,21}. Desta forma, a melatonina também é conhecida como a “expressão hormonal do escuro”, e se, em humanos, a maior concentração de melatonina coincide com a fase do sono, em animais noturnos, essa maior concentração coincide com o período de vigília²¹.

Da mesma forma, a melatonina tem uma variação sazonal, acompanhando o fotoperíodo, ou seja, uma produção mais longa nos meses de inverno, onde as noites são maiores, e mais curta nos meses de verão^{19,140}. Essa variação sazonal, ou infradiana, tem importância fundamental em questões reprodutivas de diferentes espécies, além de uma função primordial para animais hibernantes, que precisam se preparar com antecipação para um rigoroso inverno^{30,141}.

A melatonina é uma molécula anfifílica, difundindo-se, portanto, muito bem tanto em meios hidrofílicos quanto lipofílicos^{17,142}. Sendo assim, ela não é armazenada na pineal e, após sua biossíntese, rapidamente liberada nos

capilares, 70% ligada à albumina com uma meia-vida de aproximadamente 30 minutos. Sua metabolização primária é no fígado, mas também no rim, e o principal metabólito em humanos é a 6-sulfatoximelatonina urinária (6SMu)^{17,143-145}.

A oscilação circadiana de melatonina inicia-se aos dois meses de vida, atinge seu pico antes de adolescência, com uma redução na idade adulta e, após os 60 anos suas concentrações vão gradualmente diminuindo, na maioria das vezes atingindo 25% da produção máxima do início da vida adulta^{17,146-150}.

Para mensuração da melatonina, várias metodologias já foram propostas^{144,145,151}. A dosagem de 6SMu, coletada durante doze horas, no período noturno, é considerada um método fidedigno, pois permite mensurar a produção noturna de melatonina, porém sem informação sobre pico e fase do início da produção diária¹⁵¹⁻¹⁵³. Medidas sanguíneas e salivares também são possíveis, porém recomenda-se que sejam feitas múltiplas dosagens, para que seja possível avaliar a ritmicidade e o pico, pois o horário de pico pode ser muito variado entre indivíduos, e pode sofrer grandes influências de fatores externos, como iluminação noturna, mudanças de fuso-horário ou horário de verão^{145,151}. Um estudo publicado há cerca de 30 anos demonstra que existe boa correlação entre essas várias medidas¹⁵⁴. Alguns estudos observacionais e de intervenção com melatonina tentam correlacionar diferentes níveis de secreção de melatonina com desfechos¹⁵⁵⁻¹⁵⁹, mas não existe um valor de referência bem estabelecido de normalidade. Em um estudo clínico em idosos e indivíduos jovens, antes e após da administração

de uma dose baixa de melatonina, percebeu-se que os níveis de melatonina sanguínea são cerca de três vezes maiores do que os picos salivares, sendo o pico sérico, sem administração de melatonina, em jovens aproximadamente de 100 pg/mL e em idosos com média de idade de 59 anos, esses valores caem pela metade¹⁵⁰. Outro estudo, mais recente, classificou indivíduos em baixa, média e alta secreção de melatonina, sendo os níveis salivares considerados baixos ao redor de 20,5 pmol/L (ou 4,76 pg/mL), moderados ao redor de 124 pmol/L (28,83 pg/mL) e alto ao redor de 318 pmol/L (73,95 pg/mL)¹⁶⁰. Porém, ainda assim faltam estudos para determinar normalidade com medidas de melatonina, que são bastante variáveis de indivíduo para indivíduo, e infelizmente, a dosagem de melatonina é realizada apenas em cenários de pesquisa, impedindo um melhor uso da mesma na prática clínica.

3.2.2 Ações da melatonina e seus receptores

A melatonina possui uma série de características clássicas que as definem como hormônio, como ser secretada por um órgão endócrino, circular tanto na forma livre como ligada à albumina, e possuir receptores celulares^{17,19}. Seus receptores mais bem conhecidos e estudados são os receptores de membrana ligados à proteína G, conhecidos como MT1 (ou MTRN1a), MT2 (ou MTNR1b) e MT3^{17,161-163}. O MT3, porém, tem significado clínico pouco conhecido e inclusive acredita-se que, ao invés da melatonina, seu receptor seria a enzima quinonaredutase 2, e, portanto, não será mais citado¹⁶⁴. Além deles, porém, há evidências da presença de receptores

nucleares retinoides, de ação pouco conhecida, além de efeitos independentes dos receptores, relacionado a seus efeitos antioxidantes^{19,163,165}. Para um correto entendimento das funções da melatonina, no entanto, é importante entender seu efeito cronobiológico, distinto do efeito hormonal clássico^{19,166}. A variação circadiana de melatonina, com sua presença noturna e relativa ausência diurna é fundamental para um correto funcionamento de ritmos biológicos internos, sejam hormonais, metabólicos ou de expressão gênica ou proteica. Desta forma, analisar as funções da melatonina apenas como um hormônio clássico pode nos levar a interpretações erradas. Um exemplo ocorre no pâncreas, onde a melatonina agudamente inibe a secreção de insulina^{28,167-169}; porém, a ausência de oscilação circadiana de melatonina (como em animais pinealectomizados) leva, a longo prazo, a resistência à insulina e DM2^{19,25,170}. Dessa forma, presume-se que a inibição noturna de melatonina, seguida de sua desinibição diurna é o que garante um correto funcionamento do pâncreas e da sinalização insulínica¹⁹.

A real distribuição dos receptores MT1, MT2 no sistema nervoso central (SNC) e nos tecidos periféricos ainda é pouco conhecida, bem como as reais diferenças entre suas funções^{17,163,171}. É sabido, no entanto, que no NSQ, há uma expressão maior de receptores MT1¹⁷². No entanto, ambos os receptores de melatonina são encontrados em diversos tecidos, tanto no SNC como nos órgãos periféricos. Há receptores de melatonina em retina, vasos sanguíneos, sistema imune e reprodutivo, pâncreas, pele, trato gastrointestinal, ossos, rins, placenta, entre outros^{163,172}. Desta forma, é esperado que a melatonina tenha importante função sincronizadora de forma

ubíqua, e que tenha suma importância na regulação do sistema endócrino, reprodutivo e imune¹⁷¹.

Sem dúvida, uma das funções mais importantes da melatonina é como sincronizadora interna do ritmo circadiano, ou *zeitgeber* (elementos ambientais ou sincronizadores externos que regulam o relógio biológico, cuja tradução é “doador de tempo”) interno¹⁷³. O relógio central em mamíferos é o NSQ, que possui um ritmo circadiano próprio, que se manifesta mesmo na ausência de estímulos externos. Por exemplo, animais submetidos à luz constante durante as 24 horas mantêm um ritmo circadiano dependente do NSQ, mas esse ritmo não será de exatamente 24 horas¹⁷³. Os sincronizadores externos (ou *zeitgebers*) permitem ao NSQ se ajustar aos fatores ambientais e assim, ter um ritmo de exatamente 24 horas. A luz é o *zeitgeber* mais importante. Como ela também modula a secreção de melatonina, sua função sincronizadora interna é afetada por sincronizadores externos, permitindo que o NSQ e, conseqüentemente todo o organismo, se ajuste e adapte às mudanças do ambiente¹⁷³. Em animais diurnos, como os humanos, a melatonina também tem função soporífera, com seu início de ação coincidindo com o fim da fase ativa do dia e seu pico coincidindo com o período de maior sono¹⁴⁷. Obviamente, em animais noturnos, esse efeito se inverte²¹.

Uma descrição extensiva de todas as funções já estudadas em animais foge do escopo dessa revisão, portanto o foco principal será na regulação metabólica a partir do próximo item.

3.2.3 A melatonina e a regulação metabólica: estudos em animais

Os processos fisiológicos e comportamentais do corpo humano são organizados para balancear o consumo, armazenamento e gasto de energia, permitindo assim a sobrevivência e a reprodução do indivíduo, perpetuando a espécie¹⁹. Nesse contexto, é imprescindível que haja uma organização metabólica que permita a otimização dos recursos, concentrando a ingestão alimentar durante a fase ativa do dia e mobilizando estoques energéticos durante a fase de repouso^{21,174}. Esse balanço é dado pelo relógio biológico interno, o NSQ, e finalmente regulado pela melatonina¹⁹.

Como bem claramente esclarece Cipolla-Neto *et al.*¹⁹ em recente revisão, para entender o papel da melatonina sobre o metabolismo energético, é importante avaliar três perspectivas: a) a perspectiva da endocrinologia clássica (hormônio agindo em seu receptor e ativando cascatas que terão determinada função em um organismo), b) a perspectiva da cronobiologia, considerando o papel da melatonina na regulação da ordem interna circadiana dos processos fisiológicos e c) a perspectiva da regulação do balanço energético e seu desfecho final, o peso corporal. O Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) estuda as funções metabólicas da melatonina há décadas e o Projeto Temático ao qual esta tese está vinculada é uma continuação dessas pesquisas com intuito translacional²⁶. Alguns aspectos do conhecimento sobre a regulação metabólica, com diversas citações a estudos desenvolvidos dentro do ICB-USP e capitaneados pelo Prof. José Cipolla-Neto serão discutidos.

Em relação à sua função como hormônio clássico, os primeiros experimentos sobre o assunto demonstraram que a infusão de extratos pineais leva a hipoglicemia e aumento de tolerância à glicose enquanto a pinealectomia leva à redução da tolerância à glicose^{19,24,175,176}. Mais recentemente, a perturbação circadiana causada em animais foi caracterizada por um estado diabetogênico, com resistência à insulina periférica e central^{26,177,178}. Um fenótipo parecido ocorre em animais transgênicos com inativação gênica do receptor MT1¹⁷⁹.

Esse processo patológico pode ser revertido com a reposição de melatonina^{19,180,181}. Parte da ação da melatonina sobre o metabolismo glicêmico se dá por ação no transportador de glicose tipo 4 (GLUT4, do inglês *glucose transporter type-4*)^{19,182}, assim como se demonstra que a própria melatonina aja via receptores MT1 de membrana para induzir fosforilação dos receptores de insulina em tirosina^{28,168,183}, ao mesmo tempo a melatonina age sobre as células-beta inibindo a secreção de insulina^{28,184}, cujo efeito, como discutido anteriormente, é benéfico pois a ritmicidade circadiana da produção de insulina (maior durante o dia e menor à noite) é importante para um correto funcionamento do pâncreas endócrino^{19,185,186}. Além desse processo de regulação rítmica mediado pela sincronização dos chamados “genes relógio” (do inglês *clock genes*), deve-se assinalar que o processo inibitório noturno imposto por várias horas pela melatonina sobre as células beta pancreáticas se dá pela inibição da ativação da proteína Gi inibitória (Gi) e inibição da adenilciclase, que leva a um estado de hipersensibilidade pancreática a estímulos que mobilizam o monofosfato

cíclico de adenosina (cAMP), aumentando sobremaneira a liberação e produção de insulina (como o peptídeo glucagon-símile tipo 1 [GLP-1, do inglês *glucagon-like peptide-1*], por exemplo) assim que a melatonina deixe de estar presente¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Estudo recente conduzido pelo grupo do Prof. José Cipolla-Neto também demonstrou que a ausência de melatonina leva à resistência à leptina, um aspecto bastante conhecido da fisiopatologia da obesidade¹⁸¹.

Além disso, há evidências de um papel da melatonina diretamente nos adipócitos, via receptores MT2, com modulação da captação de glicose, além de potenciação da síntese de leptina via receptores MT1^{19,188-190}. Há também dados que sugerem que a melatonina influencia diretamente lipólise, lipogênese, diferenciação adipocitária e captação de ácidos graxos^{188,190}.

Sobre o papel da melatonina na regulação dos ritmos diários, é necessário entender seu papel na sincronização do relógio central humano, o NSQ hipotalâmico^{19,147,166,191,192}. Em geral, a fase ativa do dia é associada ao consumo e armazenamento de energia, onde a sensibilidade à insulina é máxima, assim como a tolerância à glicose, lipogênese e bloqueio da gliconeogênese^{19,27,193}. Em comparação, a fase de repouso é caracterizada pela utilização da energia armazenada, com gliconeogênese e glicogenólise, e maior resistência à insulina^{19,194-196}. A eventual ausência de melatonina impede a correta sincronização circadiana, levando o organismo a um desequilíbrio entre o armazenamento e o consumo energético, que pode levar a doenças metabólicas, o que é corroborado pelo dado que animais

pinealectomizados apresentam a gliconeogênese na fase ativa do dia^{19,197}. Ademais, estudos *in vitro* demonstram que a adição de melatonina a culturas de adipócitos sincroniza os processos de lipogênese e lipólise às fases do noturna e diurna, o que não acontece na ausência de melatonina¹⁹⁰.

Em relação ao balanço energético, o papel da melatonina se dá por regular o gasto e o consumo energético, em geral, com propriedades antiobesogênicas em modelos animais^{19,30,31,41,61,90,198,199}. Porém, vários experimentos sugerem que esse efeito não se dá por redução do consumo alimentar, e, portanto, o efeito ocorre por ação no aumento do gasto energético^{30,199,200}. O aumento de temperatura corpórea que ocorre em animais tratados com melatonina corrobora essa hipótese e o TAM passa a ser um forte candidato às ações da melatonina^{19,126}. A Figura 4 ilustra como a melatonina age em vários pontos da via metabólica¹⁹.

Fonte: Adaptado de Cipolla-Neto *et al.*¹⁹

Figura 4 - Melatonina age em vários pontos da via energética. Seu papel no gasto energético pode se dar através de sua regulação do tecido adiposo marrom

3.2.4 Melatonina e a regulação metabólica em humanos

Em humanos, os estudos com melatonina são muito mais escassos do que em modelos animais. Apesar disso, existem muitos dados que sugerem que a melatonina também teria um papel importante na regulação metabólica^{155,201-206}.

Preliminarmente, existem dados epidemiológicos consistentes de situações, em humanos, que estão relacionadas à redução de melatonina circulante (por exemplo, idade avançada, trabalho noturno e aumento da exposição à luz no período noturno) e associadas à redução da sensibilidade à insulina^{16,18,19,126,192,207,208}. Entretanto, é muito difícil isolar o papel da melatonina, uma vez que diversos outros fatores, como má qualidade do sono e mudanças de composição corporal poderiam ter um papel independente^{209,210}.

Provavelmente, o dado mais contundente seja o da relação entre DM2 e o polimorfismo do gene MTNR1b, que expressa o receptor MT2 no pâncreas^{167,211,212}. Diferentes polimorfismos relativamente comuns na população levam a um aumento do risco de DM2 por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, mas que se relacionam à sinalização de melatonina no pâncreas interferindo na secreção de insulina^{211,213-215}. A melatonina tem uma ação direta em inibir a sinalização pancreática, fundamental para um correto funcionamento circadiano do pâncreas^{168,216}. Porém, uma sinalização excessiva ou que atrapalhe a correta sinalização circadiana poderia levar a um desequilíbrio metabólico^{202,217}. Um recente estudo avaliou que o uso de melatonina para indivíduos com um polimorfismo específico nesse receptor levou a piora da tolerância à glicose avaliada por curva glicêmica²¹⁷. Embora

mais estudos mecanísticos precisem ser feitos, a relação epidemiológica entre esses polimorfismos e o risco de DM2 demonstra claramente que existe alguma importância fisiológica nessa sinalização de melatonina no pâncreas^{203,218}.

Um estudo epidemiológico publicado no importante periódico JAMA, que demonstra que mulheres com níveis de 6-STMu urinária no quartil mais baixo têm aproximadamente 50% mais chance de desenvolver DM2 comparado com mulheres no quartil mais alto¹⁵⁵, aludindo em alguma regulação de melatonina na fisiopatologia da intolerância à glicose.

Estudos clínicos com uso de melatonina para tratamento de doenças metabólicas são ainda raros, mas recentes publicações discutiram sobre a urgência de novas pesquisas nessa área, devido à extensa literatura presente em animais de experimentação^{205,219}.

Grossman *et al.*²²⁰⁻²²² demonstraram um papel anti-hipertensivo da melatonina no descenso noturno da pressão arterial e diversos estudos epidemiológicos comprovaram que o não descenso da pressão arterial, comum em pacientes metabólicos, é um fator de risco para doença cardiovascular independente do nível de pressão arterial^{223,224}.

Em relação aos níveis lipídicos, uma recente metanálise compilou dados de oito estudos clínicos randomizados com melatonina e encontrou efeitos benéficos sobre os triglicérides (TG) plasmáticos e o colesterol total²²⁵, mas não sobre a lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol (HDL-c). Apesar disso, um estudo em mulheres após a menopausa sugere um efeito benéfico também sobre o HDL-c²²⁶, podendo essa disparidade dever-se à heterogeneidade de dose de melatonina e o tempo de estudo.

Há ainda alguns estudos que avaliaram a melatonina em pacientes com esteatose hepática e esteato hepatite. Como a melatonina é um reconhecido antioxidante, além dos efeitos metabólicos, teria um potencial para tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica (NASH, do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*)²²⁷⁻²³⁰. Os estudos, embora pequenos e de duração curta, mostram melhora de marcadores bioquímicos²³⁰⁻²³². Apenas um estudo avaliou a esteatose por imagem evolutivamente utilizando ultrassonografia, que sabidamente não é um bom parâmetro de evolução²³². Além disso, um estudo avaliou a doença hepática gordurosa não alcoólica após 14 meses de suplementação de melatonina com resultados positivos, mas também utilizou apenas marcadores bioquímicos séricos²³³. Ademais, um estudo clínico randomizado avaliou a suplementação de melatonina em parâmetros da síndrome metabólica, com resultados discretos, porém positivos²³⁴.

Um estudo pequeno com suplementação de melatonina em indivíduos com DM2 igualmente demonstrou efeito benéfico com redução de hemoglobina glicada de 0,66%, que não seria explicada simplesmente pela melhora do sono²³⁵. Contudo, o estudo previamente citado que demonstrou efeitos negativos do uso de melatonina em pacientes com um polimorfismo específico do receptor MTNR1B sugere que a melhora metabólica pode ser heterogênea²¹⁷.

É importante advertir que, como um hormônio, o uso da melatonina estaria mais indicado em situações nas quais ela esteja deficiente¹⁵⁰. Apesar disso, quase nenhum estudo avaliou previamente o nível de melatonina por 6-STMu ou outro método. Intui-se que a maior prioridade seriam os estudos que priorizem o uso de melatonina em situações em que

ela se encontre baixa, devido à idade, ao uso de medicamentos como betabloqueadores, ou em situações que sua produção é cronicamente inibida, com em trabalhadores noturnos ou pessoas comuns que se expõem em demasia à luz noturna. Nesse sentido, o atual estudo com indivíduos pinealectomizados é uma excelente prova de conceito por focar nessa população específica.

Poucos estudos avaliaram o peso corporal^{205,236}. Entretanto, alguns dados interessantes decorrem de estudos em situações obesogênicas, como a menopausa ou o início do uso de antipsicóticos²³⁷⁻²⁴⁰. Um pequeno estudo sugeriu que o uso concomitante de fluoxetina com melatonina no período de perimenopausa em mulheres com transtorno da compulsão alimentar periódica (TCAP) levou a uma redução de IMC altamente significativa, de mais de 4 kg/m², comparado com um efeito nulo no grupo apenas em uso de fluoxetina²⁴¹. De forma análoga, um estudo com melatonina unicamente após a menopausa mostrou uma redução de massa gorda e um aumento de massa magra, embora com pequeno efeito sobre o IMC²³⁸. Alguns estudos observaram que a administração de melatonina reduziu de forma significativa o ganho de peso e os fatores de risco cardiometabólicos, muito comuns com o uso de antipsicóticos atípicos^{237,239,240,242,243}.

3.2.5 Uso clínico da melatonina

Embora a melatonina seja pouco estudada na regulação metabólica em humanos, ao contrário do que ocorre em animais, como indicado acima, ela tem diversos outros usos clínicos potenciais, muitos com dados robustos e muitos ainda em investigação^{143,244-249}. A melatonina é empregada em diversos países do mundo como medicação de venda livre sem receita (OTC do inglês *over-the-counter*) ou como suplemento alimentar sem uma adequada regulação por parte das agências sanitárias²⁴⁹. Infelizmente, isso leva a um uso indiscriminado e, muitas vezes, desnecessário do hormônio, além de dificultar a realização de estudos de boa qualidade para avaliar sua eficácia em diversas situações clínicas pela falta de padronização de dosagens, de farmacocinética e de um controle de qualidade confiável.

A melatonina e seus análogos são estudados em diversas condições clínicas, como na indução do sono, na sincronização do ritmo circadiano (como na defasagem de fuso horário ou *jet-lag*, em distúrbios de fase avançada do sono e em outras doenças que acometem o ritmo circadiano), em pacientes com depressão (o antidepressivo e análogo da melatonina, a agomelatina), e ainda como antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral ou analgésico²⁴⁷⁻²⁵⁵. Detalhar todos esses estudos escapa do escopo dessa revisão. A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia reconheceu algumas dessas situações clínicas em que o uso da melatonina pode ser justificado em um documento recente²⁵⁶.

O uso mais estudado e referendado é em quadros de insônia em indivíduos idosos, onde sabidamente a produção de melatonina cai para um

nível 75% menor do que em adultos não idosos^{150,245,246}. Há uma diretriz²⁵⁷ que recomenda a melatonina nessa condição, mas não há consenso entre diferentes diretrizes de insônia^{246,258}. É importante notar, todavia, que os melhores resultados foram obtidos com doses consideradas fisiológicas de melatonina (de aproximadamente 0,3 mg por dia), ao passo que normalmente as doses encontradas no mercado são muito mais altas (de 3 mg a 10 mg)^{150,156,259}.

Em distúrbios relacionados ao ritmo circadiano, como distúrbio do avanço ou atraso de fase, defasagem de fuso horário, trabalhadores noturnos, cegueira, e outras situações, o uso da melatonina deve ser individualizado, tanto em sua dosagem como no horário de administração, com intuito de sincronizar, da melhor maneira possível, o relógio biológico interno com o externo^{254,255,260,261}. Em muitas circunstâncias, a melatonina é um adjuvante da fototerapia, visto que a luz e a melatonina possuem ações opostas em avançar ou atrasar o ritmo biológico interno, de acordo com o horário do dia²⁵⁵.

3.2.6 Estudos em humanos pinealectomizados

Embora muito seja estudado sobre o papel da melatonina em animais, e diversos modelos conceituais de animais pinealectomizados com ou sem reposição de melatonina existam, até mesmo uma série de trabalhos desenvolvidos pelo Prof. José Cipolla-Neto no ICB-USP²⁶, a informação sobre indivíduos pinealectomizados e sobre a suplementação de melatonina nesse grupo específico é bastante escassa e mesmo controversa na literatura.

Isso se deve à raridade de tumores pineais que levam à necessidade de pinealectomia ou à ablação radioterápica da glândula^{262,263} à frequente necessidade de manipulação de outras áreas cerebrais, o que poderia gerar fatores confundidores para um real conhecimento dos efeitos da ausência de melatonina no ser humano²⁶⁴. Deve-se ademais, à própria noção, ainda difundida, de que a pineal é um órgão residual, produtor de um hormônio de menor importância, acrescida do fato de não haver métodos confiáveis de detecção de melatonina na prática clínica. Nesse sentido, na endocrinologia clássica, a reposição de um hormônio que esteja em deficiência, por razões diversas (autoimunidade, remoção cirúrgica, ausência ou deficiência congênita) é a regra e seria absolutamente natural que o mesmo sucedesse com a melatonina¹⁵⁰. A partir de um melhor entendimento sobre situações nas quais a produção seja completamente ausente, pode-se expandir o conhecimento sobre situações em que haja deficiência parcial, como ocorre no envelhecimento, excesso de exposição à iluminação noturna, ou mesmo com o uso de medicações, como betabloqueadores^{136,150,265}.

O primeiro ponto a considerar é se a remoção cirúrgica da glândula leva, em humanos, a uma ausência na detecção de melatonina, como ocorre em animais. Um estudo prospectivo mostrou que, após pinealectomia, os níveis de melatonina salivares noturnos encontravam-se abaixo dos valores de normalidade do método²⁶⁶. Um estudo com cistos de pineal também documentou que, após a ressecção do cisto, os níveis abolidos de melatonina eram semelhantes ao que se demonstra numa pinealectomia total²⁶⁷ o que foi confirmado por outros estudos^{268,269}.

Confirmada a informação que os níveis de melatonina caem significativamente após a pinealectomia, a questão seguinte é se há impacto clínico dessa ausência de melatonina e se sua suplementação leva a melhora clínica¹⁷. Poucos estudos de fato avaliaram essa informação de forma rigorosa^{17,266}. Foram encontrados na literatura relatos de casos em que pacientes apresentavam alterações no sono que melhoraram com o uso de melatonina^{268,270-272}. Estudos maiores igualmente sugerem uma maior prevalência de transtornos do sono, mas sem a adequada reposição de melatonina, uma análise sobre causa e efeito fica bastante comprometida^{269,270,273,274}. Um estudo, por exemplo, avaliou que a craniotomia, mas não a pinealectomia seria um fator associado a distúrbios de sono²⁷³. Porém, deve-se levar em consideração que queixas subjetivas podem não ser relatadas ou percebidas, e, após a reposição, ser notada melhora significativa. Isso é avaliado em outras situações, como em hipotireoidismo subclínico, em insuficiência adrenal parcial ou em deficiência de hormônio de crescimento (GH) no adulto²⁷⁵⁻²⁷⁷.

A avaliação metabólica de pacientes pinealectomizados também é desconhecida e não foram encontrados estudos em humanos que avaliaram o metabolismo antes e após a reposição de melatonina nesses indivíduos.

3.3 A Relação Entre a Melatonina e o Tecido Adiposo Marrom

Como explicado anteriormente, o interessante achado de perda de peso sem redução da ingestão calórica em animais tratados com melatonina sugere um papel da mesma no gasto energético¹⁹. Nesse contexto, o TAM aparece como um candidato plausível³⁰.

O maior corpo de publicações entre a relação da melatonina com o TAM vem de animais sazonais, nos quais a importância do TAM é mais reconhecida devido ao padrão de hibernação^{30,40}. Evidências sugerem que não só a temperatura do ambiente, mas o tamanho do período diário de exposição à luz (e sua progressiva diminuição nos dias que antecedem o inverno) é fundamental para um correto ciclo de hibernação/despertar^{2,30,93,278,279}. Hamsters sírios pinealectomizados (portanto sem melatonina circulante) perdem a capacidade de hibernação induzida por frio e por fotoperíodos curtos^{280,281}, assim como esquilos pinealectomizados apresentam uma ruptura dos seus ciclos de hibernação/despertar²⁸². Além disso, rápidos despertares que ocorrem durante a hibernação apresentam pico tanto de melatonina como de ativação de TAM³⁰.

Estudos em animais sazonais expostos a diferentes ciclos de claridade/escuridão (fotoperíodos) mostram, com variações entre diferentes espécies, uma tendência a aumento da adiposidade total e menor massa de TAM em ratos expostos a dias mais longos, ou seja, noites mais curtas e, portanto, com menor produção noturna total de melatonina^{30-32,34,35,37,38,279,283}. A administração de melatonina a esses animais, tanto na forma de implantes contínuos como de maneira circadiana (durante o

período escuro) demonstram quase que consensualmente, um aumento na massa de TAM e (nos estudos que puderam avaliar) aumento na termogênese não relacionada a tremores^{36,40,92-94,278,279,284-286}. As doses utilizadas foram bastante variáveis, desde 25 mcg até 50 mg e os tempos também variaram substancialmente, de 2 semanas a 90 dias³⁰ (Quadro 2). Mais recentemente, um estudo vinculado a esse projeto temático demonstrou redução da temperatura da cauda de animais pinealectomizados quando expostos ao frio, sugerindo uma maior intolerância à menor temperatura¹⁸¹.

O aumento da termogênese, portanto, sugere um papel da melatonina não apenas na proliferação do TAM nestes animais como também na sua ativação^{2,30}.

Quadro 2 - Compilação de estudos que avaliaram a suplementação de melatonina na massa e atividade de TAM de animais (principalmente hibernantes)

Espécie	Posologia da melatonina	Massa de TAM	Atividade de TAM
Hamster djungário	3,1 mg SC implantado por 6 sem em diferentes fotoperíodos	Aumento	N.a.
Camundongo de pé-branco	3,1 mg SC por 4 semanas em fotoperíodo de 16 horas	Aumento de 30%	Aumento de termogênese
Rato comum	100 mcg/d por 12 semanas aclimatados ao frio	Redução	13% de aumento de termogênese
Hamster Djungário	Implantes de 7 dias em fotoperíodo de 16 horas	Aumento	Aumento de atividade de citocromo oxidase
Esquilo de 13 linhas	3 mg por 2 semanas ou 50 mcg IP por 4 semanas	Aumento de 42%-56%	N. a.
Camundongo de pé-branco	50 mg SC ou no hipotálamo por 7 semanas em fotoperíodo de 16 horas	Aumento de 25% SC e 59% em hipotálamo	N.a.
Hamster sírio	25 mcg injetado SC às 17 horas em fotoperíodo de 14 horas	Aumento 50%	N.a.
Hamster djungário	Injeção de 25mcg/d às 16 horas por 90 dias em fotoperíodo de 16 horas	Aumento	Aumento de termogênese e atividade de citocromo oxidase
Hamster sírio	25 mcg/d 3 horas antes do escuro por 8 semanas em fotoperíodo de 14 horas	Aumento 24%	Aumento
Hamster sírio	25 mcg/d 1 hora antes do escuro por 7 semanas em fotoperíodo de 16 horas	Aumento	N.a.

Fonte: Adaptado de Tan *et al.*³⁰

N.a.: Não avaliada; TAM: Tecido adiposo marrom; SC: Subcutâneo; IP: Intraperitoneal.

Como a maioria dos estudos citados são muito antigos, pouco se sabe sobre a influência da melatonina sobre o tecido adiposo bege, de identificação bem mais recente. Um estudo, porém, sugere que tanto um fotoperíodo curto como a própria melatonina poderiam levar ao escurecimento (*browning*) do TAB, tornando ainda mais interessante e atual o estudo da melatonina²⁸⁷.

Vários são os mecanismos propostos para a ativação do TAM pela melatonina (Figura 5)³⁰. Um deles seria o aumento do fluxo simpático, mediado pelo NSQ, que é regulado pela melatonina através dos receptores MT1^{34,284,288}. Sabidamente o NSQ poderia regular o TAM através do SNS, uma vez que já foram identificadas vias anatômicas que os interligam^{30,288}. Além disso, receptores de melatonina já foram encontrados diretamente no TAM de hamster sírios e outros roedores, sugerindo um estímulo direto para sua proliferação e eventualmente ativação⁹⁴. No entanto, o efeito da melatonina diretamente no TAM é menos conhecido e há dúvidas sobre se esse papel seria estimulatório ou inibitório, visto que os receptores MT1/MT2 são ligados a uma proteína Gi, que reduziria o cAMP intracelular e atividade de enzimas como a proteína-quinase A (PKA). Como os receptores noradrenérgicos no TAM aumentam o cAMP e a PKA, esse efeito direto, portanto, poderia ser inibitório³⁰. Hardeland²⁸⁹, porém, propôs que alguns receptores MT1/MT2 poderiam estar ligados a uma proteína G estimulatória (Gs), que, em diversas etapas levaria à maior ativação do TAM. A melatonina poderia, também, ter um efeito facilitador aos efeitos estimulatórios noradrenérgicos²⁹⁰, onde a presença local de melatonina hipersensibiliza o tecido a estímulos noradrenérgicos.

+: Estimulatório; ?: Questionável; 5'-D2: 5'-deiodinase tipo 2; α_1 : Receptor α -1 adrenérgico; β_3 : Receptor β -3 adrenérgico; G: Proteína G; MT1: Receptor de membrana da melatonina tipo 1; NE: Norepinefrina; NSQ: Núcleo supraquiasmático; T4: Tetraiodotironina; T3: Triiodotironina; UCP1: Proteína desacopladora tipo 1; Flechas pontilhadas: Múltiplos passos; Triângulos sólidos: Melatonina, Colunas sólidas com pontas: Noradrenalina.

Adaptado de Tan *et al.*³⁰

Figura 5 - Mecanismos propostos pelo qual a melatonina ativa o tecido adiposo marrom

Essa diferenciação entre os efeitos diretos da melatonina e indiretos via estímulo simpático é fundamental caso sejam estudadas situações onde a sinalização simpática é comprometida. É possível também que a própria melatonina possa agir na mitocôndria e, assim, aumentar a capacidade termogênica do TAM^{279,291}. A ação da melatonina em outros hormônios também parece ter importância, como por exemplo, a ativação da 5'-deiodinase tipo 2 (5'-D2) no TAM que leva a um aumento local nas concentrações de triiodotironina (T3) de até sete vezes²⁹² e consequente aumento na produção de calor que, em animais hibernantes, foi tecido-

específica^{30,285,292}, ou seja, esse aumento da 5'D2 ocorre apenas no TAM. Outros hormônios, como prolactina e cortisol, porém, também apresentam variação circadiana e podem se relacionar a uma ativação do TAM, ou influenciar a relação da melatonina com esse tecido. Por exemplo, há muitos estudos sobre a relação temporal entre cortisol e melatonina^{160,293-297}, assim como estudos demonstraram um papel dos glicocorticoides tanto na ativação aguda como na inibição crônica do TAM²⁹⁸⁻³⁰¹. Essa discussão é importante quando a regulação dos glicocorticoides não é corretamente realizada.

Apesar de diferentes espécies animais possuírem ritmos circadianos com períodos ativos distintos (exemplo: humanos tem período ativo diurno, enquanto em ratos o período ativo é o noturno), o papel da melatonina no metabolismo energético parece ser semelhante em diferentes espécies animais, embora com algumas nuances^{30,302}.

Recentemente, um estudo em camundongos demonstrou que a captação de TAM por PET-FDG segue uma variação circadiana, com pico de ativação na 9ª hora da fase de luz³⁰³. Se por um lado esse dado confirma a hipótese da influência do ritmo circadiano na ativação de TAM, por outro nos leva a imaginar que a melatonina não teria um papel de ativação aguda do TAM nesta espécie, e poderia ter dois efeitos que cronicamente o estimulariam: um sincronizador, decorrente do papel de temporizador circadiano e gerado pela repetição periódica diária e um papel inibidor agudo (mascarador), pois o valor mínimo coincide com o máximo de melatonina circulante.

Em humanos, porém, há poucos estudos que sugiram essa associação entre melatonina e o TAM. Todos os dados que possuímos são indiretos.

Pré-adipócitos derivados de áreas próximas ao TAM de crianças e que mantêm sua capacidade de se diferenciar em adipócitos maduros e de expressar UCP-1, possuem grande expressão de receptores de melatonina MT2, que também estão presentes em adipócitos maduros brancos e marrons¹⁸⁸.

Clinicamente, um estudo com mais de três mil exames de PETs mostrou que a visualização de TAM é maior no inverno (7,2%) do que no verão (2,5%)⁷⁹. Ao invés do frio (pois, durante o exame, os pacientes estavam em ambiente termoneutro), o maior preditor de captação de TAM foi a presença de dias mais curtos, ou seja, com noites mais longas. Como, sabidamente, a secreção de melatonina em humanos é inversamente proporcional à duração do dia¹⁷, o hormônio poderia estar envolvido nesta ativação.

Além disso, indivíduos com critérios diagnósticos para síndrome metabólica costumam cursar com níveis mais baixos de melatonina que controles, e obesos têm massa de TAM menor^{1,4,5,304-306}. Um estudo recente sugeriu que obesos com DM2 possuem pico noturno de melatonina menor do que obesos sem a doença. Embora não se possa inferir uma relação causal, é um dado que merece melhor avaliação³⁰⁶. A ativação do TAM é rapidamente anulada com o uso de betabloqueador, que também inibe a síntese de melatonina pela glândula pineal^{4,265}. Alterações metabólicas também são bem conhecidas em trabalhadores noturnos, que possuem baixas concentrações de melatonina^{307,308}. Um outro interessante e recente estudo não avaliou especificamente a melatonina, mas conseguiu demonstrar, tanto em animais como em humanos, um ritmo circadiano de TAM, com influência importante sobre a glicemia³⁰⁹. Um outro dado indireto

diz respeito a pacientes em uso de antipsicóticos. Muitos deles estão associados a ganho de peso, como clozapina e olanzapina^{310,311}, e embora aumento de apetite seja visto, muito se presume que alguns dos efeitos poderiam ser independentes do consumo energético³¹²⁻³¹⁴. De fato, alguns estudos em roedores associam esses efeitos a uma redução do TAM^{315,316}. Nesse sentido, o achado de que a melatonina atenua o ganho de peso em usuários de antipsicóticos^{204,237,242,317,318} suscita a hipótese de que esse efeito possa ocorrer via TAM.

É interessante ressaltar também que, mesmo em humanos, existem diversos distúrbios e doenças que tendem a se concentrar mais em determinados períodos do ano. O mais clássico é o transtorno afetivo sazonal, já postulado como um estado semelhante à pré-hibernação em mamíferos, com excesso de sono, ganho de peso e desejos incontrolláveis por carboidratos¹²⁶. Além disso, com base em estudos populacionais, sabe-se que existe claramente uma sazonalidade humana em questões como a natalidade³¹⁹ e o infarto agudo do miocárdio³²⁰, por exemplo, não podendo ser descartado um papel da melatonina na ativação de TAM em humanos, como nos animais ditos sazonais.

Considerando a grande transformação demográfica pela qual o mundo passou no século XX, com grandes migrações de áreas rurais para urbanas, houve um aumento importante de indivíduos expostos a uma intensidade de luz noturna maior e por tempo mais prolongado, sendo que, sabidamente, essa luz inibe a produção noturna de melatonina^{16,17,136,321,322}. Mais significativo, porém, são os estudos epidemiológicos que correlacionam a exposição à luz noturna (principalmente de ondas azuis, presentes em *tablets* e luzes de LED) com

ganho de peso em humanos^{15,22,323}. Além da exposição à luz noturna, outra substancial parcela da população está exposta a um nível menor de melatonina. O uso de betabloqueador, como já citado e uma série de substâncias, como cafeína e álcool à noite, podem também interferir com sua secreção^{17,19,324}. Idosos, principalmente após os 55 anos de idade, apresentam queda importante na síntese desse hormônio^{149,150,325}. Pode-se sugerir, portanto, que a menor secreção noturna de melatonina, por diversas razões e situações, poderia interferir no metabolismo do TAM humano e contribuir para a epidemia global de obesidade.

3.4 Métodos de Detecção de Tecido Adiposo Marrom

3.4.1 PET-FDG (tomografia por emissão de prótons marcados com fluorodeoxiglicose realizado em conjunto com tomografia computadorizada [PET-TC] e PET-RM)

O padrão-ouro para avaliação do TAM em humanos é o PET-FDG^{1,5,55}, uma técnica que usa ligantes específicos marcados com isótopos que emitem pósitrons e que monitoram processo *in vivo*, sendo o mais usado o análogo de glicose conhecido como 2-fluorodeoxi-D-glicose (FDG), que permite a avaliação do metabolismo de glicose em tecidos^{326,327}. Como reiterado previamente, foi a difusão desse método que de fato nos trouxe a confirmação da existência de TAM em humanos^{1,328}.

O PET-FDG é um método custoso e trabalhoso que demanda exposição a pequena dose de radiação^{327,328,329}, além de ser um método oneroso. Além disso, a sensibilidade do PET-FDG é muito variável, em consequência de que 90% do substrato do TAM são AGLs e apenas 10% é

glicose, que é o que é utilizado no exame^{55,329}. Em estudos para se avaliar o efeito de substâncias no TAM, porém, o PET-FDG é quase que invariavelmente o método de escolha e, portanto, continua sendo a melhor opção^{112,118,326}.

Deve-se alertar, no entanto, que a ocorrência de exames PET positivos depende muito da exposição prévia ao frio, como mostrado no Quadro 1¹. Assim, o PET-FDG é capaz de avaliar apenas o TAM metabolicamente ativo^{88,329}. Nesse contexto, diversos protocolos de exposição ao frio previamente à realização do exame foram criados, inclusive com o uso de coletes refrigerados e a manutenção dos pacientes em ambientes com temperatura controlada^{88,326,327,329,330}.

É comum o uso concomitante da TC, permitindo, assim, uma fusão de imagens que melhora a sensibilidade do exame em avaliar áreas captantes dentro do tecido adiposo, evitando assim possíveis vieses^{326,329}. Mais recentemente, alguns exames utilizaram a ressonância magnética (RM) ao invés da tomografia computadorizada, também com o mesmo objetivo de facilitar a localização de áreas de tecido gorduroso³³¹⁻³³⁴.

No entanto, indubitavelmente, buscar novos métodos de aquisição menos trabalhosos e menos dispendiosos, que não dependam de radiação e idealmente, que não dependam de estímulo frio, é muito importante^{329,335}.

Outro aspecto fundamental é o método utilizado para detecção de TAM por PET-FDG. Para avaliação de tumores, a principal razão para uso de PET-FDG na prática clínica, normalmente se utiliza os valores padrão de captação (SUV, do inglês, *standard uptake values*) máximo, mas discute-se

que esta não seria a melhor forma de analisar tecidos metabolicamente ativos, pois uma área máxima de captação pode não refletir áreas menores de captação mais baixa, mas metabolicamente importantes^{58,326}. Visto que o TAM não se localiza numa área anatômica única óbvia, inclusive podendo ser encontrado em depósitos de TAB (cujas áreas de células com presença de UCP-1 representariam o tecido bege anteriormente discutido), formas de analisar áreas ativadas em todas as áreas correspondentes à gordura poderão dar dados mais fidedignos, avaliando assim, volume total de TAM, além de atividade total do TAM, que seria o volume multiplicado pelo SUV médio³²⁶. Infelizmente, porém, apenas recentemente vem se propondo formas de uniformizar esses métodos e parâmetros e ainda se encontram dados muito diversos na literatura, alguns avaliando SUV máximo e outros avaliando volume total e atividade³²⁶.

3.4.2 Ressonância magnética

O TAM em humanos também pode ser detectado por RM sem a necessidade do PET-FDG^{329,332,336,337}, uma vez que o TAM possui um conteúdo intracelular e extracelular de água superior ao TAB, aumentando a razão entre água e gordura, além de possuir um conteúdo de ferro aumentado, maior densidade de mitocôndrias e de vasos sanguíneos, levando a um T2 mais baixo³³⁵. A grande vantagem do uso da RM é não empregar radiação^{329,338}. Outra vantagem é que este método permitiria a detecção de áreas de TAM que não dependeriam de atividade. Dessa forma, fatores externos, como temperatura ambiente e protocolos diferentes de

ativação teriam menos influência, permitindo um dado mais uniforme^{326,329,335}. O número de estudos existentes ainda não é suficiente para uma total substituição do PET-FDG^{326,329}. A possibilidade de se juntar o PET com a RM, no caso, com o PET-RM tem a vantagem de permitir a avaliação das imagens pelas formas tradicionais de PET, mas também permite, com a adequada aquisição das imagens, uma comparação com os métodos que se fiam exclusivamente no uso da RM.

3.4.3 Termografia infravermelha (TIV)

Uma outra opção para detectar o tecido adiposo marrom é o uso da TIV, um método não invasivo de avaliação de temperatura corpórea humana, já usado como diagnóstico de condições clínicas tão variadas como dor crônica e pesquisa de focos indeterminados de febre, além de um grande uso em áreas não médicas, como biologia e mesmo engenharia³³⁹⁻³⁴⁵. A grande vantagem da termografia é que se trata de um método rápido, barato e sem nenhum risco para o paciente³⁴⁵. Dados iniciais confirmam que a termografia é capaz de detectar áreas correspondentes a TAM após exposições curtas a temperaturas mais baixas (como por exemplo, após mergulhar as mãos em água gelada por cinco minutos)³⁴⁵. Outros estudos também sugerem que a TIV tem boa reprodutibilidade quando comparada com o PET-FDG após exposição por algumas horas ao frio^{341,344}. O fato de o exame ser dependente do operador constitui uma desvantagem. Além disso, o exame avalia basicamente a temperatura corporal, que pode sofrer influência de diversos fatores, assim como o aumento de temperatura em

uma região pode também significar redução de temperatura em outras regiões. Discute-se se o melhor método de análise seria pela diferença de temperatura entre a região supraclavicular e a região intercostal, ou pela atividade de TAM em região supraclavicular, através de fórmulas matemáticas que levam em conta a temperatura e a área ativada³⁴⁰. Outra dúvida seria a forma de recrutamento do TAM. Symonds *et al.*³⁴⁵ sugeriram uma imersão das mãos em água gelada por apenas cinco minutos, um método bastante fácil e prático. Contudo, existe dúvida se esse método de fato seria suficiente para recrutar o TAM, e mesmo se o estresse sofrido não poderia alterar a temperatura em outras regiões³⁴⁰. Não obstante, a TIV é capaz de analisar o TAM localizado somente em tecidos superficiais, tendo uma limitação para indivíduos com IMC mais alto^{335,341}. Devido a essas imprecisões, um maior número de estudos ainda parece ser necessário para seu uso rotineiro na avaliação do TAM³³⁵.

3.4.4 Marcadores séricos de tecido adiposo marrom: o papel do micro RNA mir92a

A despeito do crescente conhecimento da importância do TAM em humanos, o seu método de detecção, como referido acima, ainda se dá por exames de imagem, de maior ou menor complexidade. Seria fascinante se houvesse um marcador tecidual de TAM. Os estudos com microRNAs sugerem que tal detecção pode ser factível^{346,347}.

MicroRNAs são ácidos ribonucleicos (RNAs) pequenos, de 20 a 24 nucleotídeos, não codificadores, que regulam a expressão proteica de

maneira pós-transcricional, em uma série de tecidos do corpo, com funções no metabolismo, diferenciação celular, inflamação e homeostase energética³⁴⁸. Descrito originalmente em *Caenorhabditis elegans*, os microRNAs são processados de precursores pela Drosha (RNA endonuclease III classe 2). Posteriormente, um dos pares do microRNA é incorporado em complexo nuclease multiproteico e, dependendo de sua complementaridade, os genes podem ser regulados por clivagem ou inibição da translação proteica^{348,349}.

Em relação especificamente ao TAM, é sabido que as células adiposas secretam exossomos, pequenas vesículas lipídicas, de 40 nm a 100 nm de tamanho, que contém RNAs e consistem em uma eficiente rede de mensagem intercelular, e de troca de materiais^{350,351}. Desta forma, os exossomos liberados por diversas células, entre elas, adipócitos marrons (ou beges) presentes no sangue, podem servir de biomarcadores³⁴⁷.

Um elegante estudo confirmou essa hipótese, embora, é claro, precise ser replicado para utilização clínica³⁴⁶. Nesse estudo, diversos microRNAs expressos de maneira diferencial em células adiposas marrons e brancas foram estudados e aquele que obteve maior correlação com atividade do TAM, e que curiosamente foi uma correlação negativa, foi o miR92a. No estudo, a maior atividade de TAM foi associada a uma redução significativa do miR92a, principalmente durante exposição dos animais ao frio. Posteriormente ao estudo em animais, um estudo em humanos foi realizado com 22 indivíduos jovens e magros, que, com base em dados de PET-TC, foram divididos em dois grupos, um grupo com “muito TAM” e outro

grupo com “pouco TAM”. O nível de miR92a foi maior no grupo “baixo TAM” com significância estatística, bem como uma relação significativa entre miR92a e o valor de SUV, a referência dos exames de PET. Em seguida, dez indivíduos foram expostos a dez dias de exposição ao frio e houve uma redução substancial de miR92a. Assim sendo, este pode ser um marcador sérico futuro que auxilie a avaliação terapêutica da ação de substâncias candidatas no TAM.

4 MÉTODOS

4.1 Estudo em Animais de Experimentação

Os procedimentos realizados nesse estudo em animais obedecem aos padrões éticos de experimentação em animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética do ICB-USP. O número do projeto do centro coordenador do ICB-USP é 30460114.5.3001.5467, registrado na Plataforma Brasil.

4.1.1 Divisão dos grupos

Foram utilizados 19 ratos Wistar para a realização dos experimentos, dos quais seis ratos foram escolhidos como controles (C) e 13 ratos foram submetidos à pinealectomia. Os 13 animais submetidos à pinealectomia foram divididos em dois grupos um grupo que recebeu reposição de melatonina na água de beber noturna (PM, seis animais) e um grupo que recebeu água de beber convencional (P, sete animais) por 1 mês, quando realizaram PET-FDG em temperatura ambiente e após exposição ao frio. Um animal no grupo P foi excluído da análise fria por morrer minutos após a realização do exame; um animal no grupo PM foi excluído no exame frio pela ação do anestésico ter cessado durante a realização do exame e ter se movimentado durante o experimento.

4.1.2 Pinealectomia

A pinealectomia foi realizada com anestesia com xilasina e ketamina de 5:3 mL, respectivamente, na dose de 0,15 mL/100 g de peso por via intraperitoneal. A pinealectomia consiste na fixação da cabeça do rato em um suporte para cirurgia estereotáxica, com abertura pequena do escalpo, exposição da sutura lambdoide, perfuração circular do osso, com retirada do disco ósseo, e extração da pineal, localizada abaixo do seio venoso. Na sequência, o disco ósseo é reposicionado novamente em sua posição e é realizada a sutura da pele. Esse procedimento foi realizado costumeiramente em diversos experimentos conduzidos no laboratório do ICB-USP^{177,178,182,194,352}.

4.1.3 Reposição de melatonina

Os animais permanecem em biotério controlado com 12 horas de exposição à luz e 12 horas de escuridão para evitar influência do fotoperíodo. A reposição de melatonina é calculada de acordo com o peso do animal e seu consumo de água no dia com dose de reposição fisiológica de 0,5 mg/kg, calculada com base na ingestão de água do animal no dia anterior. O bebedouro é trocado de 12 em 12 horas, com água durante a exposição à luz e solução de melatonina na escuridão. Os animais que não recebem melatonina tem a água trocada da mesma forma, porém sendo água pura.

4.1.4 PET-TC em temperatura ambiente e após exposição ao frio

Os animais foram avaliados em temperatura ambiente (23°C) como controle, e posteriormente com a exposição ao frio (4°C por 2 horas) com intervalo de 2 dias entre as imagens, ao redor do meio do dia devido ao pico de ativação da gordura conforme publicado na literatura³⁰³.

Para realização da imagem os animais receberam em média 2,474mCi (91,54MBq) de injeção intravenosa de 18F-fluorodeoxiglicose (18F-FDG) com tempo médio de biodistribuição de 1,84 horas. As imagens foram adquiridas no micro-SPECT/PET/CT-LabPET4-Triumph (Gamma Medica - Ideas, Northridge, CA, U.S.A.) utilizando 80 Kvp para aquisição de TC seguido 45 minutos totais (três posições da maca) para aquisição do PET na região de interesse. As imagens de PET foram reconstruídas utilizando-se o algoritmo de reconstrução iterativa MLEM (maximização do valor espectável da máxima verossimilhança, maximum likelihood expectation maximization) considerando-se o campo de visão (FOV, do inglês *field of view*) de 80 mm, matriz de 240x240. As imagens de TC eram reconstruídas com o método de retroprojeção filtrada (FBP), matriz de 512 x 512 e pixel de 0,17 x 0,17 mm. e coregistradas com as imagens de tomografia computadorizada. Ambas as imagens eram exportadas no padrão DICOM para avaliação das regiões de interesse em exames de tomografia por emissão de prótons (ROI, do inglês *regions of interest*) com base nas imagens anatômicas e aplicadas nas imagens funcionais. A quantificação das imagens de PET foi realizada por médico nuclear especializado, a partir dos valores obtidos das ROIs já corrigidos para kBq/mL e o SUV máximo era calculado para cada ROI da amostra.

O dado analisado mais importante foi o SUV máximo em temperatura ambiente, após exposição ao frio e a razão de aumento do quente para o frio (análise pareada).

4.1.5 Análise de expressão de RNA de UCP-1

Após o fim dos experimentos os animais foram sacrificados após uma semana e o TAM interescapular foi extraído para análise de UCP-1. Nesse momento, além dos três grupos citados, um outro grupo de controles com suplementação de melatonina, cujo protocolo de reposição foi idêntico ao do grupo PM, foi adicionado para análise.

Para a extração do RNAm, o TAM interescapular foi mantido em gelo seco, e homogeneizado em 1 mL de Trizol[®] *Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com o auxílio de um *Polytron* (Kinematica, EUA). Depois adicionou-se em cada amostra 200 µL de clorofórmio e as amostras foram submetidas a homegeneização no Vortex-Genie 2 (*Scientific Industries*, EUA) e centrifugadas (5417R, *Eppendorf*, Alemanha) durante 15 minutos a 4°C a uma velocidade de 12.000 G (constante gravitacional) quando houve a transferência para uma nova série de tubos *Eppendorfs*[®]. Adicionou-se 500 µL de isopropanol e uma nova centrifugação foi realizada durante 20 minutos a 4°C à velocidade de 12.000 G, para a formação do precipitado. Após a centrifugação eliminou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 1 mL de álcool etílico gelado a uma concentração de 75% com nova centrifugação. Após esse período, adiciona-se em cada amostra 20 µL de H₂O deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para dissolução do precipitado e armazenadas a -80°C até a realização do tratamento com DNase.

Após a extração de RNA, as amostras foram tratadas com DNase utilizando-se o kit Turbo DNA-free™ (*Ambion*, Austin, TX, EUA). Adicionou-se a enzima Turbo DNase e Tampão Turbo DNase e procedeu-se a nova centrifugação. Após adição de 2 µL do reagente de inativação do kit e nova centrifugação por 1,5 minuto na velocidade de 10.000 G. O sobrenadante foi então transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs® e o precipitado foi 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.

Em seguida obteve-se o DNA complementar (cDNA), por reação de transcriptase reversa, com kit *SuperScript™ III Antisense Transcriptase* (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA) e adição de 1 µL de dNTP mix e 1 µL de *random primers*. As amostras foram a seguir colocadas em termociclador *MyGene™ Series Gradient Thermal Cycler* (*LongGene®*, EUA) e armazenadas a -20°C.

A análise quantitativa da expressão gênica foi então realizada através da técnica de reação de cadeia de polimerase de transcriptase reversa (PCR) em tempo real utilizando o aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System®* (*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 dê a característica de flanquearem um íntron (*intron-spanning*), o que impossibilita a amplificação de DNA genômico.

Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: a) etapa inicial de ativação da enzima a 50°C por 1 minuto e 95°C por 10 minutos, b) 40 ciclos que incluem 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 c) um ciclo para análise do *melting* (fusão) que consiste 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*.

4.1.6 Análise estatística

As variáveis contínuas foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de distribuição normal. A comparação dos valores de médias entre os animais sem e com tratamento foi realizada através do teste t para amostras independentes. Foi avaliada a resposta do TAM, analisado por SUV máximo, comparando os três grupos dois a dois, em temperatura ambiente, após exposição ao frio e a razão de incremento entre o frio e o quente.

Em relação à análise de UCP-1, como há um quarto grupo, foi utilizado também o teste ANOVA para análise de diferença entre as

amostras, além da comparação dois a dois entre os diferentes grupos. Utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 7 e foi considerado como estatisticamente significativos níveis de $p < 0,05$.

4.2 Estudo em Humanos

O estudo em humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética do ICB-USP e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O número do projeto aprovado no ICB-USP é 30460114.5.3001.5467, e do HCFMUSP, com emenda, é 30460114.5.0000.0068. Ambos estão registrados na Plataforma Brasil. Os pacientes que foram recrutados foram aqueles que receberam e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMUSP.

4.2.1 Recrutamento

A partir de base de dados do HCFMUSP foram recrutados pacientes que realizaram nos últimos 10 anos (contados a partir do início do recrutamento dos pacientes) pinealectomia cirúrgica ou radioterapia de região pineal, para o tratamento de tumores de glândula pineal. O objetivo foi encontrar um grupo de indivíduos com deficiência absoluta de melatonina. A partir de base de dados do Instituto de Psiquiatria e do Instituto da Criança dados de 18 pacientes foram encontrados.

Desses 18 pacientes, três haviam falecido, quatro não foi possível contato pois os dados não estavam atualizados, e quatro recusaram a

participação. Dos sete pacientes contatados e que iniciaram o estudo, dois abandonaram o projeto, um após recusar-se a assinar o termo de consentimento informado, e outro por seguimento e acompanhamento irregular. Desse modo, foram avaliados cinco pacientes.

Um dos pacientes apresentava um tumor infiltrativo em região de transição bulbomedular, apresentando-se com tetraparesia espástica e sinais, descritos em evolução médica, de disautonomia, como síndrome de Horner. Como discutido na introdução, o efeito principal da melatonina sobre o TAM se dá por via simpática, e que inclusive a ação direta da melatonina no TAM possa ser inibitória³⁰, optou-se por excluir esse paciente da análise principal, mas, uma vez que o número total de pacientes foi pequeno, o procedimento foi realizado antes e após a reposição de melatonina também nesse paciente.

A seguir serão descritas rapidamente as características mais importantes de cada um dos pacientes.

4.2.2 Descrição dos pacientes

Paciente 1

Rapaz de 16 anos com lesão em pineal em 2010, após quadro de cefaleia, vômitos e anorexia. Realizou biópsia estereotáxica de pineal em 2010 com diagnóstico de disgerminoma. Posteriormente foi submetido a quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) da lesão pineal. Teve boa evolução, fazendo acompanhamento oncológico, sem dano de eixo hipofisário, sem necessidade de uso de medicações. Dados medidos no início do protocolo: peso de 54,2 kg, altura de 1,67 m, IMC de 19,3 kg/m².

Paciente 2

Rapaz de 19 anos com diagnóstico de tumor de pineal em 2013, após quadro de enxaqueca, vômitos e paresia em língua. Foi submetido a dois procedimentos cirúrgicos em 2013, dois ciclos de QT e 31 ciclos de RT, além de quatro transplantes autólogos de medula óssea. O resultado do exame anatomopatológico da lesão foi pineoblastoma grau IV. Evoluiu com estrabismo, sem prejuízo do eixo hipofisário e sem necessidade de tratamento com medicações. Dados medidos no início do protocolo: peso de 55,7 kg, altura de 1,59 m e IMC 22,03 kg/m².

Paciente 3

Homem de 20 anos, com diagnóstico de hidrocefalia em 2014 após crises convulsivas, realizou cirurgia para passagem de cateter de derivação ventrículo-peritoneal, sendo visualizada uma lesão na glândula pineal. Não foi submetido a procedimento cirúrgico, mas a 25 sessões de RT e a nove sessões de QT. Evoluiu com quadro de pan-hipopituitarismo e *diabetes insipidus*, além de quadro depressivo moderado, fazendo uso dos seguintes medicamentos: levotiroxina 100 mcg, omeprazol 20 mg, hidrocortisona 20 mg pela manhã e 10 mg à tarde, fenitoína 20 mg, colecalciferol 25 gotas 1 x semana, desmopressina 0,1 mg cedo, 0,5 mg à tarde e 0,1 mg noturno, cipionato de testosterona 200 mg a cada 15 dias, amitriptilina 25 mg. Ele faz acompanhamento em serviço de Endocrinologia e suas dosagens hormonais encontram-se adequadas. Dados medidos no início do protocolo: peso de 76,0 kg, altura de 1,63 m e IMC de 28,6 kg/m².

Paciente 4

Homem de 32 anos com diagnóstico de tumor pineal em 2007, antecedido de quadro clínico de cefaleia e perda de peso. Foi submetido a cirurgia com retirada parcial do tumor em 2008, com diagnóstico de germinoma, seguido com uma sessão de radiocirurgia e 20 sessões de RT, sem comprometimento do eixo hipofisário. Apresenta hipotireoidismo primário, em tratamento com levotiroxina 50 mcg com níveis de TSH dentro da faixa de normalidade. Dados medidos no início do protocolo: peso 98,5 kg, altura de 1,80 m, com um IMC de 30,4 kg/m².

Paciente 5 (excluído da análise final)

Homem de 22 anos que teve diagnóstico de tumor pineal em 2011, após quadro de cefaleia e perda de consciência. Teve um diagnóstico presumido de germinoma por exame de imagem e não realizou cirurgia, mas quatro sessões de QT e duas de RT. Em 2014 apresentou quadro de perda de força nos membros inferiores, e depois os exames de imagem confirmaram invasão tumoral da transição bulbomedular até região de C2-C3 com sinais clínicos de síndrome de Horner (disautonomia), sendo submetido a mais 20 sessões de RT e quatro de QT. Atualmente, com dupla hemiparesia espástica com força grau III proximal e distal. Apresenta pan-hipopituitarismo, em tratamento com levotiroxina 100 mcg, baclofeno 30 mg/d, omeprazol 20 mg, hidrocortisona 10 mg 2x/d, carbonato de cálcio 500 mg, DDAVP 0,1 mL dia, sinvastatina 20 mg, cipionato de testosterona 200 mg/mês. Ele faz acompanhamento em serviço de Endocrinologia e suas dosagens hormonais encontram-se adequadas. Dados medidos no início do protocolo: peso aproximado de 90 kg, refere estatura de

1,80 m, com IMC calculado de 27,7 kg/m² (paciente só consegue realizar pesagem em maca especial).

4.2.3 Coleta e dosagem de melatonina salivar

Os cinco pacientes foram internados durante um período de 36 horas (para realização de alguns exames vinculados a outro projeto) e na internação colheram saliva para dosagem da melatonina salivar de 3 em 3 horas, das 19:00 horas do dia da internação até às 22:00 do dia seguinte, com o objetivo de determinar se a pinealectomia cirúrgica, quimioterápica ou radioterápica manteve algum ritmo circadiano de produção. A saliva foi centrifugada por 2 minutos e conservada em geladeira e mantida em freezer a -80°C. Posteriormente, as dosagens foram realizadas pelo método ELISA usando o kit *Melatonin Direct* Saliva ELISA (IBL *International* GBMH) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.4 Coleta de exames de sangue

Os pacientes realizaram coletas de exames de sangue antes do início do protocolo de exposição ao frio (ver abaixo). Foram colhidos colesterol total e frações (HDL-c, LDL-c, VLDL-c), triglicérides, hemoglobina glicada e glicemia. Todos estes exames foram realizados no Laboratório Central do HCFMUSP, pelo mesmo método e realizados com jejum de 12 horas. O colesterol total, triglicérides e HDL foram medidos pelo método enzimático colorimétrico, o VLDL-colesterol pela fórmula de Martin e o LDL-colesterol

calculado pelas fórmulas de Friedewald e Martin. A glicemia foi medida pelo método da hexoquinase e a Hemoglobina Glicada pelo método de HPLC.

4.2.5 PET-RM

Todos os exames foram realizados no Serviço de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HCFMUSP. Antes da injeção do radiofármaco os pacientes permaneceram em jejum por no mínimo 6 horas. O nível de glicemia foi verificado antes da injeção do radiofármaco devendo estar de 180 mg/dL.

Os pacientes foram colocados em uma sala resfriada, com roupas leves, ar condicionado ligado a 18°C e vestiram um colete resfriado (Polar Products Inc., Ohio, USA), mantido à temperatura de 14°C. Na ocorrência de tremor, a temperatura era aumentada gradualmente até que o tremor cessasse. O método reproduziu outros protocolos já descritos em literatura^{115,351,352}.

Após uma hora, os pacientes receberam injeção intravenosa de 0,12 mCi/kg de 18F-FDG, permanecendo no ambiente resfriado por mais uma hora, momento em que foram posicionados no equipamento PET-RM (General Electric, modelo SIGNA PET/MR) com diâmetro interno de 60 cm e campo de 3.0 Tesla, para realização das sequências adequadas de RM com aquisição simultânea do PET com bobina de corpo e correção de atenuação. Os pacientes foram posicionados em decúbito dorsal e membros superiores junto ao corpo, as imagens foram realizadas da tenda do cerebelo até a região infrarrenal com número de posicionamentos variável com a anatomia do paciente.

As imagens foram adquiridas em um equipamento híbrido de PET-RM da marca - Signa PET/MR 750w - 3.0 T (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA), com Software Release MP24, gantry de 60 cm, FOV de 50 cm, detectores PET do tipo LYSO com tecnologia de silício (SiPM) - (28 módulos, 20 blocos e 36 cristais) e matriz 256 x 256 cm com técnica *time of flight* (TOF) em modo de aquisição 3D. Sensibilidade relativa dos detectores de 21 cps/kBq. As imagens de PET foram reconstruídas com o método de reconstrução iterativa OSEM (duas interações e 28 subgrupos), algoritmo de processamento padronizado (VUE Point FX), suavizadas com filtro gaussiano: Sharp IR e *cutoff* (5 mm). Os dados foram corrigidos para espalhamento e decaimento radioativo.

Foram realizadas imagens axiais de RM simultaneamente às imagens de PET para correção de atenuação usando a técnica DIXON (MRAC). Foram realizadas imagens coronais de RM sequencialmente, após término da aquisição do PET, para quantificação da fração de gordura do parênquima hepático usando a técnica IDEAL IQ™: FATFRAC. As sequências LAVAFLEX™ com as decomposições WATER, FAT, INPHASE e OUTPHASE foram usadas para localização extra-hepática do TAM ativado em correspondência às áreas de aumento do metabolismo glicolítico em grau discreto a acentuado e com distribuição focal ou difusa com aspecto de distribuição e captação característicos nas imagens do PET-FDG (TAM ativado). Estas imagens foram usadas posteriormente para auxiliar na segmentação, em *software* específico, na determinação do TAM ativado pelo PET (padrão ouro), evitando-se áreas de concentração fisiológica do radiofármaco tais como: glândulas salivares, músculos, linfonodos, parênquima e vias excretoras renais.

Foram utilizadas bobinas específicas para o dorso (Central Imaging Array [CMA]), unidade de cabeça e pescoço (HNU - *Head Neck Unit*) e bobina anterior e superior do corpo (*Upper Anterior Abdominal* [UAA]) de 12 canais. Todos os pacientes foram orientados a realizar a apneia em expiração durante a aquisição das imagens de tórax/abdome. As matrizes usadas na aquisição das imagens foram as seguintes: na sequência coronal IDEAL IQ™: matriz 224 x 160 mm e FOV de 50 cm; na sequência coronal LAVAFLEX: matriz 256 x 224 mm e FOV de 50 cm.

Foram realizadas várias sequências RM redundantes neste protocolo, no intuito de conseguir uma sequência que pudesse identificar o TAM nas imagens de RM sem o auxílio do PET, porém que não foi possível analisar até o fim do protocolo e por isso não serão citadas no método. Porém, serão úteis em um projeto futuro para a determinação da gordura marrom ativada usando apenas as sequências de ressonância sem a necessidade do PET.

A sequência inicial de RM adquirida simultaneamente e empregada para correção de atenuação das imagens PET foi a MRAC - Dixon - LAVA FLEX (coronal e axial) modificado do pescoço até o abdome superior. As demais sequências adquiridas de RM foram: PET-RM com MRAC - Dixon - LAVA FLEX (coronal e axial) modificado do pescoço até abdome superior; sequência *In phase* e *Out phase* (coronal e axial) do pescoço até abdome superior; sequência IDEAL IQ (coronal e axial) do pescoço até abdome superior; sequência *In phase* e *Out phase* (axial) do fígado com trigger respiratório; sequência IDEAL IQ (axial) do fígado com *trigger* respiratório e espectroscopia *single voxel* do fígado.

4.2.6 Processamento e análise das imagens

O processamento foi realizado empregando o *software* aberto AMIDE por médico especialista em medicina nuclear (Amide Medical Imaging Data Examiner <http://amide.sourceforge.net/packages.html>).

As etapas seguidas para a avaliação do TAM ativado foram: a) segmentação automática do tecido adiposo pela sequência "FAT MRAC" ou "lavaflex " da RM (sendo utilizado como nível de corte para delimitação de áreas de tecido adiposo os tecidos com sinal acima de 250); b) subtração da atividade na pelve renal das imagens PET por meio de região de interesse definida manualmente com objetivo de excluir áreas de atividade urinária sobrepostas erroneamente ao tecido adiposo identificado pela RM na pelve renal; d) cálculo dos volumes e das atividades de TAM dentro do segmento de tecido adiposo identificado pela RM, caracterizado pela atividade com nível de corte de SUV acima de 2,0 e acima de 1,5. Os valores apresentados na análise principal serão aqueles com $SUV > 2,0$. No anexo, serão apresentados os valores com $SUV > 1,5$. Os exames foram realizados antes e 3 meses após suplementação com melatonina 3 mg.

Os principais parâmetros de análise foram o volume de TAM ativado (gordura com atividade acima do limiar estabelecido); a atividade total de TAM ativado (volume multiplicado pelo SUV médio de TAM ativado) gordura total no segmento adquirido.

No fígado os parâmetros de deposição de gordura foram analisados com a sequência Ideal IQ™: FATFRAC.

O software PMOD foi utilizado apenas como visualizador das imagens e não para processamento. Para quantificação da gordura hepática foi utilizado o software Ready View™ (GE Healthcare).

A escolha do software AMIDE para análise computadorizada dos dados de PET-RM foi feita pela equipe do Instituto de Medicina Nuclear, com base em experiência própria com publicações com essa técnica^{353,354}. Como os dados obtidos foram computadorizados, não foi medido o SUV máximo, que necessita análise visual.

4.2.7 Termografia infravermelha

Os pacientes realizaram também termografia infravermelha (TIV) antes e após 5 minutos de exposição ao frio através de colocação das mãos em água gelada, conforme o protocolo de Symonds *et al.*³⁴⁵ na mesma semana em que o PET-RM foi feito. A técnica consiste em posicionar o paciente sentado em uma cadeira na posição vertical com a cabeça em posição neutra olhando para a frente. A porção superior da região do tórax e a região do pescoço devem ficar expostas. O aparelho utilizado foi uma câmera infravermelha (SC640 *FLIR Systems*, Boston, MA, EUA) com sensibilidade térmica de 30 mK e resolução de 640x480 pixels para obter imagens da cabeça, pescoço anterior e região superior do tórax. A câmera foi posicionada na altura do pescoço a um metro do indivíduo.

Usando o programa *ThermaCAM Researcher 2.9 (FLIR Systems*, Boston, MA, EUA), a temperatura da pele sobre a espaço supraclavicular, do olho (temperatura máxima do canto medial do olho) e de uma área controle

obtida na parte superior do tórax próximo ao esterno (segundo espaço intercostal) foi analisada em cada imagem obtida. As análises foram realizadas comparando as temperaturas superficiais corpóreas das regiões contralaterais supraclavicular (SCL), olhos, pescoço e região controle e foi utilizado o valor de 0,98 para a emissividade, valor padrão para obtenção da temperatura da pele humana por meio de sensor infravermelho.

Foram analisados a variação de temperatura entre as regiões SCL (esquerda e direita) e a região intercostal (IC) média, assim como a atividade de energia de calor do TAM medida em watts (W) (a atividade de energia de calor do TAM será referida a partir de agora como atividade do TAM), ao aplicar a lei de Stefan-Boltzmann (ver abaixo)³⁴⁰.

$$\text{Atividade do TAM (W)} = \varepsilon \times \sigma \times A \times T^4$$

Onde: ε : emissividade (0,98 para a pele humana)
 σ : constante de Stefan-Boltzmann ($5,676 \times 10^{-8} \text{ W/m}^2 \text{ K}^4$)
 A : região de interesse (ROI) em m^2 (baseado em número de pixels pelo programa ImageJ)
 T : temperatura do ROI medido em Kelvin³⁴⁰

4.2.8 Reposição de melatonina

Os pacientes receberam 108 comprimidos de melatonina, na dose de 3 mg, produzidos pelo laboratório Aché. Os pacientes foram orientados a tomar um comprimido por dia 30 minutos antes do horário habitual de deitar, com um copo d'água, por 3 meses, e foram orientados a devolver as caixas de melatonina para uma contagem das pílulas no sentido de analisar a adesão.

4.2.9 Análise estatística

A comparação entre as médias antes e após suplementação com melatonina foi realizada através do teste t pareado. Foi utilizado o teste unicaudal para análise do TAM e dos lípidos, visto que há dados de literatura que sugerem a direção da presente intervenção. Para identificar correlações entre as variáveis, que serão discutidas ao longo do texto, foi utilizado teste de correlação de Pearson. Devido ao tamanho amostral pequeno, não foi possível verificar a normalidade dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo em Animais

Inicialmente, foi avaliada a efetividade do protocolo escolhido para ativação do TAM após estímulo frio. Nos três grupos expostos ao frio: controle (CF), pinealectomizado (PINX) repostado com melatonina (PMF) e PINX sem reposição (PF), houve claro e significativo aumento do SUV máximo comparado com o exame realizado em temperatura ambiente: grupo controle (CQ), PINX repostado com melatonina (PMQ) e PINX sem reposição (PQ) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - SUV Máximo ($\times 10^4$) de animais que realizaram os experimentos em ambas as condições, em todos os grupos

CQ: Controle à temperatura ambiente; CF: Controle exposto ao frio; PQ: PINX à temperatura ambiente; PF: PINX exposto ao frio, PMQ: PINX com melatonina à temperatura ambiente; PMF: PINX com melatonina exposto ao frio.

Test t pareado: CQ *versus* CF - $p=0,00142^*$; PQ *versus* PF - $p=0,0128^*$; PMQ *versus* PMF - $p=0,0284^*$.

* Estatisticamente significativo.

Uma vez demonstrada a efetividade do protocolo de esfriamento, foram comparados a seguir os grupos isoladamente, avaliando o SUV máximo na temperatura ambiente, no frio e a razão do aumento entre as duas temperaturas.

Os Gráficos 2 e 3 mostram o SUV máximo dos exames dos três grupos, à temperatura ambiente e após exposição ao frio, e o Gráfico 4 documenta a razão de aumento do SUV após frio em comparação ao procedimento à temperatura ambiente.

Gráfico 2 - SUV Máximo ($\times 10^4$) à temperatura ambiente

C: Controle; PM: PINX com melatonina; P: PINX sem melatonina.

Controle *versus* PINX Melatonina - $p=0,43$; Controle *versus* PINX sem melatonina - $p=0,0642$; PINX melatonina *versus* PINX sem melatonina $p=0,24$.

Gráfico 3 - SUV Máximo ($\times 10^4$) após exposição ao frio

C: Controle; PM: PINX com melatonina; P: PINX sem melatonina.

C *versus* PM - $p=0,36$; C *versus* P - $p=0,27$; PM *versus* P - $p=0,063$.

Gráfico 4 - Razão de incremento do SUV Máximo do exame após exposição ao frio/Exame à temperatura ambiente

C: Controle; PM: PINX com melatonina; P: PINX sem melatonina.

C versus PM - $p=0.93$; C versus P - $p=0,018^*$; PM versus P - $p=0,00284^*$.

*Estatisticamente significativo.

Na Tabela 1, encontra-se os valores médios e o desvio-padrão de cada um dos grupos experimentais.

Tabela 1 - Valores médios e desvio-padrão de todos os seis modelos experimentais

	Controle (C)	PINX com melatonina (PM)	PINX sem melatonina (P)
SUV Máx Quente $\times 10^4$	18,96 $\pm$ 7,81	22,6 $\pm$ 6,54	27,7 $\pm$ 7,49
SUV MáxFrio $\times 10^4$	152,5 $\pm$ 75,03	198,6 $\pm$ 90,06	114 $\pm$ 33,69
Razão de incremento	8,51 $\pm$ 3,13	8,69 $\pm$ 3,87	4,34 $\pm$ 1,27

SUV: Valor padrão de captação dos exames de PET.

Embora não tenha havido diferenças estatísticas entre os grupos nas análises isoladas, houve uma tendência do grupo pinealectomizado sem melatonina possuir maior SUV máximo em temperatura ambiente quando comparado ao grupo controle. O oposto ocorre após exposição ao frio, onde

o grupo pinealectomizado com melatonina apresentou uma tendência ($p=0,063$) de níveis mais altos de SUV máximo, em comparação com o grupo pinealectomizado não repostado. A resposta diferencial entre os grupos só pode ser especulada, porém, devido à ausência de significância estatística, uma discussão mais aprofundada sobre as hipóteses possíveis não será feita, sendo possível que a diferença seja devido ao acaso. De toda forma, é possível que com um n maior, fossem encontradas diferenças estatísticas, ao observar o padrão do gráfico de SUV após exposição ao frio, que sensibiliza o método e vai de acordo com os dados de expressão de UCP-1 que serão apresentados adiante.

Com relação ao Gráfico 4, o parâmetro utilizado foi a razão de resposta do TAM do estímulo frio sobre o estímulo quente. Nesse importante quesito, isto é, a capacidade termogênica após um estímulo agudo, foi alcançada significância estatística, conforme a hipótese.

Avaliando esse parâmetro, foi notado que tanto o grupo C como o PM apresentou aumento de ativação de TAM ao estímulo frio comparado ao grupo P. Desta forma, a melatonina aparenta ter um papel fundamental na ativação do TAM durante um estímulo agudo.

Após o sacrifício dos animais, foi analisada de expressão de RNAm de UCP-1, com resultados também bastante interessantes (Gráfico 5), em região interescapular. Conforme explicitado nos métodos, um grupo controle repostado com melatonina (CM) foi adicionado, referente a um outro experimento (esse grupo não realizou PET-TC e por isso não foi avaliado anteriormente). Houve diferença estatística, utilizando-se o teste ANOVA, e

nas comparações dois a dois, houve diferença estatística entre todos os grupos, com exceção da comparação do grupo melatonina repostado com o grupo pinealectomizado repostado. No gráfico da comparação do grupo CM com o PM, fica claro que a reposição de melatonina, tanto em animais pinealectomizados como em controles, aumenta a expressão total de UCP-1. Além disso, a diminuição no grupo P, em comparação com o grupo C vem em consonância com a hipótese formulada. O aumento do grupo PM em relação ao grupo controle não era *a priori* esperado, visto que o objetivo da suplementação de melatonina nesse grupo era atingir concentrações fisiológicas e não suprafisiológicas. Porém, é claro que o consumo de melatonina pela água de beber noturna não reproduzirá fidedignamente o ritmo circadiano próprio do animal, atingindo picos maiores após a ingestão, por exemplo. É possível, portanto, que essa diferença se dê por uma diferença entre a suplementação exógena e o ritmo circadiano próprio do animal. É importante ressaltar também que a expressão de RNA de UCP-1 não implica maior termogênese e sim maior capacidade termogênica, que pode ou não ser utilizada, de acordo com o estímulo. Nesse contexto, a semelhança de resposta entre o grupo C e o PM no exame de PET pode ser explicada pela dimensão do desafio (pode-se supor que um desafio ao frio ainda mais intenso, ou mais duradouro, levasse a uma resposta maior do grupo PM), embora não seja possível descartar que, no caso de um *n* maior, poderia haver diferenças entre esses dois grupos na resposta ao PET, mesmo com o desafio ao frio proposto.

Deve-se lembrar que os animais foram sacrificados à temperatura ambiente, ao redor de 21°C. Dessa forma, os dados de expressão de RNA poderiam ter sido muito distintos caso o sacrifício tivesse sido feito a 4°C, quando fizeram o PET-TC, ou mesmo se os animais estivessem em termoneutralidade.

Gráfico 5 - Expressão de UCP-1 (RNA) em região interescapular (IE)

Teste ANOVA: $p < 0,0001$

Controle vs Controle melatonina: $p = 0,0033^*$

Controle vs PINX: $p = 0,00317^*$

Controle vs PINX melatonina: $p < 0,0001^*$

Controle melatonina vs PINX: $p < 0,0001^*$

Controle melatonina vs PINX Melatonina: $p = 0,207$

PINX vs PINX melatonina: $p < 0,0001^*$

HK: *House keeping genes*

*Estatisticamente significativo

É importante ressaltar que expressão de RNA não necessariamente significa uma termogênese maior, por si só, visto que o RNA pode ser expresso, porém a não ocorrência de eventos pós-transcricionais pode não levar à correta expressão proteica da enzima, ou mesmo, pode levar à expressão sem ser ativada³⁵⁵.

5.2 Estudo em Humanos

5.2.1 Níveis de melatonina ao início do experimento e análise de adesão

Os quatro pacientes da análise principal e o paciente cinco tiveram seus níveis de melatonina salivar coletados durante internação. Dois pacientes tiveram níveis de melatonina indetectáveis em todas as amostras, três pacientes tiveram níveis muito baixos de melatonina, uma em duas amostras e duas em apenas uma amostra. Chama a atenção que, nos dois pacientes com apenas uma amostra detectável, isso ocorreu durante a fase ativa do dia, demonstrando que estes pacientes também não apresentam padrão de secreção circadiano. Abaixo está a descrição do nível de melatonina de cada paciente.

Paciente 1: 8 de 10 amostras com níveis de melatonina indetectáveis.

Amostra com maior dosagem: 1 pmol/L às 22:00 horas.

Paciente 2: 10/10 amostras com níveis de melatonina indetectáveis.

Paciente 3: 10/10 amostras com níveis de melatonina indetectáveis.

Paciente 4: 9/10 amostras com níveis de melatonina indetectáveis.

uma amostra: 1,46 pmol/L, às 13:00 horas.

Paciente 5: 7/8 amostras com níveis de melatonina indetectáveis

(duas amostras não foram coletadas). uma amostra:

1,78 pmol/L, às 16:00 horas.

Com esses dados, pode-se concluir que no presente estudo os pacientes se enquadram dentro do previsto no projeto como tendo deficiência absoluta de melatonina, com níveis bem abaixo ao que é relatado na literatura^{150,160}.

Após os 3 meses de tratamento, os pacientes trouxeram as caixas de melatonina usadas. Os cinco pacientes apresentaram adesão de mais de 90%, o suficiente para considerar os dados fidedignos.

Não houve relatos de eventos adversos e todos os pacientes relataram melhora da qualidade do sono e concentração diária (dados referentes a outro projeto de pesquisa vinculado ao Projeto Temático).

5.2.2 Tecido adiposo marrom por PET-RM

Houve aumento do volume de TAM nos quatro pacientes (utilizando como parâmetro um SUV acima de 2,0) (Tabela 1 e Gráfico 6), ($p=0,0357$). Utilizando o SUV acima de 1,5 (maior sensibilidade às áreas de gordura com ativação) também foi encontrada significância estatística ($p=0,0399$, Anexo A e B). A trajetória individual dos pacientes encontra-se demonstrada no Gráfico 7. É importante notar que, embora exista uma considerável variabilidade de captação entre indivíduos, houve aumento em todos.

O mesmo padrão ocorreu com o dado de atividade total, calculado multiplicando-se o volume pelo SUV médio de captação ($p=0,0279$) (Tabela 2 e Gráfico 8). Houve aumento nos quatro indivíduos, com a maior diferença sendo visível no paciente 1, com um aumento de 3,12 vezes (Tabela 2 e Gráfico 9). Ao se analisar áreas com $SUV>1,5$, também ocorreu significância estatística, com $p=0,0319$ (Anexo A e C).

Tabela 2 - Dados de TAM (volume total e atividade total medida pelo volume x SUV médio e a razão de incremento após suplementação com melatonina) por PET-RM dos 4 pacientes da análise principal, considerando um limiar de SUV de 2,0

	Volume total de TAM (mL)		Razão de incremento
	Basal	Pós-mel	
Paciente 1	31,7	107	3,37
Paciente 2	565	657	1,16
Paciente 3	173,8	265,6	1,5
Paciente 4	112,5	328,4	2,9
Média e DP	220,7 ± 236,76	370,56 ± 231,26	2,23 ± 1,06
	Atividade total de TAM (mLxSUV médio)		Razão de incremento
	Basal	Pós-mel	
Paciente 1	106	331	3,12
Paciente 2	2748	3053	1,11
Paciente 3	520	701,9	1,34
Paciente 4	289,3	838,1	2,89
Média e DP	915,8 ± 1233,13	1231 ± 1233,42	2,11 ± 1,03

Pós-mel: Pós-melatonina, DP: Desvio-padrão

Gráfico 6 - Volume de TAM pré e pós-melatonina (SUV >2,0), em mL

Test t pareado $p=0,0357^*$

*Estatisticamente significativo

Gráfico 7 - Trajetória individual do volume de TAM dos pacientes antes e após melatonina

Gráfico 8 - Atividade total de TAM pré e pós-melatonina (SUV máximo > 2,0) (volume x SUV Médio)

Test t pareado $P=0,0279^*$.

*Estatisticamente significativo.

Gráfico 9 - Trajetória individual da atividade de TAM dos pacientes antes e após melatonina

A média de aumento de volume foi de 2,23 vezes, e de atividade total de TAM de 2,15 vezes. A maior resposta (Figura 6) foi a do paciente 1, com aumento de volume e atividade de 3,37 e 3,12, respectivamente, e a menor resposta, a do paciente 2, com um aumento de volume e atividade de 1,16 e 1,11, respectivamente. É interessante notar que o paciente 2 foi, de longe, o que mais apresentou captação na primeira e na segunda imagem, sugerindo que o paciente possui boa capacidade de captação de TAM mesmo sem produzir melatonina.

Figura 6 - Imagens de PET-RM do paciente 1 antes e após a suplementação de melatonina. Note as áreas de ativação correspondentes a TAM principalmente em região supraclavicular e cervical

Como há dados de literatura que demonstram aumento de visualização de PET pelo TAM no inverno, e é lógico imaginar que em dias frios a captação seja maior, o gráfico de foi refeito acordo com o dia mais quente e o dia mais frio na realização dos exames.

Como pode ser visto no Gráfico 10, a correlação entre o volume de TAM comparando o dia mais quente com o dia mais frio foi não estatisticamente significativa ($p=0,26$). Nota-se, porém, que o paciente 1 foi o único que realizou o segundo exame em um dia mais frio que o primeiro e foi o paciente que apresentou a maior resposta. Não se pode, portanto, excluir que parte da resposta acentuada seja por conta da diferença de temperatura nesse paciente. Por outro lado, o fato dos demais pacientes terem apresentado aumento de volume mesmo com temperaturas ambientes mais altas, pode nos fazer supor que, estando essa variável totalmente

controlada (o que é muito difícil quando se trata de temperatura ambiente), a resposta poderia ter sido ainda maior. O Quadro 3 possui a temperatura ambiente média na manhã do exame.

Quadro 3 - Temperatura média do ambiente na manhã do exame

Temperatura média na manhã do exame	Pré-melatonina	Pós-melatonina
Paciente 1	19,5°C	12°C
Paciente 2	17°C	18°C
Paciente 3	17,5°C	26°C
Paciente 4	16,5°C	24,5°C

Fonte: <http://www.timeanddate.com>

Gráfico 10- Volume de TAM analisando a temperatura no dia do exame (SUV máximo>2,0), em mL

Test t pareado $p=0,2679$

5.2.3 Análise de gordura hepática por RM

Embora não fosse o ponto principal da presente análise, como os pacientes realizaram RM em conjunto com o PET, e há dados de literatura que sugerem um papel da melatonina em reduzir a gordura hepática, foi feita análise de gordura hepática medida por RM.

Como demonstrado no Gráfico 11, não houve qualquer padrão evidente de redução de gordura hepática, com dois pacientes apresentando aumento e dois pacientes apresentando redução. O paciente que sofreu aumento mais significativo foi o paciente 3, que já apresentava alto grau de gordura hepática e possui pan-hipopituitarismo. Sabe-se que o tempo de intervenção (3 meses) é curto e pouco se pode dizer sobre o efeito da melatonina no longo prazo. Porém, os dados deste estudo não apontam, nem mesmo sugerem, qualquer efeito da melatonina sobre o conteúdo de gordura hepática.

Gráfico 11 - Fração de gordura hepática (em %) medida por RM (método FAT Frac)

p=0,485

5.2.4 Exames laboratoriais

O Quadro 4 mostra os exames dos pacientes antes e após a intervenção com melatonina e os Gráficos 12 e 13 mostram a trajetória individual de colesterol total e triglicérides dos quatro pacientes.

Quadro 4- Exames laboratoriais dos pacientes antes e após a intervenção com melatonina

	HDL-c		LDL-c		Col. T		TG		VLDL-c		Glic.	
	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)
Paciente 1	28	42	69	54	120	109	153	54	31	14	91	54
Paciente 2	32	45	113	92	162	155	94	90	19	18	78	77
Paciente 3	29	26	91	108	223	193	552	479	110	59	74	77
Paciente 4	37	38	111	72	177	143	338	249	68	33	88	98
Média	31,5	37,5	96	81,5	170	150	284	218	57	31	82,7	76,5
P (teste t pareado unicaudal)	0,46		0,27		0,0204		0,0104		0,0132		0,4085	

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol; LDL-c: Colesterol ligado a lipoproteína de baixa densidade; Col T: Colesterol total; TG: Triglicérides;
VLDL-c: Colesterol ligado a lipoproteína de muito baixa densidade; Glic: glicemia de jejum.

Gráfico 12 - Valores de colesterol total antes e após reposição de melatonina

$p = 0,02$ (test t pareado unicaudal)*.

*Estatisticamente significativo.

Gráfico 13 - Valores de triglicérides em jejum antes e após suplementação com melatonina

$p = 0,005$ (test t pareado unicaudal)*.

*Estatisticamente significativo.

Apesar do número diminuto de pacientes, pode-se observar diferenças estatísticas tanto em colesterol total, em triglicérides. Também houve diferenças em VLDL-colesterol, porém este é calculado a partir de

triglicérides. Não era esperado a obtenção de um resultado tão expressivo, e é possível que com casuísticas ligeiramente maiores, seja possível observar diferenças em outros marcadores. Vale lembrar que, embora não houve aumento estatisticamente significativo de HDL, ocorreu um aumento de HDL ao redor de 7 mg/dL, que é clinicamente significativo e muito difícil de se obter com qualquer tratamento atualmente disponível³⁵⁶⁻³⁵⁸. Observou-se que o aumento de HDL se deu principalmente nos indivíduos 1 e 2, com aumentos acima de 10 mg/dL. Embora qualquer razão para esses achados seja puramente especulativa, estes foram os pacientes com IMC mais baixo.

5.2.5 Peso corporal

Embora, como discutido anteriormente, boa parte do interesse sobre o TAM se dê pelo seu potencial antiobesidade, o intuito primário não era observar diferenças claras no peso corporal, em virtude do pequeno tempo de seguimento e do n absolutamente insuficiente para qualquer conclusão. De toda forma, observar padrões ponderais é de extrema importância, para que os resultados não fiquem somente no campo científico, sem uso prático. Surpreendentemente, a resposta ponderal à suplementação de melatonina foi bastante heterogênea, com o paciente 1 apresentando uma redução de 3 kg, o equivalente a 5,5% do peso; em compensação o paciente 3 apresentou um aumento expressivo de peso (4,2% ou 3,2 kg), assim como os pacientes 2 e 4 apresentaram uma variação menor, porém positiva (Quadro 5). Assim, foram obtidos três pacientes que ganharam peso durante a reposição da melatonina e apenas um que perdeu, um dado contraintuitivo. Embora a heterogeneidade das respostas não nos permita tirar conclusões, não se esperava encontrar

essas variações tão grandes para cima ou para baixo, o que merece uma investigação maior. Porém, este também pode ser um fator confundidor dos dados do presente estudo. O paciente que obteve a maior resposta ao PET foi o que também mais perdeu peso. Pode-se especular que a maior resposta de TAM contribuiu para o peso perdido, ou, contrariamente, que a perda de peso permitiu uma melhor visualização do TAM. Porém, como nos outros pacientes não houve correlação entre captação e peso, nenhuma conclusão pode ser determinada.

Quadro 5 - Variação de peso corporal nos quatro pacientes da análise principal

Peso corporal	Pré-melatonina	Pós-melatonina
Paciente 1	54,2 kg	51,2 kg
Paciente 2	55,7 kg	56,7 kg
Paciente 3	76 kg	79,2 kg
Paciente 4	98,5 kg	99 kg

Devido a isso, foi feita uma análise de correlação do IMC com o volume de TAM no basal, e com a razão de incremento de TAM após melatonina. Não houve correlação significativa, com r (correlação de Pearson) de -0,18 para o volume e -0,28 para a atividade de TAM (Anexos D e E). Assim, não se pode, ao menos nessa amostra limitada, associar os dados de volume com o IMC nem no basal, nem na resposta à melatonina.

De toda forma, com três pacientes ganhando peso tornam-se ainda mais significativos os efeitos positivos sobre os lípides, visto que, considerando a variação ponderal positiva, seria esperado que esses três pacientes tivesse um aumento, e não diminuição de triglicérides e, em menor grau, de LDL-colesterol.

5.2.6 Resposta do paciente com disautonomia

Como referido, embora a opção tenha sido a de excluir o paciente com disautonomia da análise principal, optou-se por realizar o exame de PET-RM antes e após a suplementação com melatonina, posto que o mesmo já receberia a medicação para outras análises.

Surpreendentemente, obteve-se um padrão de resposta bastante distinto desse paciente em relação aos demais analisados (Quadros 6 e 7).

Quadro 6 - Volume total e atividade total de TAM do paciente excluído da amostra principal antes e após reposição com melatonina

Paciente 5	Pré-melatonina	Pós-melatonina
Volume total (mL) SUV>2,0	768 mL	568 mL
Atividade total (SUV médio x volume)	2443	17000

SUV: Valor padrão de captação dos exames de PET.

Ao contrário dos outros quatro pacientes, o paciente 5 apresentou redução importante do volume e da atividade total do TAM após 3 meses recebendo melatonina. Embora seja a análise de apenas um paciente, esse dado corrobora a hipótese de que a possível regulação do TAM pela melatonina passe por um efeito do SNS. Quanto aos dados de lípidos, o paciente apresentou, assim como os demais, redução de colesterol total, às custas de LDL e VLDL, porém com redução discreta de triglicérides e aumento discreto de HDL. O peso do paciente não foi medido nas datas, pois devido ao problema locomotor, ele só pode ser pesado em camas especiais, não disponíveis nas datas dos exames.

Quadro 7- Análise dos lípides do paciente excluído da amostra principal antes e após reposição com melatonina

	HDL-c		LDL-c		Col. T		TG		VLDL-c		Glic.	
	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)	Pré (mg/dL)	Pós (mg/dL)
Paciente 5	35	33	114	85	167	148	217	209	43	30	77	83

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade ligada ao colesterol; LDL-c: Colesterol ligado a lipoproteína de baixa densidade; Col T: Colesterol total; TG: Triglicérides; VLDL-c: Colesterol ligado a lipoproteína de muito baixa densidade; Glic: glicemia de jejum.

5.2.7 Termografia infravermelha e comparação com PET-RM

Os cinco pacientes realizaram TIV para analisar possível correlação entre os dados. A ideia do uso da TIV foi de analisar se um método mais barato, não invasivo e de fácil reprodutibilidade poderia, de alguma forma, fornecer informações semelhantes, ou mesmo complementares ao PET-RM possibilitando seu uso em futura pesquisa. Além do mais, a TIV, se confiável, permitiria analisar dados antes e após a exposição ao frio, semelhante ao que foi realizado nos animais de experimentação, e não apenas os dados pós-frio, como foi feito no PET-RM. Quando da análise entre a correlação entre o PET-RM e a termografia, foram usados os dados dos cinco pacientes, visto que é uma análise de exame e não de tratamento; porém ao tentar analisar a resposta termográfica isoladamente, o paciente 5 foi excluído para manter um padrão.

A primeira pergunta é se o desafio ao frio do protocolo foi significativo em levar a um aumento de temperatura. Para isso, foram plotados todos os dados observados antes e após o desafio ao frio, tanto em região supraclavicular direita como esquerda, sem distinção se antes ou após suplementação de melatonina, e juntando o paciente 5 na análise. A maior surpresa foi que o protocolo de exposição ao frio utilizado não foi uma estratégia eficiente para recrutamento de TAM, ao contrário do artigo que sugeriu a técnica³⁴⁵. Isto porque, analisando as 10 imagens obtidas e analisando tanto as regiões supraclaviculares direitas como esquerdas, pode-se observar aumento de temperatura da região analisada subtraída da temperatura central após o desafio frio em apenas 11 das 20 medidas (ao contrário do que foi observado nos animais de experimentação, com o

desafio proposto e analisado por PET-TC, onde 100% dos animais tiveram aumento após o frio). Isto pode ter ocorrido devido a diferenças entre sensação de frio com o experimento, resposta ao estresse e condições diferentes de temperatura no dia do exame. Porém, mesmo com essa heterogeneidade de resposta, ainda assim foi possível demonstrar que houve aumento de temperatura estatisticamente significativa após o desafio ao frio em comparação com o basal (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Delta Temperatura (graus Celsius) entre região supraclavicular (direita ou esquerda) e região intercostal média, por termografia infravermelha, antes e após desafio ao frio

$p = 0,003^*$.

*Estatisticamente significativo.

Em relação à atividade de TAM medida em W, também foi observada uma discrepância grande entre os diferentes participantes, e não houve diferença estatística entre o pré e o pós-desafio ao frio, corroborando a hipótese de que o desafio ao frio proposto não foi a melhor opção para

análise de ativação de TAM (Gráfico 15). No entanto, a análise de atividade de TAM em W nos parece mais importante para comparação com o PET-RM do que a temperatura, e nesse sentido, propomos, em futuros estudos que o mesmo desafio ao frio do PET-RM seja aplicado à TIV. Deve-se lembrar, porém, que a atividade em W não diferencia regiões supraclaviculares direita e esquerda e portanto, o número de medidas é metade da observada com o valor de diferença entre temperaturas.

Gráfico 15 - Atividade de TAM em Watts antes e após desafio ao frio em todos os grupos

TAM: Tecido adiposo marrom

$p = 0,6321$

Sendo o estímulo frio aquém em relação ao necessário para ativar o TAM, a capacidade de análise dos dados em comparação à PET-RM foi substancialmente comprometida.

Não obstante, como houve diferenças estatísticas no Delta Temperatura foi optado por fazer a análise comparando o tratamento com melatonina com o

basal. Como esperado, devido à heterogeneidade de resposta em relação ao Delta Temperatura, não foi observada nenhuma relação entre o uso de melatonina e o aumento de temperatura SCL. Também não foi observada relação entre os dados de temperatura e os dados obtidos no PET-RM (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Diferença entre temperatura supraclavicular (Esquerda ou Direita) e a região intercostal média antes e após a suplementação de melatonina

SCL: Supraclavicular; D: Direita; E: Esquerda; IC: Intercostal.

$p = 0,5763$.

Foi realizada também a análise da atividade de TAM por W, um dado que se assemelha mais à medida de atividade de TAM feita na PET-RM. Nessa análise, optou-se por comparar os grupos separadamente: pré-estímulo frio e pós-estímulo frio, visto que, ao considerar que o estímulo frio não foi eficiente em aumentar a atividade, não faria sentido avaliar um delta. Os quatro pacientes, apresentaram, após três meses de suplementação de melatonina, aumento de atividade de TAM medida por W na TIV em ambas as situações. Todavia, apenas após a imersão da mão em água gelada houve diferença estatística, como mostram os Gráficos 17 e 18.

Gráfico 17 - Atividade de TAM (W) por TIV após mergulho das mãos em água gelada antes e após suplementação com melatonina

$p = 0,031^*$.

*Estatisticamente significativo

Gráfico 18 - Atividade de TAM (W) por TIV em temperatura ambiente pré e após suplementação com melatonina

$p = 0,17$.

A seguir, o Gráfico 19 demonstra a correlação entre a razão de aumento de atividade de TAM, medido pela PET-RM (volumexSUV médio) sobre a razão de aumento de atividade de TAM medido pela TIV (em W). Os quatro indivíduos da análise principal tiveram aumento de atividade por W, da mesma forma que tiveram aumento de atividade no PET-RM. Analisando em conjunto o paciente 5, pode-se observar que este teve redução da atividade em ambos os experimentos, ou seja, houve concordância entre o PET-RM e a TIV na direção da resposta à intervenção nos 5 pacientes. Considerando a correlação, obteve-se um r de Pearson de 0,566, ou uma correlação moderada, porém sem significância estatística devido ao número limitado de pacientes. Um dos paciente (no caso, o 4) comportou-se como um caso atípico ou aberrante (*outlier*). De toda forma, a correlação moderada entre a as atividades de TAM medida pela TIV e pela PET-RM permitem que em futuros estudos, a TIV possa ser explorada novamente como um método fidedigno para avaliação de TAM, porém, como já discutido, com um estímulo frio distinto. Isso será ainda abordado na discussão.

Gráfico 19 - Correlação (teste de Pearson) entre a razão de aumento de atividade de TAM pós/pré melatonina, comparando o PET-RM com a TIV

TAM: Tecido adiposo marrom; TIV: Termografia infravermelha; PET: Tomografia computadorizada por emissão de prótons.

$r = 0,566$; $p = 0,31$.

No gráfico 20, foi avaliada a correlação entre a razão de aumento da atividade de TAM medida por W e o IMC dos pacientes. O que se viu foi uma correlação altamente significativa.. Estes dados poderiam apontar em duas direções: que a TIV é mais sensível para detectar diferenças em indivíduos mais magros, o que parece mais provável, ou que a melatonina seria mais efetiva em indivíduos mais magros (ou seja, teria um efeito de dose-resposta dependente do peso corporal). Esta proposição, entretanto, não se sustenta pelos dados do PET-RM.

Gráfico 20 - Correlação (teste de Pearson) entre a razão de aumento de atividade de TAM pós/pré melatonina medida por W e o IMC dos pacientes

TAM: Tecido adiposo marrom, IMC: Índice de massa corporal (kg/m²)

$r = -0,9645$; $p = 0,03^*$.

*Estatisticamente significativo

Por fim, a título de ilustração, a Figura 7 mostra as imagens do paciente 1 (o mesmo paciente que também foi apresentado no exame de PET-RM), que, assim como no PET-RM foi o que apresentou maior variação de atividade de TAM por W.

Figura 7 - Análise visual do paciente 1 à termografia após mergulho de mãos em água gelada antes (E) e após (D) suplementação com melatonina 3 mg. Note que após a suplementação com melatonina, há um claro aumento de área com temperatura mais alta após mergulho de mãos em água gelada. A partir das análises visuais, é calculada a atividade de TAM em W pela fórmula de Stefan-Boltzmann

6 DISCUSSÃO

Na presente tese, o objetivo foi demonstrar, em animais de experimentação e em humanos, o papel da suplementação de melatonina, em grupos deficientes desse hormônio devido à ausência de glândula pineal, na regulação do TAM. Como bem discutido durante a introdução, embora a população estudada seja bastante específica, ela foi escolhida por duas razões.

A primeira é se tratar de uma excelente prova de conceito dos efeitos da ausência da melatonina e da sua reposição uma vez que é bem estabelecido que a luz noturna suprime a secreção de melatonina^{16,17,136,321}, e a poluição luminosa noturna é um aspecto inequívoco da vida moderna³²³, o achado que a reposição de melatonina em indivíduos deficientes pode ter impacto metabólico é extremamente importante. Ele pode explicar, em parte, a relação epidemiológica entre poluição luminosa e obesidade^{15,322}, assim como a maior prevalência de doença metabólica em trabalhadores noturnos^{307,359}. Isso pode ter impacto em medidas de prevenção, e na busca por tecnologias de iluminação que tenham menor impacto sobre a secreção de melatonina^{18,138}. É claro que o presente estudo não responde a essas dúvidas, mas sem dúvida abre questionamentos que poderão ser respondidos em estudos maiores, estudando indivíduos que sejam mais representativos da população geral. Além disso, estudar indivíduos pinealectomizados foi uma tentativa de reproduzir em seres humanos dezenas de estudos realizados com animais com remoção

cirúrgica da glândula pineal, que sempre foram estudados como prova de conceito^{19,24,26,178}. Nesse sentido, os achados encontrados foram bastante interessantes.

A segunda razão é que o subgrupo de pacientes com tumores de pineal e deficiência de melatonina, embora raro, é pouquíssimo estudado. Trata-se de uma população que tem deficiência de um hormônio, porém não tem indicação clara, na literatura, de sua reposição. Na área da Endocrinologia, esta é uma situação que causa bastante estranheza que se deve, em parte, ao desconhecimento de médicos em geral do papel hormonal da melatonina, a “expressão química da escuridão”²¹. Portanto, embora a razão principal que levou à ideia do projeto fosse entender a relação entre a luz noturna e a obesidade, não há dúvida que, diante de resultados positivos, principalmente nos dados em humanos, abrem-se importantes caminhos para o estudo dessa população, preferencialmente um estudo randomizado e com um *n* maior, que podem levar a uma nova indicação clara do uso de melatonina.

Em animais, como detalhado na introdução, há muitos dados na literatura, principalmente em espécies hibernantes e claramente sazonais, da importância da melatonina na regulação de TAM³⁰. No entanto, quase todos os estudos mais antigos valeram-se de análises histológicas do TAM e da expressão de UCP-1, e não de estudos que demonstram que esse tecido, quando estimulado pelo frio, torna-se, de fato, mais ativo (Quadro 2), com exceção do estudo recém-publicado e vinculado a esse mesmo temático que avaliou uma menor temperatura da cauda, medida por TIV, em animais

pinealectomizados expostos ao frio¹⁸¹. Da mesma forma, a maioria dos estudos avaliou a suplementação de melatonina, ou a alteração do fotoperíodo em animais com a glândula pineal intacta. O intuito desta pesquisa, diferentemente desses estudos, foi demonstrar se a ausência de melatonina poderia impactar na expressão de UCP-1 por RNAm, e na ativação do TAM visto por PET-FDG e se a suplementação da mesma seria suficiente para restaurar um padrão normal.

Os resultados foram bastante interessantes. Apesar da ausência de diferença estatística, houve uma tendência de que, em temperatura ambiente, animais pinealectomizados tivessem, surpreendentemente, maior ativação de TAM avaliado pelo SUV máximo, do que animais controles e pinealectomizados repostos com melatonina.

Após o estímulo frio, ocorreu o oposto, com o grupo PM apresentando tendência a um aumento da ativação de TAM. Como em ambas as situações, o valor de p foi insuficiente para alcançar significância estatística, algumas hipóteses serão brevemente discutidas. No entanto, é bem possível que uma amostra ligeiramente maior poderia resultar num efeito positivo, principalmente após o desafio ao frio, que sensibiliza o método.

Entretanto, de forma positiva, foi observada diferença estatística na comparação do aumento de ativação de TAM por SUV máximo entre a temperatura ambiente e o frio, com os grupos C e PM apresentando quase o dobro do aumento comparado ao grupo de animais P, como esperado na formulação da hipótese.

Como explicar essa diferença? Possivelmente, a explicação mais plausível é que a melatonina não promove um efeito único agudo de aumento

de TAM, como poderia se supor, mas um efeito regulatório, em que a secreção circadiana do hormônio permite um correto funcionamento do tecido^{19,166,174}. Assim, a ausência de melatonina em situações em que não há um estímulo agudo inesperado para a ativação de TAM, como em temperatura ambiente (que não necessariamente é um ambiente termoneutro para o animal), pode não ser importante para o correto funcionamento do TAM, e ainda mais, a melatonina pode ter, como já hipotetizado por Tan *et al.*³⁰, um efeito direto inibitório sobre o TAM. Contudo, com estímulo frio mais intenso, como o que ocorreu com os animais ao serem colocados a 4°C por 2 horas, houve uma enorme descarga noradrenérgica simpática², e a melatonina, como reguladora do TAM nessa situação, permitiu, nos animais pinealectomizados repostos, uma resposta adequada, semelhante ao grupo controle, provavelmente supersensibilizando o tecido à ativação simpática. Apesar disso, nos animais que não possuíam melatonina, o TAM não foi capaz de ativar-se corretamente nessa situação limite. Vale lembrar que um possível efeito regulatório, e não somente estimulatório do TAM já poderia ser imaginado ao analisar o ritmo circadiano de TAM em animais, onde a maior ativação ocorre às 13:00, no período em que os níveis de melatonina devem estar mais baixos³⁰³.

A análise de expressão de RNAm de UCP-1 também foi interessante, pois ratificou, como já era previsto que a pinealectomia sem reposição reduz de forma substancial a expressão de UCP-1 nesses animais comparados a todos os outros grupos. A suplementação de melatonina, tanto em animais controles como em animais pinealectomizados aumenta a expressão de

UCP-1, confirmando um papel do hormônio na regulação deste tecido. Embora não fosse o objetivo dessa tese, o achado de aumento de expressão no grupo CM comparado ao grupo C também sugere que a melatonina tenha um papel de aumento de TAM suprafisiológica, ou seja, esse aumento não é visto apenas em animais que tenham deficiência do hormônio e o repõem. Também de maneira interessante, o grupo PM apresentou um aumento substancial da expressão de UCP-1 comparado com o grupo C, embora o objetivo do experimento fosse fornecer doses fisiológicas de melatonina. A hipótese mais razoável para essa diferença é que, embora o objetivo fosse fornecer doses fisiológicas, a suplementação de melatonina na água de beber foi suprafisiológica. Outra possibilidade provável é que o padrão de secreção de melatonina endógeno é muito diferente do padrão de reposição de melatonina, que dependerá do consumo de água pelo animal, e que será feito em picos ao longo do período ativo. De toda forma, apesar dessa diferença substancial, não houve, pelo menos nessa pequena amostra, diferenças de ativação de TAM entre o grupo C e o grupo PM analisados pelo PET-FDG (embora seja possível que com uma amostra maior, diferenças fossem vistas, pois houve uma pequena diferença numérica). Nesse sentido, como já discutido em diversas publicações, uma maior expressão de UCP-1 por RNAm não significa maior termogênese, pois a análise *post-mortem* pode não conter todos os tecidos termogênicos do animal, apenas aqueles mais concentrados em uma região, e, mais ainda, pode não haver eventos pós-transcricionais que levem esse RNA à produção da proteína propriamente dita^{2,355,360,361}. Assim, embora a princípio

uma maior expressão de UCP-1 possa significar maior capacidade de termogênese, muito provavelmente a intensidade e duração do estímulo noradrenérgico é que determina se essa capacidade é totalmente utilizada ou não^{2,355}. Dessa maneira, uma possibilidade aventada é que, se o estímulo frio fosse ainda mais intenso e/ou duradouro, poderiam ser observadas diferenças mais claras entre os grupos PM e C no PET-TC. O próprio resultado inesperado de um aumento numérico, porém não estatístico, no SUV máximo do grupo P à temperatura ambiente corrobora essa teoria de que uma maior expressão de UCP-1 não significa a princípio maior termogênese, a não ser que haja um estímulo específico.

Considerando toda a complexidade da regulação do TAM, e da própria complexidade dos padrões circadianos, é possível que resultados distintos fossem observados com desenhos diferentes de experimentos, pois diferentes estímulos frios (crônico ou agudo; intenso, moderado ou baixo; contínuo ou intermitente) podem suscitar respostas diferentes do TAM, de acordo com a necessidade de sobrevivência do animal; da mesma forma, ausência total de melatonina, ruptura circadiana (com melatonina presente em horários não usuais), doses suprafisiológicas, além de outras dezenas de possibilidades também podem levar a resultados muito distintos, visto que o efeito principal da melatonina é na regulação circadiana, e não como hormônio clássico¹⁹. Porém, com o estudo atual, parece claro que os dados coletados há décadas em animais hibernantes e resumidos na Quadro 2, se aplicam ao rato Wistar, e que a melatonina não só foi capaz de levar a maior massa de TAM, como os estudos antigos demonstravam, mas também a uma maior ativação metabólica,

medida pela captação de FDG, um método que não era disponível quando a maior parte desses experimentos foi realizada³⁰.

Uma análise importante para complementar os dados obtidos, seria o volume total do TAM ativado, tanto em temperatura ambiente como no frio. No presente estudo, diferentemente do que foi mostrado em humanos, foi feita a análise baseada em SUV máximo, pois esta era, no momento em que a parte experimental foi realizada, a medida considerada mais importante e possível com os métodos e o conhecimentos então disponíveis^{353,362}. Mais recentemente, porém, novos programas adquiridos pelo Instituto de Medicina Nuclear permitem fazer essa análise, porém devido ao extremo trabalho e tempo necessário para a realização desses cálculos, isso não foi exequível até o final do projeto. É importante lembrar que o interesse científico no TAM cresceu a partir de 2009, com a publicação dos três estudos no periódico *New England Journal of Medicine*^{4,5,58}. Portanto, métodos de detecção por PET-FDG começaram a ser lentamente refinados a partir daí e o conhecimento do assunto no início deste projeto era bastante inferior ao conhecimento ao final.

Seria também interessante analisar outros depósitos de TAM que não apenas o tecido interescapular. Há dados que sugerem que o tecido interescapular é o mais sujeito à ativação do SNS^{288,363-366} e portanto provavelmente mais sensível à ação da melatonina, mas sem dúvida uma análise de outros tecidos teria sido interessante. É importante considerar, que, embora o tecido interescapular seja o mais importante em animais de experimentação, como ratos e algumas espécies hibernantes, é um tecido

que não é presente em humanos; inclusive, a demora no reconhecimento da presença de TAM em humanos adultos vem, em parte, dessa diferente anatomia entre espécies^{60,363}. Não obstante, os dados encontrados nesse tecido não podem ser extrapolados para humanos, cuja inervação do TAM pode ser bastante distinta. Diferenciar assim a importância de diferentes depósitos de TAM para funções vitais e diferentes regulações e inervações pode ser um vastíssimo campo para estudo no futuro. Por exemplo, a existência de um tecido adiposo bege foi reconhecida há poucos anos e já é bem aceita^{103,104,367}; sendo possível, portanto, que também se possa descobrir que diferentes depósitos de TAM tenham diferentes ativações e funções.

Assim, pode-se concluir, no experimento animal, que a pinealectomia, conforme a hipótese formulada, reduz a capacidade do TAM de aumentar sua ativação após estímulo frio intenso e agudo, embora não aparente reduzir o TAM em situações habituais de temperatura ambiente. Por outro lado, a reposição de melatonina a esses animais pinealectomizados normaliza a resposta termogênica do TAM ao frio. Quanto aos dados de expressão de RNA, a pinealectomia reduz a expressão de UCP-1 e a reposição de melatonina tanto em um grupo controle como em animais pinealectomizados aumenta a expressão de UCP-1. Juntando ambas as informações, é razoável concluir que a pinealectomia reduz o recrutamento de TAM, e torna o animal menos adaptado a mudanças bruscas de temperatura. Esse efeito é muito provavelmente devido à ausência de melatonina (e não de outros possíveis metabólitos produzidos pela glândula

pineal), visto que sua suplementação corrige esta deficiência. Mais além, a suplementação de melatonina a animais controles, isto é, não deficientes, também aumenta sua expressão de UCP-1 (embora não se tenha analisado a capacidade termogênica no PET-TC), sugerindo um possível papel farmacológico da melatonina na ativação desse tecido.

Os dados em humanos são mais limitados, devido à pequena casuística de pacientes que foram possíveis recrutar. A ideia inicial era recrutar no mínimo o dobro do número de pacientes efetivamente estudados, baseado em dados de prontuário de pacientes potencialmente candidatos, mas, infelizmente, perdas de pacientes por óbito, dados de contato desatualizados, não aceitação do termo de consentimento e abandonos restringiram a amostra. Além do mais, houve um paciente que teve que ser antecipadamente excluído da análise principal, por sinais e sintomas de compressão simpática. Como a ação da melatonina se dá por sua ação em SNS^{30,34,284,288}, como demonstra a Figura 4, esse paciente não poderia fazer parte da análise. Além do tumor com compressão de SNS, o paciente também apresenta hipopituitarismo e tetraparesia espástica, outros fatores confundidores. Ademais, havia um outro paciente com hipopituitarismo e uso de múltiplas medicações, o que certamente gera múltiplos confundidores, mas que foi mantido na análise. De maneira mais óbvia, o uso de corticoide em pacientes com insuficiência adrenal secundária não é fisiológico e não obedece ao padrão circadiano clássico de secreção de cortisol³⁶⁸⁻³⁷⁰. Não apenas isso, estudos sugerem que o próprio cortisol e os glicocorticoides têm ação direta em TAM^{298-301,371}, e portanto, a incapacidade do cortisol se

regular durante o desafio frio pode ter impacto na resposta do TAM. Não se pode excluir também que o hipotireoidismo, seja primário ou secundário, também possa interferir na presente análise, visto que visto que parte da ação da melatonina sobre o TAM pode se dever à ação em deiodinases, como explicitado anteriormente e mostrado na Figura 4. Porém, considerando que o efeito da melatonina sobre a 5'D2 estudada em animais é um efeito específico do tecido, isto é, ocorre apenas em TAM^{30,292}, e os pacientes com hipotireoidismo estavam repostos com levotiroxina, pressupõe-se que um eventual papel da melatonina na maior conversão de T4 para T3 no TAM continuaria ocorrendo nesses pacientes, visto que em um tratamento correto do hipotireoidismo haveria suficiente T4 periférico circulante. Apesar disso, como resultados significativos em alguns parâmetros foram obtidos mesmo com o número restrito de pacientes, e com todos esses fatores confundidores, isso certamente, como comentado mais à frente, incentiva a realização de estudos maiores em população semelhante, e de preferência com menos comorbidades sujeitas a vieses.

A análise de ativação de TAM foi diferente do estudo em animais, pois foi utilizado PET-RM ao invés do PET-TC. Isto ocorreu por uma discussão entre os pesquisadores e a equipe de médicos nucleares do Instituto de Medicina Nuclear HCFMUSP. A máquina de PET-RM estava disponível, com uso programado para diversos protocolos e também permite, no futuro, análises de TAM independente do PET. Também esse aparelho foi aproveitado para análise de gordura hepática, embora este não fosse o objetivo primário da tese. De toda forma, a diferença entre a RM e a TC tem

impacto menor sobre a avaliação dos dados de PET, pois ambos os aparelhos servem para delimitar a área de gordura e evitar, assim, que atividades metabólicas vistas em outras áreas sejam confundidas com TAM.

A diferença principal dos estudos em animais e em humanos, porém, foi o parâmetro utilizado para avaliar TAM. Em humanos, foram utilizados dados de volume e atividade total de TAM (essa última medida pelo volume x SUV médio do tecido acima de um limiar), de acordo com um protocolo publicado recentemente, porém posterior ao término do estudo em animais³²⁶. Os cálculos utilizaram um limiar de SUV>2,0, mas como outros estudos empregaram limiar acima de 1,5 essa análise também foi feita (Anexos A, B e C) e não apresenta grande diferença. Ao contrário dos animais, não foi avaliado o SUV máximo, visto que, diferentemente dos humanos, os animais possuem uma área óbvia para avaliação do TAM, a região interescapular^{2,60} e, e, em humanos, a maior distribuição de TAM e provavelmente tecido bege sugere que analisar volume e atividade será mais preciso do que avaliar apenas o SUV máximo, um parâmetro mais importante em oncologia^{326, 372,373}. Como o método para avaliação de SUV máximo é visual, diferente do método utilizado com o programa AMIDE, esse dado não foi nem mesmo analisado. Como explicado acima, foi almejado analisar os mesmos dados de volume e atividade em animais, o que não foi possível até o final da tese.

Quanto aos resultados, apesar do número reduzido de pacientes que se submeteram ao exame, uma diferença estatística nos dois parâmetros principais analisados, com aumento de volume e atividade total de TAM nos

quatro indivíduos, foi atingida. Uma análise estatística com apenas quatro indivíduos sempre é sujeita a vieses, porém um resultado positivo dá ainda mais força à tese. O aumento médio de volume foi de 2,23 vezes e o de atividade foi de 2,15. Houve uma variabilidade de resposta, com os pacientes 1,2,3 e 4 apresentando aumentos de volume de 3,37; 1,16; 1,5 e 2,9, respectivamente; e de atividade total de TAM de 3,12; 1,11; 1,34 e 2,89, respectivamente. Uma imagem do paciente 1, que apresentou a resposta mais substancial foi apresentada (embora a análise tenha sido de forma computadorizada e não visual, a imagem visual é bastante significativa nesse paciente em particular), embora foi o paciente que saiu do basal mais baixo; é interessante notar também que o paciente 2, que apresentou resposta mais discreta à suplementação de melatonina, foi também o que apresentou maior ativação de TAM no basal.

Os dados do estudo sugerem, assim como o demonstrado em ratos Wistar (embora com métodos de detecção diferentes), que a melatonina aparenta ter papel crucial no recrutamento de TAM, permitindo, em um estímulo frio, que esse TAM recrutado possa exercer sua função termogênica. É importante ressaltar, no entanto, que o grau de desafio ao frio em humanos foi muito mais leve que em animais, e fisiologicamente, a resposta pode ser bastante diferente. É possível que, nas condições realizadas em humanos, haja tempo maior para que o tecido adiposo possa ser ativado após recrutamento, e até mesmo que áreas de tecido bege sejam recrutadas. Em um estímulo muito agudo de frio, é possível que áreas mais concentradas, com maior densidade de UCP-1 sejam recrutadas, sem que haja tempo de uma resposta mais ampla.

Porém, sem que sejam feitos estudos com diferentes protocolos de frio, pode-se apenas especular. Deve-se lembrar também que, ao contrário dos animais, não foi realizado o exame em temperatura ambiente. A escolha se deveu à menor sensibilidade para detecção de TAM nessa situação, e ao custo financeiro e logístico que acarretaria duplicar o número de exames para os mesmos pacientes. Deve-se ainda ressaltar que os animais, à temperatura ambiente, não estão termoneutros, porque a temperatura interna dos mesmos é ao redor de $36^{\circ}\text{C}^{2,360}$. Os humanos, contudo, devido ao uso de roupas, estão mais próximos da termoneutralidade à temperatura ambiente. Nesse caso, a ativação do TAM seria muito pequena, sem possibilidade de demonstrar diferença entre os grupos, e apenas uma casuística maior poderia, eventualmente, apresentar diferenças.

De toda forma, a trajetória positiva nos quatro pacientes da análise primária corrobora fortemente um papel da reposição de melatonina na maior atividade e volume de TAM avaliado por PET-RM. Diferentemente dos animais, não se pode concluir que a pinealectomia, por si, reduz a captação, pois não foram feitas análises com grupos controles (e a casuística para isso teria que ser bastante grande, sem poder garantir que outros fatores confundidores, como pan-hipopituitarismo, história de QT ou RT e cirurgia cerebral poderiam ser os responsáveis por uma eventual menor presença de TAM ativo nessa população, no basal).

Entretanto, não há dúvida que o objetivo de se investigar um papel da melatonina no TAM em humanos é, de certa forma, relacioná-la com aspectos metabólicos, entre eles o peso corporal. Não se podia imaginar que a

melatonina tivesse um papel maior no peso corporal desses indivíduos após apenas 3 meses de tratamento, uma vez que o eventual aumento de gasto energético observado com o aumento de TAM poderia não ser significativo para acarretar grande variação ponderal no curto prazo, como já visto com outras substâncias ditas “termogênicas”^{3,55,374,375}, assim como outros estudos com melatonina, que demonstraram perda de peso bastante discreta^{235,238,241,376}. O maior objetivo seria entender se um efeito de longo prazo de menor gasto energético devido à menor massa e ativação de TAM em indivíduos de risco, como trabalhadores noturnos²⁰⁷, indivíduos sob intensa iluminação noturna^{15,16}, idosos¹⁵⁰, e pacientes em uso de betabloqueador²⁶⁵, entre outros, poderia ser considerado uma possível causa não óbvia de ganho de peso nessas populações. De toda forma, o dado de que, a despeito do aumento de TAM, houve ganho de peso em três pacientes chama a atenção e não era esperado, embora sem variações estatísticas. Um paciente, por sinal, com a menor resposta inicial e a maior resposta à terapia com melatonina apresentou perda de peso, a despeito de já ser bastante magro. A maior perda de peso no paciente 1, no entanto, é também um fator confundidor, pois pode ter contribuído para uma melhor visualização do TAM nesse indivíduo; assim como o aumento de três vezes na ativação do TAM pode ter contribuído para a perda de peso. Infelizmente, essas são variáveis difíceis de serem controladas e a resposta é apenas especulativa no momento. Uma consideração plausível é que um possível aumento do gasto energético pode ter sido acompanhado de um aumento do apetite, não necessariamente acoplado. Dados em animais não sugerem esse efeito⁷³, porém sabe-se que o ato de comer em humanos é muito

mais complexo do que um simples aumento de apetite, e envolve respostas homeostáticas, hedônicas e culturais³⁷⁷⁻³⁸⁰. Não foram encontradas mudanças de conduta em estilo de vida ou médicas nestes três pacientes que pudessem confundir a análise ponderal, ou outras análises, a não ser a própria resposta à melatonina (isto é, melhora do padrão do sono e disposição relatado pelos pacientes, e que não estão compilados nessa tese por serem assunto principal de um outro projeto). Todavia, deve-se considerar que eventuais variações em peso poderiam ter relação com outros aspectos do tratamento da melatonina, sem relação direta do TAM, como por exemplo, a melhora do padrão de sono, já que a privação de sono é um fator sabidamente associado à obesidade^{10,11,126,381}. De toda forma, mais do que um resultado positivo, a melhora do sono e da disposição também deveriam ter um efeito de reduzir, e não de aumentar o peso corporal.

O paciente 5, excluído da análise final, apresentou uma redução do volume e da atividade do TAM. Embora um único paciente não permita que se tire conclusões definitivas e mesmo qualquer hipótese levantada deve ser muito cuidadosa, não há dúvida que é um dado, apesar de todas suas limitações, fascinante. Se, como discutido na introdução, o efeito principal da melatonina se dá pela sua ação sobre o SNS^{30,34,61,135,288}, a lesão tumoral do paciente, que comprime sua via simpática levaria de fato a uma menor ação noradrenérgica; mas pode-se questionar se, nessas condições, o efeito regulador da melatonina poderia ser negativo. Tan *et al.*³⁰ analisaram que o efeito direto da melatonina em receptores de membrana poderia sim ter efeito contrário, por ser associados à proteína G inibitória, que reduziria o

cAMP e a PKA^{30,95}. Os autores também aventaram um efeito facilitador direto da melatonina, que aumentaria o efeito do estímulo simpático; porém, na ausência desse estímulo, esse efeito não ocorreria^{290,382}. É interessante notar que o paciente apresentava, no basal, um volume e atividade de TAM acima da média, o maior dentre todos os participantes. Esse também é um dado relevante, e a princípio contraditório, pois na ausência de estímulo simpático, o paciente não deveria ter capacidade de recrutar TAM e gerar termogênese³⁶³, como vários modelos já demonstraram^{288,383-385}. Nesse sentido, é provável que esse paciente tenha algum grau de ativação simpática, do contrário sua atividade de TAM deveria ser próxima a zero. Contudo, pode-se levantar a hipótese que a tetraparesia do paciente impede que a termogênese, em situações de frio, ocorra devido a tremores e por uma questão de sobrevivência, ele possa ser capaz de ativar seu TAM por vias não clássicas. São apenas ideias derivadas de um único paciente, mas sem dúvida seriam interessantes estudos que avaliassem o TAM em situações semelhantes à dos pacientes do presente estudo, com casuística maior.

A TIV foi realizada por alguns motivos. O primeiro porque, como é um método menos invasivo, que não envolve radiação nem risco algum ao paciente e menos oneroso que o PET-FDG, ela se candidata, caso se mostre fidedigna a ser uma substituta do PET-FDG no futuro^{341,344,345}. Em projetos futuros, se a TIV se mostrasse fidedigna, por ser um método mais simples, seria possível aumentar a casuística, envolvendo não apenas pacientes pinealectomizados, mas quem sabe, indivíduos com níveis de

melatonina circulantes baixos por razões diversas. A outra razão foi que seria possível, pelo menos teoricamente, estudar tanto a temperatura corporal à temperatura ambiente, antes do estímulo frio, como depois, de forma mais semelhante ao que foi feito com os ratos Wistar. Pelo que se tem observado, o estímulo frio agudo (5 minutos imergindo a mão em água gelada) não foi suficientemente sensível comparado com o exame basal em temperatura ambiente, ao contrário do que o estudo de Symonds *et al.*³⁴⁵ sugere. Nesse sentido, muitas análises que poderiam ter sido feitas acabaram sendo comprometidas, infelizmente. Foi possível demonstrar aumento do Delta Temperatura entre o pré e o pós-desafio ao frio, com muita heterogeneidade entre pacientes, o que dificultou a análise e, quando a resposta à melatonina foi avaliada não houve relação entre a suplementação e um aumento de temperatura supraclavicular que corresponderia ao TAM. Assim, em estudo futuro é tentador tentar reproduzir o mesmo padrão de exposição ao frio que o PET pois, para comparar diferentes métodos deve-se ter condições basais semelhantes. Como já discutido anteriormente, estímulos frios distintos, em situações distintas podem ativar o TAM também de forma diferente e por isso é inadequado usar protocolos diferentes para comparar exames. Além disso, é provável que o próprio basal (pré-estímulo ao frio) fosse muito distinto em diferentes análises, pois a temperatura ambiente poderia interferir, assim como é razoável supor que, enquanto o aparelho de termografia era ligado e preparado, os pacientes, que já se encontravam com roupas leves em uma sala condicionada, já tivessem algum grau de ativação de TAM.

Não obstante, ainda assim foram obtidos resultados interessantes com a TIV. Uma comparação direta entre o estímulo frio e a temperatura ambiente foi evitada pelas razões citadas acima (é possível que a situação basal já envolvesse algum grau de ativação de TAM), mas sim a comparação entre o antes e após a suplementação de melatonina na temperatura ambiente e, separadamente, após estímulo frio. Utilizando somente os dados de TIV, sem compará-la ao PET-RM, da mesma maneira, resultados estatisticamente significativos foram obtidos com a suplementação de melatonina, nos quatro pacientes da análise principal ao se analisar a atividade por Watts após estímulo frio, o que corrobora mais os dados obtidos. Mais ainda, no paciente 5, que reduziu volume e atividade no PET-RM também foi notada redução em W na TIV, ou seja, houve concordância na direção da resposta entre os métodos nos cinco pacientes. O grau de aumento, no entanto, mostrou-se diferente entre os pacientes, mas o teste de correlação, no entanto, mostrou uma correlação moderada sem significância estatística, talvez devido ao n pequeno. Um paciente, o 4, apresentou um valor aberrante ou extremo nessa correlação, e a razão mais óbvia para isso pode ter sido seu IMC aumentado, que possivelmente pode dificultar uma visualização de TAM pela TIV. Outrossim, como já mencionado, a diferença de estímulo frio entre os procedimentos (e, como mencionado acima a falência do protocolo de desafio de frio da TIV em consistentemente aumentar o TAM) pode significar também padrões de ativação de TAM diferentes, e assim, com os dados coletados não é possível descartar que a TIV tenha sido efetiva em avaliar a atividade do TAM. Se

fosse possível confrontar as medidas, a medida de atividade por Watts se assemelharia mais à medida de atividade de BAT medida pela PET-RM, enquanto que a medida de Delta temperatura, que não apresentou utilidade no estudo, se assemelharia mais com uma medida de SUV máximo (não realizada).

Todavia, foi interessante notar a correlação entre a razão de aumento de TIV e o IMC dos indivíduos, uma correlação altamente significativa, sugerindo que a TIV seja mais sensível em indivíduos mais magros. Do ponto de vista teórico, isso faz bastante sentido, visto que é um método que detecta basicamente temperatura superficial^{339,341,344}. A hipótese de que a melatonina tenha sido mais efetiva em indivíduos mais magros (sugerindo um efeito dose-resposta uma vez que indivíduos mais magros recebem uma dose proporcionalmente maior por quilo de peso) também poderia ser formulada, porém não se confirma nos dados de PET-RM.

Em relação ao perfil lipídico, a resposta obtida foi surpreendente, pois uma significância estatística foi alcançada com um número muito reduzido de pacientes, tanto em relação ao colesterol total como com triglicérides e VLDL-c. Da mesma forma, em outros parâmetros lipídicos, houve variações clinicamente significativas.

Uma metanálise sugere um efeito principal da melatonina sobre o colesterol total e os triglicérides, sem efeito sobre o HDL, semelhante ao que foi evidenciado no atual estudo²²⁵, e em observações em animais³⁸⁶⁻³⁸⁹. A mesma metanálise alude ao efeito da melatonina sobre o VLDL, e é natural que assim seja pois o VLDL-colesterol está relacionado tanto ao colesterol

total (é uma das frações), como aos triglicérides^{225,388}. No entanto, há muitas discrepâncias entre diversos estudos^{225,233,234,317,318,390,391}, que podem ser devido às diferenças entre populações avaliadas (voluntários saudáveis, pacientes com síndrome metabólica, pacientes com esteato-hepatite, pacientes em uso de antipsicóticos, entre outras) e nenhuma, como a desta tese, sabidamente com nível baixo de melatonina circulante. Além das populações, a dose de melatonina igualmente é bastante variável entre os estudos.

Outro dado surpreendente foi o aumento de HDL-c acima de 10 mg/dL em dois pacientes, improvável de ser explicado por qualquer outra razão que não o tratamento com reposição de melatonina³⁵⁶. Mesmo na média, o aumento de 23% observado é muito próximo ao que se observa com niacina, e muito superior ao que é visto com exercício físico de alta intensidade, que é ao redor de 5% de aumento^{357,358,392,393}. Não obstante, ressalta-se que não foi alcançada significância estatística na amostra deste estudo no grupo total.

Muitos mecanismos foram propostos para as variações nos lípides. Em animais, especula-se o papel da melatonina na redução da gordura visceral, que por si só, teria um efeito benéfico sobre triglicérides, HDL, VLDL e sensibilidade à insulina^{199,200,225}. Uma sensibilidade hepática maior à insulina, com redução da esteatohepatite pode levar à redução de produção hepática de VLDL e triglicérides^{225,389,394}.

A melatonina foi benéfica em reduzir a peroxidação de LDL, demonstrando efeito positivo como antioxidante e como sequestrador (do

inglês *scavenger*) de radicais livres, em estudos *in vitro*^{389, 395-398}, assim como reduziu a atividade do receptor de LDL³⁹⁹. Porém, é interessante ressaltar que alguns autores sugerem que esse efeito só é atingido com uma dose mais alta de melatonina e, portanto, a significância clínica desses achados *in vitro* pode ser questionada⁴⁰⁰⁻⁴⁰², principalmente com dose mais baixa, como do presente estudo. Além dos fatores já citados anteriormente, há estudos animais que mostram o papel da melatonina na redução da absorção de colesterol no intestino, reduzindo as concentrações de VLDL³⁸⁸, na própria síntese de colesterol pelo fígado³⁸⁷, na inibição de receptores envolvidos no transporte de ácidos graxos⁴⁰³, e na modulação da atividade macrofágica e secreção de citocinas, como IL-2, protegendo o LDL de oxidação⁴⁰⁴,.

A hipótese de uma possível relação entre a gordura hepática e os lípides não se confirmou com os resultados, pois não houve diminuição significativa de gordura hepática nos pacientes por RM nos três meses de tratamento. Uma vez que o protocolo de RM permitiria essa avaliação, a análise secundária foi feita e, apesar do n visivelmente baixo, não sugere um papel da melatonina na redução de gordura hepática, diferentemente do que alguns outros ensaios clínicos demonstram, com tempos de seguimento até menores que o atual estudo²³⁰⁻²³³, mas a maior parte deles baseados apenas em marcadores bioquímicos para NASH, exceto por um embasado em ultrassonografia, um método impreciso de avaliação de seguimento de esteatose hepática^{405,406}. O estudo atual, pelo que se sabe, é o primeiro que fez uma análise de imagem de gordura hepática por RM antes e após suplementação de melatonina.

É importante voltar a advertir, porém, que resultados distintos destes com a suplementação de melatonina podem ser encontrados porque, como conceito, foi pesquisado o papel da reposição de melatonina em pacientes deficientes, o que não é o caso em outros estudos. O impacto da reposição de melatonina nesta população pode, de fato, ser mais expressivo do que em populações que receberam melatonina com a finalidade de tratar transtornos do sono ou do ritmo circadiano, sem deficiência. Dessa forma, estes achados permitem formular a hipótese de que a melatonina teria um efeito clinicamente significativo sobre os lípides, sobretudo em pacientes que tenham deficiência de melatonina. O fato de, com apenas quatro pacientes, terem sido documentadas diferenças estatísticas fortalece essa hipótese.

Na Endocrinologia o conceito de reposição de hormônios para indivíduos com deficiências orgânicas ou cirúrgicas é rotineiro. Entretanto, no que tange à melatonina, quase não há estudos que avaliaram especificamente essa questão e a maioria das indicações clínicas da melatonina se dá para outras situações que não envolvem diretamente a ideia de reposição^{244,248,254,255,257}. Há diversos indícios, no entanto, de que a melatonina é mais efetiva para indução do sono em idosos, que possuem nível baixo de melatonina e, entre os idosos, aqueles com nível urinário mais reduzido de 6-sulfatoximelatonina urinário exibem uma melhor resposta^{150,156,257,265}. O seu uso em indivíduos tratados com betabloqueadores, que reduzem a secreção do hormônio, também parece benéfico em um ensaio clínico²⁶⁵.

O emprego da pinealectomia em humanos, para o tratamento oncológico é raro, mas do ponto de vista fisiológico, faz todo sentido que se use melatonina como reposição nesses pacientes. Outro grupo de pacientes

que merecem ser estudados são os indivíduos portadores de cistos pineais, porquanto pouco se sabe sobre a secreção de melatonina nesta condição²⁶⁷. Não há dúvida de que esse módico, embora preambular estudo em humanos abre as portas para um estudo mais sistemático dos benefícios da melatonina em pacientes pinealectomizados, de preferência randomizado, com n mais robusto e maior tempo de seguimento.

A discussão, pode ser ainda mais ampla, pois a prova de conceito da importância da suplementação de melatonina nesses pacientes pode abrir caminho para o estudo do seu papel em outras situações de menor secreção. Por exemplo, um estudo demonstrou que uma menor secreção de melatonina se correlaciona com um risco mais elevado de desenvolver DM2¹⁵⁵. Embora uma menor secreção possa ter etiologia genética, pode também haver uma enorme relação com o grau de exposição à luz noturna. Nesse sentido, este estudo reforça a importância de que no futuro, estudos maiores avaliem a concentração de melatonina em diferentes indivíduos (provavelmente o mais prático seria por 6-sulfatoximelatonina urinária no período noturno) e em seguida, estudem um suposto benefício mais amplo da reposição naqueles com nível mais baixo.

O atual estudo possui algumas limitações. Os grupos de animais de experimentação e de humanos foram pequenos. Em animais, não houve diferença estatística do valor total de SUV máximo (tanto no quente como no frio) entre os grupos. Seria esperado que com uma amostra maior o resultado poderia ter sido diferente, pois houve uma tendência em direção à significância. Não foi executável aumentar o número de animais por

questões logísticas e de orçamento, porém de um ponto de vista de mecanismo de ação faz bastante sentido que a análise final se dê pela razão frio/quente. Na ocasião que o experimento foi executado, muito poucos dados para medição de volume de TAM manualmente nesses animais estavam disponíveis, o que facilitaria a equiparação dos dados animais e humanos (pois é necessário o volume para cálculo não só dele mesmo, mas também da atividade total de TAM). A medida de SUV máxima realizada nos animais talvez não seja a mais confiável para análise da quantidade e da atividade do TAM recrutado. Uma análise de volume com programas atualizados, de preferência analisados por dois examinadores independentes será realizada *a posteriori*.

Nos dados *post-mortem*, o cerne foi a dissecação de TAM interescapular. É possível que a ativação de TAM ou mesmo o tecido adiposo bege em outras regiões fornecesse um resultado diferente, mas a maior concentração de TAM em região interescapular em animais facilita essa análise³⁶³. Teoricamente, para determinar a capacidade termogênica total de um tecido seria necessário avaliar todos os depósitos existentes de TAM, o que, funcionalmente, é muito difícil do ponto de vista experimental³⁵⁵. Isto demonstra a dificuldade de estudar o TAM, cuja magnitude, no início deste projeto, não era conhecida. Para exemplificar o grande aumento no estudo do TAM, em uma busca no PubMed (em 18 de abril de 2018) com o termo “*brown adipose tissue*”, são encontradas 11.060 referências, das quais 3136, ou 28% de toda a literatura sobre o assunto são dos últimos cinco anos, quando uma ideia deste projeto já existia (2012). É oportuno ressaltar

que a grande maioria da literatura mais antiga foi publicada em revistas de Biologia e estudou animais hibernantes.

Em humanos, a perda de alguns pacientes ao longo do andamento do estudo não permitiu finalizar esta tese com o n almejado inicialmente, o que gerou uma enorme preocupação de um resultado negativo e insuficiente para alcançar diferença estatística. Felizmente, porém, a análise dos quatro pacientes foi suficiente, mas os dados devem ser interpretados com todas as restrições de uma amostra pequena. Não foi possível refinar a análise para outros parâmetros e sem demonstrar a acurácia da TIV em comparação com o PET-RM. Apesar disso, foi exequível tirar algumas conclusões valiosas para futuros estudos. Ademais, como previamente arrazoadado, o ideal seria estudar pacientes sem hipopituitarismo ou outras comorbidades, pois especialmente o uso de corticoide exógeno constitui um viés importante. Foi correta e lógica, além de aquiescente entre os envolvidos no projeto, a exclusão do paciente 5 da análise final, porque é certo que a principal hipótese da regulação da melatonina sobre o TAM envolve o SNS³⁰.

O paciente 5, com sua resposta distinta, gerou hipóteses interessantes sobre a complexa regulação, que pode envolver pontos inibitórios e estimulatórios. É claro que um único paciente não permite que se tire alguma conclusão, mas possibilita aventar ideias. Outra limitação importante é que apenas pacientes do sexo masculino foram avaliados, portanto é difícil extrapolar esses dados para uma população feminina. Estudos maiores, indubitavelmente, devem incluir mulheres na população avaliada, no futuro. A variação de IMC também foi muito grande, com o

paciente 1 apresentando IMC de 19 kg/m² e o paciente 4 apresentando IMC de 30,4 kg/m². Sabe-se que o IMC é uma variável importante na análise do TAM tanto por PET-RM como por TIV^{4,5,341}.

É, além disso, importante ressaltar que alguns fatores ambientais, como a temperatura ambiente no dia do exame não puderam ser controlados, o que pode ser considerado um fator confundidor. De fato, o paciente com maior resposta foi exatamente aquele que realizou o segundo exame à menor temperatura (12°C) e não é possível excluir que parte da resposta exacerbada tenha sido uma consequência da temperatura à qual o paciente esteve exposto antes de chegar ao local de exame. Por outro lado, da mesma forma, todos os outros pacientes fizeram o segundo exame em um dia mais quente que o primeiro, reduzindo a possibilidade de um falso positivo, mas aumentando a possibilidade de que, se as temperaturas fossem totalmente controladas, a resposta fosse ainda maior. Este é um viés muito difícil de se evitar, podendo se tentar marcar as datas dos exames para dias em que a média de temperatura seja semelhante e cancelando o exame caso o dia apresente alguma temperatura atípica. Todavia, do ponto de vista administrativo, isso não é exequível em um cenário clínico.

Por outro lado, este projeto é inédito por diversas razões. Em animais, apesar da vasta literatura, mormente em animais hibernantes, da relação da melatonina e do fotoperíodo com o recrutamento e ativação do TAM, este foi, pelo que se tem conhecimento, o primeiro estudo que avaliou não apenas massa de TAM, e a sua ativação por marcadores termogênicos indiretos, mas sim por métodos de imagem que permitem traçar paralelos

com humanos, dadas as dificuldades éticas e logísticas de conceber e cogitar obter material de biópsia na espécie humana.

Em humanos, é o primeiro estudo que buscou estudar as ações metabólicas da melatonina em indivíduos comprovadamente com deficiência desse hormônio e também é o primeiro estudo que avalia o efeito da melatonina por imagem, tanto no TAM, por PET-RM e TIV (objetivo primário deste estudo em humanos), como a gordura hepática por RM (uma análise secundária). Os resultados não podem ser assumidos como definitivos, mas indubitavelmente são geradores de hipótese, para que um estudo clínico randomizado com uma população pinealectomizada possa ser realizado, por um tempo de seguimento maior e com um número maior de pacientes. Devido aos bons resultados encontrados com esse número pequeno de pacientes, acredita-se que aumentando um pouco mais a amostra, os resultados possam gerar informações valiosas que mudem o seguimento clínico desses pacientes após a retirada do tumor e o tratamento oncológico. Por outro lado, os dados positivos que foram encontrados nestes quatro pacientes incitam a ideia de estudar o volume e atividade do TAM antes e após suplementação com melatonina em outros cenários clínicos mais comuns. Embora a maior importância esteja no estudo de indivíduos que tenham melatonina baixa por razões diversas, como comparativo, um estudo em população saudável controle não deixa de ser interessante.

Nem no início do projeto, nem no momento da sua conclusão houve a crença de que a melatonina se tornaria uma medicação para tratamento da obesidade por si só nem de que a ativação do TAM, por qualquer fármaco

seja útil para esse fim. Porém, entender a relação fisiológica entre o excesso de luz noturna e o ganho de peso é importantíssimo para estratégias de prevenção da obesidade, assim como estabelecer o uso de melatonina em situações potenciais que possam envolver redução de TAM levando a ganho de peso no longo prazo, como, por exemplo, em pacientes tratados com antipsicóticos. Seria interessante estudar se os bons efeitos vistos com melatonina em estudos clínicos de pacientes em uso de antipsicóticos envolve um efeito no TAM, uma vez que alguns estudos sugerem que essas medicações reduzem o TAM, como anteriormente exposto.

7 CONCLUSÕES

A melatonina participa da ativação do tecido adiposo marrom avaliada por captação de PET-FDG em animais e em humanos com deficiência de melatonina.

Ratos pinealectomizados apresentaram aumento menor de ativação de TAM avaliada pelo SUV máximo da captação de PET-TC após exposição ao frio agudo, comparado ao exame em temperatura ambiente que ratos controles ou que ratos pinealectomizados em reposição noturna de melatonina. Portanto, a ausência de melatonina reduz o potencial termogênico do TAM após exposição aguda ao frio, e sua reposição restabelece esse potencial, comparado a animais controles.

A pinealectomia promoveu redução da expressão de RNAm de UCP-1 dos animais, em comparação com ratos controles e a reposição exógena de melatonina noturna aumentou a expressão de UCP-1 tanto em animais pinealectomizados como em controles.

Em homens com ausência de secreção rítmica de melatonina por tratamento de tumores de pineal, a suplementação com melatonina 3 mg aumentou o volume e a atividade da gordura marrom avaliados por PET-RM. Os resultados analisados por TIV também demonstraram aumento de atividade de TAM após suplementação de melatonina, porém a correlação moderada entre o PET-FDG, o padrão-ouro, e a TIV sugere que essa última deva ser mais estudada, talvez com protocolos de frio diferentes.

Também foi observada redução do colesterol total e triglicérides após suplementação com melatonina, porém sem redução de glicemia e de gordura hepática. Houve uma redução significativa de colesterol total e triglicérides.

Anexo A - Volume de TAM (mL) e atividade total de TAM (mLxSUV médio), antes e após a suplementação de melatonina, considerando o limiar para detecção de TAM um SUV>1,5

	Volume de TAM (mL)		Razão de incremento
	Basal	Pós-mel	
Paciente 1	95,5	217,4	2,27
Paciente 2	813	986	1,21
Paciente 3	556	816,8	1,46
Paciente 4	410,8	860,6	2,09
	Atividade total de TAM (mLxSUV médio)		Razão de incremento
	Basal	Pós-mel	
Paciente 1	214,8	514,4	2,39
Paciente 2	3175	3618	1,13
Paciente 3	1170,8	1644	1,4
Paciente 4	796,7	1752,1	2,16

p=0,0399*

*estatisticamente significativo

Anexo B - volume de TAM (mL), antes e após a suplementação de melatonina, considerando o limiar para detecção de TAM um SUV>1,5

$p=0,0399^*$

*estatisticamente significativo

Anexo C - Atividade de TAM (mL vs SUV médio) antes e após a suplementação de melatonina, considerando o limiar para detecção de TAM um SUV>1,5

p=0,0319*

*estatisticamente significativo

Anexo D - Teste de correlação (Pearson) entre IMC inicial e volume de TAM no basal

$r=-0.1865$

$p= 0,8135$

Anexo E - Teste de correlação (Pearson) entre a razão de aumento de volume de TAM pós-melatonina e o IMC inicial dos pacientes

$r = -0.28$

$p = 0.71$

9 REFERÊNCIAS

1. Halpern B, Mancini MC, Halpern A. Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(9):889-99.
2. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.
3. Tam CS, Lecoultre V, Ravussin E. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. *Circulation*. 2012;125(22):2782-91.
4. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1509-17.
5. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-8.
6. Himms-Hagen J. Obesity may be due to a malfunctioning of brown fat. *Can Med Assoc J*. 1979;121(10):1361-4.

7. Yoshioka K, Yoshida T, Kondo M. Reduced brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate in pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. *Endocrinol Jpn.* 1991;38(1):75-9.
8. Seale P, Lazar MA. Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes.* 2009;58(7):1482-4.
9. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet.* 2016;387(10026):1377-96.
10. Davis RAH, Plaisance EP, Allison DB. Complementary Hypotheses on Contributors to the Obesity Epidemic. *Obesity (Silver Spring).* 2018;26(1):17-21.
11. Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, Ruden D, Pietrobelli A, Barger JL, Fontaine KR, Wang C, Aronne LJ, Wright SM, Baskin M, Dhurandhar NV, Lijoi MC, Grilo CM, DeLuca M, Westfall AO, Allison DB. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond).* 2006;30(11):1585-94.
12. Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(2):143-9.

13. Boss O, Farmer SR. Recruitment of brown adipose tissue as a therapy for obesity-associated diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:14.
14. Saito M. Brown adipose tissue as a therapeutic target for human obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(6):e432-8.
15. Rybnikova NA, Haim A, Portnov BA. Does artificial light-at-night exposure contribute to the worldwide obesity pandemic? *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(5):815-23.
16. Cho Y, Ryu SH, Lee BR, Kim KH, Lee E, Choi J. Effects of artificial light at night on human health: A literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment. *Chronobiol Int*. 2015;32(9):1294-310.
17. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004;25(3-4):177-95.
18. Hatori M, Gronfier C, Van Gelder RN, Bernstein PS, Carreras J, Panda S, Marks F, Sliney D, Hunt CE, Hirota T, Furukawa T, Tsubota K. Global rise of potential health hazards caused by blue light-induced circadian disruption in modern aging societies. *NPJ Aging Mech Dis*. 2017;3:9.
19. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. 2014;56(4):371-81.

20. Erren TC, Reiter RJ. Melatonin: a universal time messenger. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015;36(3):187-92.
21. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991;79(1-3):C153-8.
22. Reid KJ, Santostasi G, Baron KG, Wilson J, Kang J, Zee PC. Timing and intensity of light correlate with body weight in adults. *PLoS One.* 2014;9(4):e92251.
23. Chepesiuk R. Missing the dark: health effects of light pollution. *Environ Health Perspect.* 2009;117(1):A20-7.
24. Diaz B, Blázquez E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm Metab Res.* 1986;18(4):225-9.
25. Mellado C, Rodríguez V, de Diego JG, Alvarez E, Blázquez E. Effect of pinealectomy and of diabetes on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J Pineal Res.* 1989;6(4):295-306.
26. Cipolla-Neto J. *O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais, periféricas e a regulação da função metabólica.* Projeto Temático FAPESP. 2016.
27. Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009;10(4):261-70.

28. Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2002;33(3):156-60.
29. Ha E, Yim SV, Chung JH, Yoon KS, Kang I, Cho YH, Baik HH. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J Pineal Res.* 2006;41(1):67-72.
30. Tan DX, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, Reiter RJ. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes Rev.* 2011;12(3):167-88.
31. Bartness TJ, Wade GN. Photoperiodic control of body weight and energy metabolism in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): role of pineal gland, melatonin, gonads, and diet. *Endocrinology.* 1984;114(2):492-8.
32. Andrews RV, Belknap RW. Metabolic and thermoregulatory effects of photoperiod and melatonin on *Peromyscus maniculatus* acclimatization. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1985;82(3):725-9.
33. Bartness TJ, Goldman BD. Peak duration of serum melatonin and short-day responses in adult Siberian hamsters. *Am J Physiol.* 1988;255(5 Pt 2):R812-22.

34. Bartness TJ, Demas GE, Song CK. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(6):363-76.
35. Dark J, Zucker I, Wade GN. Photoperiodic regulation of body mass, food intake, and reproduction in meadow voles. *Am J Physiol*. 1983;245(3):R334-8.
36. Lynch GR, Epstein AL. Melatonin induced changes in gonads; pelage and thermogenic characters in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Comp Biochem Physiol C*. 1976;53(2):67-8.
37. Zhang L, Zhu W, Wang Z. Role of photoperiod on hormone concentrations and adaptive capacity in tree shrews, *Tupaia belangeri*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2012;163(3-4):253-9.
38. Wade GN, Bartness TJ. Seasonal obesity in Syrian hamsters: effects of age, diet, photoperiod, and melatonin. *Am J Physiol*. 1984;247(2 Pt 2):R328-34.
39. Fernández Vázquez G, Reiter RJ, Agil A. Melatonin increases brown adipose tissue mass and function in Zucker diabetic fatty rats: implications for obesity control. *J Pineal Res*. 2018:e12472.
40. Heldmaier G, Hoffmann K. Melatonin stimulates growth of brown adipose tissue. *Nature*. 1974;247(5438):224-5.

41. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L, Pénicaud L. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003;144(12):5347-52.
42. Cannon B, Nedergaard J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. *Essays Biochem*. 1985;20:110-64.
43. Betz MJ, Enerbäck S. Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*. 2015;64(7):2352-60.
44. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212:E20-36.
45. Matthias A, Ohlson KB, Fredriksson JM, Jacobsson A, Nedergaard J, Cannon B. Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25073-81.
46. Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature*. 1984;309(5964):163-5.
47. Chechi K, Nedergaard J, Richard D. Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev*. 2014;15(2):92-106.
48. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*. 1979;281(5726):31-5.

49. Hibi M, Oishi S, Matsushita M, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, Yasunaga K, Katsuragi Y, Kubota K, Tanaka S, Saito M. Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(11):1655-61.
50. Okla M, Kim J, Koehler K, Chung S. Dietary Factors Promoting Brown and Beige Fat Development and Thermogenesis. *Adv Nutr*. 2017;8(3):473-83.
51. Stock MJ, Rothwell NJ. The role of brown fat in diet-induced thermogenesis. *Int J Vitam Nutr Res*. 1986;56(2):205-10.
52. Wijers SL, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD. Individual thermogenic responses to mild cold and overfeeding are closely related. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(11):4299-305.
53. Cinti S. Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord*. 2000;5(3):132-42.
54. Ravussin E, Galgani JE. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr*. 2011;31:33-47.
55. Lee P, Swarbrick MM, Ho KK. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocr Rev*. 2013;34(3):413-38.
56. Smith RE, Hock RJ. Brown fat: thermogenic effector of arousal in hibernators. *Science*. 1963;140(3563):199-200.

-
57. Smith RE. Thermoregulatory And adaptive behavior of brown adipose tissue. *Science*. 1964;146(3652):1686-9.
 58. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1518-25.
 59. Dawkins MJ, Scopes JW. Non-shivering thermogenesis and brown adipose tissue in the human new-born infant. *Nature*. 1965;206(980):201-2.
 60. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444-52.
 61. Celi FS. Brown adipose tissue - When it pays to be inefficient. *N Engl J Med*. 2009;360:1553-6.
 62. Santhanam P, Treglia G, Ahima RS. Detection of brown adipose tissue by 18 F-FDG PET/CT in pheochromocytoma/paraganglioma: A systematic review. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2018;20(3):615.
 63. Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, Schöder H, Larson SM. Patterns of (18)F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J Nucl Med*. 2003;44(11):1789-96.
 64. Basu S, Hess S, Nielsen Braad PE, Olsen BB, Inglev S, Høilund-Carlsen PF. The Basic Principles of FDG-PET/CT Imaging. *PET Clin*. 2014;9(4):355-70.

65. Hess S, Blomberg BA, Zhu HJ, Høilund-Carlsen PF, Alavi A. The pivotal role of FDG-PET/CT in modern medicine. *Acad Radiol*. 2014;21(2):232-49.
66. Lean ME, James WP, Jennings G, Trayhurn P. Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. *Int J Obes*. 1986;10(3):219-27.
67. Barrington SF, Maisey MN. Skeletal muscle uptake of fluorine-18-FDG: effect of oral diazepam. *J Nucl Med*. 1996;37(7):1127-9.
68. Hadi M, Chen CC, Whatley M, Pacak K, Carrasquillo JA. Brown fat imaging with (18)F-6-fluorodopamine PET/CT, (18)F-FDG PET/CT, and (123)I-MIBG SPECT: a study of patients being evaluated for pheochromocytoma. *J Nucl Med*. 2007;48(7):1077-83.
69. Peirce V, Vidal-Puig A. Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(4):353-60.
70. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, Scheinin M, Taittonen M, Niemi T, Enerbäck S, Virtanen KA. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*. 2011;14(2):272-9.
71. Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D, Carpentier AC. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*. 2012;122(2):545-52.

-
72. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Saito M. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(1):13-6.
 73. Cannon B, Nedergaard J. Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight control. *Proc Nutr Soc*. 2009;68(4):401-7.
 74. Stock MJ. Gluttony and thermogenesis revisited. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23(11):1105-17.
 75. Vosselman MJ, Brans B, van der Lans AA, Wiers R, van Baak MA, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Brown adipose tissue activity after a high-calorie meal in humans. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(1):57-64.
 76. Pasanisi F, Pace L, Fonti R, Marra M, Sgambati D, De Caprio C, De Filippo E, Vaccaro A, Salvatore M. Evidence of brown fat activity in constitutional leanness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):1214-8.
 77. Kozak LP. Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell Metab*. 2010;11(4):263-7.
 78. Cohade C, Osman M, Pannu HK, Wahl RL. Uptake in supraclavicular area fat ("USA-Fat"): description on 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med*. 2003;44(2):170-6.

79. Au-Yong IT, Thorn N, Ganatra R, Perkins AC, Symonds ME. Brown adipose tissue and seasonal variation in humans. *Diabetes*. 2009;58(11):2583-7.
80. Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhali-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, Richard D. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):192-9.
81. Lee P, Ho KK, Fulham MJ. The importance of brown adipose tissue. *N Engl J Med*. 2009;361(4):418; author reply 9-20.
82. Stefan N, Pfannenberger C, Häring HU. The importance of brown adipose tissue. *N Engl J Med*. 2009;361(4):416-7.
83. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58(7):1526-31.
84. Griggio MA. The participation of shivering and nonshivering thermogenesis in warm and cold-acclimated rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1982;73(3):481-4.

85. Foster DO, Frydman ML. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 1979;57(3):257-70.
86. Depocas F, Hart JS, Heroux O. Cold acclimation and the electromyogram of unanesthetized rats. *J Appl Physiol.* 1956;9(3):404-8.
87. Katoch SS, Soni A. Changes in myosin ATPase activity in skeletal muscles of rat during cold stress. *Indian J Biochem Biophys.* 1999;36(3):204-6.
88. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3404-8.
89. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, Hansen J, Jörgensen JA, Wu J, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3395-403.
90. Bartness TJ, Wade GN. Body weight, food intake and energy regulation in exercising and melatonin-treated Siberian hamsters. *Physiol Behav.* 1985;35(5):805-8.

91. George JC. Thermogenesis in the avian body and the role of the pineal in thermoregulation. *Prog Clin Biol Res.* 1982;92:217-31.
92. Wade GN, Bartness TJ, Alexander JR. Photoperiod and body weight in female Syrian hamsters: skeleton photoperiods, response magnitude, and development of photorefractoriness. *Physiol Behav.* 1986;37(6):863-8.
93. Viswanathan M, Hissa R, George JC. Effects of short photoperiod and melatonin treatment on thermogenesis in the Syrian hamster. *J Pineal Res.* 1986;3(4):311-21.
94. Sinnamon WB, Pivorun EB. Melatonin induces hypertrophy of brown adipose tissue in *Spermophilus tridecemlineatus*. *Cryobiology.* 1981;18(6):603-7.
95. Le Gouic S, Atgié C, Viguerie-Bascands N, Hanoun N, Larrouy D, Ambid L, Raimbault S, Ricquier D, Delagrangé P, Guardiola-Lemaitre B, Pénicaud L, Casteilla L. Characterization of a melatonin binding site in Siberian hamster brown adipose tissue. *Eur J Pharmacol.* 1997;339(2-3):271-8.
96. Enerbäck S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med.* 2009;360(19):2021-3.
97. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454(7207):961-7.

-
98. Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*. 2008;322(5901):583-6.
 99. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
 100. Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res*. 2007;48(1):41-51.
 101. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
 102. Marlatt KL, Ravussin E. Brown adipose tissue: an update on recent findings. *Curr Obes Rep*. 2017;6(4):389-96.
 103. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*. 2013;62(6):1774-82.
 104. Cohen P, Spiegelman BM. Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes*. 2015;64(7):2346-51.

105. Cohen P, Spiegelman BM. Cell biology of fat storage. *Mol Biol Cell*. 2016;27(16):2523-7.
106. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev*. 2012;13 Suppl 2:83-96.
107. Lidell ME, Betz MJ, Enerbäck S. Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *J Intern Med*. 2014;276(4):364-77.
108. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):969-85.
109. Broeders E, Bouvy ND, van Marken Lichtenbelt WD. Endogenous ways to stimulate brown adipose tissue in humans. *Ann Med*. 2015;47(2):123-32.
110. Hanssen MJ, van der Lans AA, Brans B, Hoeks J, Jardon KM, Schaart G, Mottaghy FM, Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD. Short-term cold acclimation recruits brown adipose tissue in obese humans. *Diabetes*. 2016;65(5):1179-89.
111. Hanssen MJ, Hoeks J, Brans B, van der Lans AA, Schaart G, van den Driessche JJ, Jörgensen JA, Boekschoten MV, Hesselink MK, Havekes B, Kersten S, Mottaghy FM, van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat Med*. 2015;21(8):863-5.

112. Yoneshiro T, Aita S, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M. Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(4):845-50.
113. Baskaran P, Krishnan V, Ren J, Thyagarajan B. Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2016;173(15):2369-89.
114. Lizcano F, Vargas D. Biology of Beige Adipocyte and Possible Therapy for Type 2 Diabetes and Obesity. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:9542061.
115. Bray GA. Medical treatment of obesity: the past, the present and the future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28(4):665-84.
116. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Franquet Elía E, Kessler SH, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A, Kolodny GM. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* 2015;21(1):33-8.
117. Contreras GA, Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG. Inducible brown adipocytes in subcutaneous inguinal white fat: the role of continuous sympathetic stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(9):E793-9.

118. Broeders EP, Nascimento EB, Havekes B, Brans B, Roumans KH, Tailleux A, Schaart G, Kouach M, Charton J, Deprez B, Bouvy ND, Mottaghy F, Staels B, van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P. The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity. *Cell Metab.* 2015;22(3):418-26.
119. Teodoro JS, Zouhar P, Flachs P, Bardova K, Janovska P, Gomes AP, Duarte FV, Varela AT, Rolo AP, Palmeira CM, Kopecký J. Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(8):1027-34.
120. Zietak M, Kozak LP. Bile acids induce uncoupling protein 1-dependent thermogenesis and stimulate energy expenditure at thermoneutrality in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;310(5):E346-54.
121. Docherty NG, Le Roux CW. Physiological adaptations following Roux-en-Y gastric bypass and the identification of targets for bariatric mimetic pharmacotherapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2015;25:23-9.
122. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463-8.
123. Saini S, Duraisamy AJ, Bayen S, Vats P, Singh SB. Role of BMP7 in appetite regulation, adipogenesis, and energy expenditure. *Endocrine.* 2015;48(2):405-9.

124. Kwon MM, O'Dwyer SM, Baker RK, Covey SD, Kieffer TJ. FGF21-Mediated Improvements in Glucose Clearance Require Uncoupling Protein 1. *Cell Rep.* 2015;13(8):1521-7.
125. Andrade JM, Frade AC, Guimarães JB, Freitas KM, Lopes MT, Guimarães AL, de Paula AM, Coimbra CC, Santos SH. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr.* 2014;53(7):1503-10.
126. Cizza G, Requena M, Galli G, de Jonge L. Chronic sleep deprivation and seasonality: implications for the obesity epidemic. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(10):793-800.
127. Bechtold DA, Sidibe A, Saer BR, Li J, Hand LE, Ivanova EA, Darras VM, Dam J, Jockers R, Luckman SM, Loudon AS. A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Curr Biol.* 2012;22(1):70-7.
128. Ginter E, Simko V. Brown fat tissue - a potential target to combat obesity. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(1):52-6.
129. Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, Reiter RJ, Agil A. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2013;55(4):416-23.

130. López-Muñoz F, Rubio G, Molina JD, Alamo C. The pineal gland as physical tool of the soul faculties: a persistent historical connection. *Neurología*. 2012;27(3):161-8.
131. Shoja MM, Hoepfner LD, Agutter PS, Singh R, Tubbs RS. History of the pineal gland. *Childs Nerv Syst*. 2016;32(4):583-6.
132. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res*. 2011;51(1):17-43.
133. Tricoire H, Møller M, Chemineau P, Malpoux B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl*. 2003;61:311-21.
134. Ozaki Y, Lynch HJ. Presence of melatonin in plasma and urine or pinealectomized rats. *Endocrinology*. 1976;99(2):641-4.
135. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 2003;55(2):325-95.
136. Higuchi S, Nagafuchi Y, Lee SI, Harada T. Influence of light at night on melatonin suppression in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3298-303.

-
137. Tosini G, Ferguson I, Tsubota K. Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. *Mol Vis*. 2016;22:61-72.
138. Cajochen C, Frey S, Anders D, Späti J, Bues M, Pross A, Mager R, Wirz-Justice A, Stefani O. Evening exposure to a light-emitting diodes (LED)-backlit computer screen affects circadian physiology and cognitive performance. *J Appl Physiol (1985)*. 2011;110(5):1432-8.
139. Smolensky MH, Sackett-Lundeen LL, Portaluppi F. Nocturnal light pollution and underexposure to daytime sunlight: Complementary mechanisms of circadian disruption and related diseases. *Chronobiol Int*. 2015;32(8):1029-48.
140. Illnerová H, Sumová A, Trávníčková Z, Jác M, Jelínková D. Hormones, subjective night and season of the year. *Physiol Res*. 2000;49 Suppl 1:S1-10.
141. Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med*. 1998;30(1):103-8.
142. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*. 1972;91(5):1213-8.
143. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms*. 2005;20(4):291-303.
144. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, Middleton B, Murphy PJ, Parry BL, Revell V. Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med*. 2008;4(1):66-9.

145. Hofstra WA, de Weerd AW. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. *Epilepsy Behav.* 2008;13(3):438-44.
146. Salti R, Galluzzi F, Bindi G, Perfetto F, Tarquini R, Halberg F, Cornélissen G. Nocturnal melatonin patterns in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(6):2137-44.
147. Arendt J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):21-37.
148. Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57 Suppl 5:19-39.
149. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M, Schemper M, Frisch H. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66(3):648-52.
150. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Balcioglu A, Kartashov AI, Lynch HJ. Endogenous melatonin levels and the fate of exogenous melatonin: age effects. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1998;53(4):B293-8.
151. de Almeida EA, Di Mascio P, Harumi T, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, Cardinali DP, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Measurement of melatonin in body fluids: standards, protocols and procedures. *Childs Nerv Syst.* 2011;27(6):879-91.

152. Lang U, Kornemark M, Aubert ML, Paunier L, Sizonenko PC. Radioimmunological determination of urinary melatonin in humans: correlation with plasma levels and typical 24-hour rhythmicity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53(3):645-50.
153. Baskett JJ, Cockrem JF, Antunovich TA. Sulphatoxymelatonin excretion in older people: relationship to plasma melatonin and renal function. *J Pineal Res.* 1998;24(1):58-61.
154. Nowak R, McMillen IC, Redman J, Short RV. The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1987;27(4):445-52.
155. McMullan CJ, Schernhammer ES, Rimm EB, Hu FB, Forman JP. Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA.* 2013;309(13):1388-96.
156. Leger D, Laudon M, Zisapel N. Nocturnal 6-sulfatoxymelatonin excretion in insomnia and its relation to the response to melatonin replacement therapy. *Am J Med.* 2004;116(2):91-5.
157. Reutrakul S, Siwasaranond N, Nimitphong H, Saetung S, Chirakalwasan N, Chailurkit LO, Srijaruskul K, Ongphiphadhanakul B, Thakkestian A. Associations between nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin, obstructive sleep apnea severity and glycemic control in type 2 diabetes. *Chronobiol Int.* 2017;34(3):382-92.

158. Xu J, Huang L, Sun GP. Urinary 6-sulfatoxymelatonin level and breast cancer risk: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5353.
159. Tordjman S, Anderson GM, Pichard N, Charbuy H, Touitou Y. Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(2):134-8.
160. van Faassen M, Bischoff R, Kema IP. Relationship between plasma and salivary melatonin and cortisol investigated by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(9):1340-8.
161. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett*. 1996;386(2-3):219-24.
162. Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*. 1988;242(4875):78-81.
163. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(2):152-66.
164. Vincent L, Cohen W, Delagrangé P, Boutin JA, Nosjean O. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. *J Pineal Res*. 2010;48(3):222-9.

165. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*. 2006;126(4):801-10.
166. Lewy AJ. Melatonin and human chronobiology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:623-36.
167. Peschke E, Mühlbauer E. New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(5):829-41.
168. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res*. 2000;28(3):156-64.
169. Mühlbauer E, Albrecht E, Hofmann K, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E. Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *J Pineal Res*. 2011;51(3):361-72.
170. Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res*. 2002;33(3):172-7.
171. Pevet P, Klosen P, Felder-Schmittbuhl MP. The hormone melatonin: Animal studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017;31(6):547-59.

172. Ng KY, Leong MK, Liang H, Paxinos G. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct*. 2017;222(7):2921-39.
173. Schulz P, Steimer T. Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs*. 2009;23 Suppl 2:3-13.
174. Saarela S, Reiter RJ. Function of melatonin in thermoregulatory processes. *Life Sci*. 1994;54(5):295-311.
175. Milcu I, Nanu L, Marcean R, Sitaru S. The action of pineal extract and epiphysectomy on hepatic and muscular glycogen after prolonged infusion of glucose. *Stud Cercet Endocrinol*. 1963;14:651-5.
176. Rodríguez V, Mellado C, Alvarez E, De Diego JG, Blázquez E. Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat. *J Pineal Res*. 1989;6(1):77-88.
177. Nogueira TC, Lellis-Santos C, Jesus DS, Taneda M, Rodrigues SC, Amaral FG, Lopes AM, Cipolla-Neto J, Bordin S, Anê GF. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. *Endocrinology*. 2011;152(4):1253-63.
178. Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SMF, SM, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJ, Carvalho CR, Cipolla-Neto J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1998;275(6):E934-E41.

179. Contreras-Alcantara S, Baba K, Tosini G. Removal of melatonin receptor type 1 induces insulin resistance in the mouse. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(9):1861-3.
180. Mendes C, Lopes AM, do Amaral FG, Peliciari-Garcia RA, Turati AeO, Hirabara SM, Scialfa Falcão JH, Cipolla-Neto J. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *J Pineal Res*. 2013;55(3):229-39.
181. Buonfiglio D, Parthimos R, Dantas R, Cerqueira Silva R, Gomes G, Andrade-Silva J, Ramos-Lobo A, Amaral FG, Matos R, Sinésio J Jr, Motta-Teixeira LC, Donato J Jr, Reiter RJ, Cipolla-Neto J. Melatonin absence leads to long-term leptin resistance and overweight in rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:122.
182. Zanquetta MM, Seraphim PM, Sumida DH, Cipolla-Neto J, Machado UF. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res*. 2003;35(3):141-8.
183. Picinato MC, Hirata AE, Cipolla-Neto J, Curi R, Carvalho CR, Anê GF, Carpinelli AR. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J Pineal Res*. 2008;44(1):88-94.
184. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res*. 2008;44(1):26-40.

185. Kemp DM, Ubeda M, Habener JF. Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;191(2):157-66.
186. Rakshit K, Qian J, Colwell CS, Matveyenko AV. The islet circadian clock: entrainment mechanisms, function and role in glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17 Suppl 1:115-22.
187. Nishiyama K, Hirai K. The melatonin agonist ramelteon induces duration-dependent clock gene expression through cAMP signaling in pancreatic INS-1 β -cells. *PLoS One.* 2014;9(7):e102073.
188. Brydon L, Petit L, Delagrangé P, Strosberg AD, Jockers R. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology.* 2001;142(10):4264-71.
189. Alonso-Vale MI, Andreotti S, Borges-Silva C, Mukai PY, Cipolla-Neto J, Lima FB. Intermittent and rhythmic exposure to melatonin in primary cultured adipocytes enhances the insulin and dexamethasone effects on leptin expression. *J Pineal Res.* 2006;41(1):28-34.
190. Alonso-Vale MI, Andreotti S, Mukai PY, Borges-Silva C, Peres SB, Cipolla-Neto J, Lima FB. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pineal Res.* 2008;45(4):422-9.

191. Zhdanova IV, Tucci V. Melatonin, Circadian Rhythms, and Sleep. *Curr Treat Options Neurol*. 2003;5(3):225-9.
192. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2133-41.
193. Gibson T, Jarrett RJ. Diurnal variation in insulin sensitivity. *Lancet*. 1972;2(7784):947-8.
194. Alonso-Vale MI, Borges-Silva CN, Anê GF, Andreotti S, Machado MA, Cipolla-Neto J, Lima FB. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. *Horm Metab Res*. 2004;36(7):474-9.
195. Gibson T, Stimmeler L, Jarrett RJ, Rutland P, Shiu M. Diurnal variation in the effects of insulin on blood glucose, plasma non-esterified fatty acids and growth hormone. *Diabetologia*. 1975;11(1):83-8.
196. Delattre E, Cipolla-Neto J, Boscher AC. Diurnal variations in insulin secretion and K⁺ permeability in isolated rat islets. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(7):505-10.
197. Ferreira DS, Amaral FG, Mesquita CC, Barbosa AP, Lellis-Santos C, Turati AO, Santos LR, Sollon CS, Gomes PR, Faria JA, Cipolla-Neto J, Bordin S, Anê GF. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. *PLoS One*. 2012;7(6):e38795.

198. Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P, Scherrer U, Duplain H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology*. 2009;150(12):5311-7.
199. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology*. 1999;140(2):1009-12.
200. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology*. 2000;141(2):487-97.
201. Cardinali DP, Pagano ES, Scacchi Bernasconi PA, Reynoso R, Scacchi P. Disrupted chronobiology of sleep and cytoprotection in obesity: possible therapeutic value of melatonin. *Neuro Endocrinol Lett*. 2011;32(5):588-606.
202. Persaud SJ, Jones PM. A Wake-up Call for Type 2 Diabetes? *N Engl J Med*. 2016;375(11):1090-2.
203. Bonnefond A, Froguel P. The case for too little melatonin signalling in increased diabetes risk. *Diabetologia*. 2017;60(5):823-5.

204. Wang HR, Woo YS, Bahk WM. The role of melatonin and melatonin agonists in counteracting antipsychotic-induced metabolic side effects: a systematic review. *Int Clin Psychopharmacol*. 2016;31(6):301-6.
205. Rastmanesh R, de Bruin PF. Potential of melatonin for the treatment or prevention of obesity: an urgent need to include weight reduction as a secondary outcome in clinical trials of melatonin in obese patients with sleep disorders. *Contemp Clin Trials*. 2012;33(4):574-5.
206. . Nelson RJ, Chbeir S .Dark matters: effects of light at night on metabolism.*Proc Nutr Soc*. 2018 [publicado antes de impresso]
207. McHill AW, Melanson EL, Higgins J, Connick E, Moehlman TM, Stothard ER, Wright KP Jr. Impact of circadian misalignment on energy metabolism during simulated nightshift work. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(48):17302-7.
208. Spiegel K, Knutson K, Leproult R, Tasali E, Van Cauter E. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;99(5):2008-19.
209. Beccuti G, Pannain S. Sleep and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(4):402-12.
210. Villareal DT, Banks M, Siener C, Sinacore DR, Klein S. Physical frailty and body composition in obese elderly men and women. *Obes Res*. 2004;12(6):913-20.

211. Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C, Sparsø T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chèvre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruukonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jørgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Lévy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AJ, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2009;41(1):89-94.
212. Bonnefond A, Froguel P. Disentangling the Role of Melatonin and its Receptor MTNR1B in Type 2 Diabetes: Still a Long Way to Go? *Curr Diab Rep.* 2017;17(12):122.
213. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet.* 2009;41(1):82-8.
214. Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, Raimondo A, Mägi R, Reschen ME, et al. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet.* 2015;47(12):1415-25.

215. Müssig K, Staiger H, Machicao F, Häring HU, Fritsche A. Genetic variants in MTNR1B affecting insulin secretion. *Ann Med*. 2010;42(6):387-93.
216. Peschke E, Bähr I, Mühlbauer E. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):6981-7015.
217. Tuomi T, Nagorny CLF, Singh P, Bennet H, Yu Q, Alenkvist I, Isomaa B, Östman B, Söderström J, Pesonen AK, Martikainen S, Räikkönen K, Forsén T, Hakaste L, Almgren P, Storm P, Asplund O, Shcherbina L, Fex M, Fadista J, Tengholm A, Wierup N, Groop L, Mulder H. Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2016;23(6):1067-77.
218. Nagorny C, Lyssenko V. Tired of diabetes genetics? Circadian rhythms and diabetes: the MTNR1B story? *Curr Diab Rep*. 2012;12(6):667-72.
219. Cardinali DP, Hardeland R. Inflammaging, Metabolic Syndrome and Melatonin: A Call for Treatment Studies. *Neuroendocrinology*. 2017;104(4):382-97.
220. Grossman E, Laudon M, Zisapel N. Effect of melatonin on nocturnal blood pressure: meta-analysis of randomized controlled trials. *Vasc Health Risk Manag*. 2011;7:577-84.
221. Grossman E, Laudon M, Yalcin R, Zengil H, Peleg E, Sharabi Y, Kamari Y, Shen-Orr Z, Zisapel N. Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *Am J Med*. 2006;119(10):898-902.

222. Grossman E. Should melatonin be used to lower blood pressure? *Hypertens Res.* 2013;36(8):682-3.
223. Boggia J, Li Y, Thijs L, Hansen TW, Kikuya M, Björklund-Bodegård K, Richart T, Ohkubo T, Kuznetsova T, Torp-Pedersen C, Lind L, Ibsen H, Imai Y, Wang J, Sandoya E, O'Brien E, Staessen JA; International Database on Ambulatory blood pressure monitoring in relation to Cardiovascular Outcomes (IDACO). Prognostic accuracy of day versus night ambulatory blood pressure: a cohort study. *Lancet.* 2007;370(9594):1219-29.
224. Yano Y, Kario K. Nocturnal blood pressure and cardiovascular disease: a review of recent advances. *Hypertens Res.* 2012;35(7):695-701.
225. Mohammadi-Sartang M, Ghorbani M, Mazloom Z. Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2017.
226. Tamura H, Nakamura Y, Narimatsu A, Yamagata Y, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N. Melatonin treatment in peri- and postmenopausal women elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels without influencing total cholesterol levels. *J Pineal Res.* 2008;45(1):101-5.
227. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011;51(1):1-16.

228. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli F. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*. 2010;24(10):3603-24.
229. Bonnefont-Rousselot D. Obesity and oxidative stress: potential roles of melatonin as antioxidant and metabolic regulator. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2014;14(3):159-68.
230. Cichoz-Lach H, Celinski K, Konturek PC, Konturek SJ, Slomka M. The effects of L-tryptophan and melatonin on selected biochemical parameters in patients with steatohepatitis. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(5):577-80.
231. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, Mularczyk A, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. The effects of long-term melatonin treatment on plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *J Physiol Pharmacol*. 2012;63(1):35-40.
232. Pakravan H, Ahmadian M, Fani A, Aghaee D, Brumanad S, Pakzad B. The Effects of Melatonin in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial. *Adv Biomed Res*. 2017;6:40.
233. Celinski K, Konturek PC, Slomka M, Cichoz-Lach H, Brzozowski T, Konturek SJ, Korolczuk A. Effects of treatment with melatonin and tryptophan on liver enzymes, parameters of fat metabolism and plasma levels of cytokines in patients with non-alcoholic fatty liver disease--14 months follow up. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(1):75-82.

234. Goyal A, Terry PD, Superak HM, Nell-Dybdahl CL, Chowdhury R, Phillips LS, Kutner MH. Melatonin supplementation to treat the metabolic syndrome: a randomized controlled trial. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6:124.
235. Garfinkel D, Zorin M, Wainstein J, Matas Z, Laudon M, Zisapel N. Efficacy and safety of prolonged-release melatonin in insomnia patients with diabetes: a randomized, double-blind, crossover study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2011;4:307-13.
236. Nachtigal MC, Patterson RE, Stratton KL, Adams LA, Shattuck AL, White E. Dietary supplements and weight control in a middle-age population. *J Altern Complement Med*. 2005;11(5):909-15.
237. Mostafavi SA, Solhi M, Mohammadi MR, Akhondzadeh S. Melatonin for Reducing Weight Gain Following Administration of Atypical Antipsychotic Olanzapine for Adolescents with Bipolar Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2017;27(5):440-4.
238. Amstrup AK, Sikjaer T, Pedersen SB, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Reduced fat mass and increased lean mass in response to 1 year of melatonin treatment in postmenopausal women: A randomized placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;84(3):342-7.

239. Mostafavi A, Solhi M, Mohammadi MR, Hamedí M, Keshavarzi M, Akhondzadeh S. Melatonin decreases olanzapine induced metabolic side-effects in adolescents with bipolar disorder: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Acta Med Iran*. 2014;52(10):734-9.
240. Romo-Nava F, Buijs FN, Valdés-Tovar M, Benítez-King G, Basualdo M, Perusquía M, Heinze G, Escobar C, Buijs RM. Olanzapine-induced early cardiovascular effects are mediated by the biological clock and prevented by melatonin. *J Pineal Res*. 2017;62(4). doi: 10.1111/jpi.12402.
241. Chojnacki C, Walecka-Kapica E, Klupinska G, Pawlowicz M, Blonska A, Chojnacki J. Effects of fluoxetine and melatonin on mood, sleep quality and body mass index in postmenopausal women. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(5):665-71.
242. Agahi M, Akasheh N, Ahmadvand A, Akbari H, Izadpanah F. Effect of melatonin in reducing second-generation antipsychotic metabolic effects: a double blind controlled clinical trial. *Diabetes Metab Syndr*. 2018;12(1):9-15.
243. Porfirio MC, Gomes de Almeida JP, Stornelli M, Giovinnazzo S, Purper-Ouakil D, Masi G. Can melatonin prevent or improve metabolic side effects during antipsychotic treatments? *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:2167-74.

244. Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS. Melatonergic drugs in development. *Clin Pharmacol*. 2014;6:127-37.
245. Schroeck JL, Ford J, Conway EL, Kurtzhals KE, Gee ME, Vollmer KA, Mergenhagen KA. Review of Safety and Efficacy of Sleep Medicines in Older Adults. *Clin Ther*. 2016;38(11):2340-72.
246. Riemann D, Baglioni C, Bassetti C, Bjorvatn B, Dolenc Groselj L, Ellis JG, Espie CA, Garcia-Borreguero D, Gjerstad M, Gonçalves M, Hertenstein E, Jansson-Fröjmark M, Jennum PJ, Leger D, Nissen C, Parrino L, Paunio T, Pevernagie D, Verbraecken J, Weeß HG, Wichniak A, Zavalko I, Arnardottir ES, Deleanu OC, Strazisar B, Zoetmulder M, Spiegelhalder K. European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia. *J Sleep Res*. 2017;26(6):675-700.
247. Carpentieri A, Díaz de Barboza G, Areco V, Peralta López M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res*. 2012;65(4):437-44.
248. Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem*. 2010;17(19):2070-95.
249. Posadzki PP, Bajpai R, Kyaw BM, Roberts NJ, Brzezinski A, Christopoulos GI, Divakar U, Bajpai S, Soljak M, Dunleavy G, Jarbrink K, Nang EEK, Soh CK, Car J. Melatonin and health: an umbrella review of health outcomes and biological mechanisms of action. *BMC Med*. 2018;16(1):18.

250. Arendt J. Does melatonin improve sleep? Efficacy of melatonin. *BMJ*. 2006;332(7540):550.
251. Gurer-Orhan H, Suzen S. Melatonin, its metabolites and its synthetic analogs as multi-faceted compounds: antioxidant, prooxidant and inhibitor of bioactivation reactions. *Curr Med Chem*. 2015;22(4):490-9.
252. Osanai K, Kobayashi Y, Otsu M, Izawa T, Sakai K, Iwashita M. Ramelteon, a selective MT1/MT2 receptor agonist, suppresses the proliferation and invasiveness of endometrial cancer cells. *Hum Cell*. 2017;30(3):209-15.
253. Guardiola-Lemaitre B. Melatonergic receptor agonists and antagonists: therapeutic perspectives. *J Soc Biol*. 2007;201(1):105-13.
254. Sack RL. Clinical practice. Jet lag. *N Engl J Med*. 2010;362(5):440-7.
255. Bjorvatn B, Pallesen S. A practical approach to circadian rhythm sleep disorders. *Sleep Med Rev*. 2009;13(1):47-60.
256. *Sobre o uso e comercialização da melatonina no Brasil* [press release]. 2016.
257. Wilson SJ, Nutt DJ, Alford C, Argyropoulos SV, Baldwin DS, Bateson AN, Britton TC, Crowe C, Dijk DJ, Espie CA, Gringras P, Hajak G, Idzikowski C, Krystal AD, Nash JR, Selsick H, Sharpley AL, Wade AG. British Association for Psychopharmacology consensus statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders. *J Psychopharmacol*. 2010;24(11):1577-601.

258. Qaseem A, Kansagara D, Forciea MA, Cooke M, Denberg TD, Physicians CGCotACo. management of chronic insomnia disorder in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2016;165(2):125-33.
259. Zhdanova IV, Wurtman RJ, Regan MM, Taylor JA, Shi JP, Leclair OU. Melatonin treatment for age-related insomnia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4727-30.
260. Rajput V, Bromley SM. Chronic insomnia: a practical review. *Am Fam Physician.* 1999;60(5):1431-8.
261. Richardson G, Tate B. Hormonal and pharmacological manipulation of the circadian clock: recent developments and future strategies. *Sleep.* 2000;23 Suppl 3:S77-85.
262. Mottolese C, Szathmari A, Beuriat PA. Incidence of pineal tumours. A review of the literature. *Neurochirurgie.* 2015;61(2-3):65-9.
263. Navas-Garcia M, Goig-Revert F, Villarejo-Ortega FJ, Robla J, de Prada I, Madero L, Perez-Diaz C, Rivero-Martin MB, Pascual Martin-Gamero A, Budke M, Cordobes-Tapia F. Tumours in the pineal region in the paediatric age. Reports of 23 cases and a review of the literature. *Rev Neurol.* 2011;52(11):641-52.
264. Ben Ammar CN, Mnif D, Belghith B, Kochbati L, Frikha H, Gargouri W, Besbes M, Ben Abdallah M, Maalej M. Tumors of the pineal region: retrospective study of 40 cases. *Tunis Med.* 2010;88(10):714-20.

265. Scheer FA, Morris CJ, Garcia JI, Smales C, Kelly EE, Marks J, Malhotra A, Shea SA. Repeated melatonin supplementation improves sleep in hypertensive patients treated with beta-blockers: a randomized controlled trial. *Sleep*. 2012;35(10):1395-402.
266. Slawik H, Stoffel M, Riedl L, Veselý Z, Behr M, Lehmborg J, Pohl C, Meyer B, Wiegand M, Krieg SM. Prospective Study on Salivary Evening Melatonin and Sleep before and after Pinealectomy in Humans. *J Biol Rhythms*. 2016;31(1):82-93.
267. Májovský M, Řezáčová L, Sumová A, Pospíšilová L, Netuka D, Bradáč O, Beneš V. Melatonin and cortisol secretion profile in patients with pineal cyst before and after pineal cyst resection. *J Clin Neurosci*. 2017;39:155-63.
268. Neuwelt EA, Lewy AJ. Disappearance of plasma melatonin after removal of a neoplastic pineal gland. *N Engl J Med*. 1983;308(19):1132-5.
269. Lehmann ED, Cockerell OC, Rudge P. Somnolence associated with melatonin deficiency after pinealectomy. *Lancet*. 1996;347(8997):323.
270. Murata J, Sawamura Y, Ikeda J, Hashimoto S, Honma K. Twenty-four hour rhythm of melatonin in patients with a history of pineal and/or hypothalamo-neurohypophyseal germinoma. *J Pineal Res*. 1998;25(3):159-66.

271. Etzioni A, Luboshitzky R, Tiosano D, Ben-Harush M, Goldsher D, Lavie P. Melatonin replacement corrects sleep disturbances in a child with pineal tumor. *Neurology*. 1996;46(1):261-3.
272. Jan JE, Tai J, Hahn G, Rothstein RR. Melatonin replacement therapy in a child with a pineal tumor. *J Child Neurol*. 2001;16(2):139-40.
273. Krieg SM, Slawik H, Meyer B, Wiegand M, Stoffel M. Sleep disturbance after pinealectomy in patients with pineocytoma WHO I. *Acta Neurochir (Wien)*. 2012;154(8):1399-405.
274. Petterborg LJ, Thalén BE, Kjellman BF, Wetterberg L. Effect of melatonin replacement on serum hormone rhythms in a patient lacking endogenous melatonin. *Brain Res Bull*. 1991;27(2):181-5.
275. Fatourehchi V. Subclinical hypothyroidism: an update for primary care physicians. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(1):65-71.
276. Neary N, Nieman L. Adrenal insufficiency: etiology, diagnosis and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(3):217-23.
277. Barkan AL. The "quality of life-assessment of growth hormone deficiency in adults" questionnaire: can it be used to assess quality of life in hypopituitarism? *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(5):1905-7.
278. Hagelstein KA, Folk GE. Effects of photoperiod, cold acclimation and melatonin on the white rat. *Comp Biochem Physiol C*. 1979;62C(2):225-9.

279. Heldmaier G, Steinlechner S, Rafael J, Vsiansky P. Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. *Science*. 1981;212(4497):917-9.
280. Reiter RJ. Influence of pinealectomy on the breeding capability of hamsters maintained under natural photoperiodic and temperature conditions. *Neuroendocrinology*. 1974;13(6):366-70.
281. Smit-Vis JH. The effect of pinealectomy and of testosterone administration on the occurrence of hibernation in adult male golden hamsters. *Acta Morphol Neerl Scand*. 1972;10(3):269-82.
282. Ralph CL, Harlow HJ, Phillips JA. Delayed effect of pinealectomy on hibernation of the golden-mantled ground squirrel. *Int J Biometeorol*. 1982;26(4):311-28.
283. Wade GN, Bartness TJ. Effects of photoperiod and gonadectomy on food intake, body weight, and body composition in Siberian hamsters. *Am J Physiol*. 1984;246(1 Pt 2):R26-30.
284. Glass JD, Lynch GR. Evidence for a brain site of melatonin action in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Neuroendocrinology*. 1982;34(1):1-6.
285. Vaughan MK, Richardson BA, Johnson LY, Petterborg LJ, Powanda MC, Reiter RJ, Smith I. Natural and synthetic analogues of melatonin and related compounds. II. Effects on plasma thyroid hormones and cholesterol levels in male Syrian hamsters. *J Neural Transm*. 1983;56(4):279-91.

286. Holtorf AP, Heldmaier G, Thiele G, Steinlechner S. Diurnal changes in sensitivity to melatonin in intact and pinealectomized Djungarian hamsters: effects on thermogenesis, cold tolerance, and gonads. *J Pineal Res.* 1985;2(4):393-403.
287. Ryu V, Zarebidaki E, Albers HE, Xue B, Bartness TJ. Short photoperiod reverses obesity in Siberian hamsters via sympathetically induced lipolysis and Browning in adipose tissue. *Physiol Behav.* 2018;190:11-20.
288. Bamshad M, Song CK, Bartness TJ. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):R1569-78.
289. Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors.* 2009;35(2):183-92.
290. Aarseth JJ, Nordøy ES, Stokkan KA. Melatonin potentiates the vasoconstrictive effect of noradrenaline in renal artery from newborn hooded seals (*Cystophora cristata*) and harp seals (*Phoca groenlandica*). *J Comp Physiol B.* 2001;171(6):491-6.
291. Prunet-Marcassus B, Ambid L, Viguerie-Bascands N, Pénicaud L, Casteilla L. Evidence for a direct effect of melatonin on mitochondrial genome expression of Siberian hamster brown adipocytes. *J Pineal Res.* 2001;30(2):108-15.

292. Puig-Domingo M, Guerrero JM, Reiter RJ, Tannenbaum MJ, Hurlbut EC, Gonzalez-Brito A, Santana C. Thyroxine 5'-deiodination in brown adipose tissue and pineal gland: implications for thermogenic regulation and role of melatonin. *Endocrinology*. 1988;123(2):677-80.
293. Monteleone P, Fuschino A, Nofre G, Maj M. Temporal relationship between melatonin and cortisol responses to nighttime physical stress in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 1992;17(1):81-6.
294. Kostoglou-Athanassiou I, Treacher DF, Wheeler MJ, Forsling ML. Melatonin administration and pituitary hormone secretion. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48(1):31-7.
295. Haffen E. [Measuring circadian rhythm]. *Encephale*. 2009;35 Suppl 2:S63-7.
296. Ramachandran N, Smyth N, Thorn L, Eardley A, Evans P, Clow A. Relationship between post-awakening salivary cortisol and melatonin secretion in healthy participants. *Stress*. 2016;19(2):260-3.
297. Jung CM, Khalsa SB, Scheer FA, Cajochen C, Lockley SW, Czeisler CA, Wright KP Jr. Acute effects of bright light exposure on cortisol levels. *J Biol Rhythms*. 2010;25(3):208-16.
298. Ramage LE, Akyol M, Fletcher AM, Forsythe J, Nixon M, Carter RN, van Beek EJ, Morton NM, Walker BR, Stimson RH. Glucocorticoids Acutely Increase Brown Adipose Tissue Activity in Humans, Revealing Species-Specific Differences in UCP-1 Regulation. *Cell Metab*. 2016;24(1):130-41.

299. Lv YF, Yu J, Sheng YL, Huang M, Kong XC, Di WJ, Liu J, Zhou H, Liang H, Ding GX. Glucocorticoids Suppress the Browning of Adipose Tissue via miR-19b in Male Mice. *Endocrinology*. 2018;159(1):310-22.
300. Thuzar M, Law WP, Ratnasingam J, Jang C, Dimeski G, Ho KKY. Glucocorticoids suppress brown adipose tissue function in humans: A double-blind placebo-controlled study. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20(4):840-8.
301. Scotney H, Symonds ME, Law J, Budge H, Sharkey D, Manolopoulos KN. Glucocorticoids modulate human brown adipose tissue thermogenesis in vivo. *Metabolism*. 2017;70:125-32.
302. Kott KS, Horwitz BA. Photoperiod and pinealectomy do not affect cold-induced deposition of brown adipose tissue in the Long-Evans rat. *Cryobiology*. 1983;20(1):100-5.
303. van der Veen DR, Shao J, Chapman S, Leevy WM, Duffield GE. A diurnal rhythm in glucose uptake in brown adipose tissue revealed by in vivo PET-FDG imaging. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(7):1527-9.
304. Corbalán-Tutau D, Madrid JA, Nicolás F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiol Behav*. 2014;123:231-5.
305. Robeva R, Kirilov G, Tomova A, Kumanov P. Melatonin-insulin interactions in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res*. 2008;44(1):52-6.

306. Mäntele S, Otway DT, Middleton B, Bretschneider S, Wright J, Robertson MD, Skene DJ, Johnston JD. Daily rhythms of plasma melatonin, but not plasma leptin or leptin mRNA, vary between lean, obese and type 2 diabetic men. *PLoS One*. 2012;7(5):e37123.
307. Karlsson BH, Knutsson AK, Lindahl BO, Alfredsson LS. Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003;76(6):424-30.
308. Di Lorenzo L, De Pergola G, Zocchetti C, L'Abbate N, Basso A, Pannacciulli N, Cignarelli M, Giorgino R, Soleo L. Effect of shift work on body mass index: results of a study performed in 319 glucose-tolerant men working in a Southern Italian industry. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(11):1353-8.
309. Lee P, Bova R, Schofield L, Bryant W, Dieckmann W, Slattery A, Govendir MA, Emmett L. Brown adipose tissue exhibits a glucose-responsive thermogenic biorhythm in humans. *Cell Metab*. 2016;23(4):602-9.
310. Covell NH, Weissman EM, Essock SM. Weight gain with clozapine compared to first generation antipsychotic medications. *Schizophr Bull*. 2004;30(2):229-40.
311. Rojo LE, Gaspar PA, Silva H, Risco L, Arena P, Cubillos-Robles K, Jara B. Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology. *Pharmacol Res*. 2015;101:74-85.

312. Ballon JS, Pajvani U, Freyberg Z, Leibel RL, Lieberman JA. Molecular pathophysiology of metabolic effects of antipsychotic medications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(11):593-600.
313. He M, Deng C, Huang XF. The role of hypothalamic H1 receptor antagonism in antipsychotic-induced weight gain. *CNS Drugs.* 2013;27(6):423-34.
314. Albaugh VL, Henry CR, Bello NT, Hajnal A, Lynch SL, Halle B, Lynch CJ. Hormonal and metabolic effects of olanzapine and clozapine related to body weight in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(1):36-51.
315. Blessing WW, Zilm A, Ootsuka Y. Clozapine reverses increased brown adipose tissue thermogenesis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and by cold exposure in conscious rats. *Neuroscience.* 2006;141(4):2067-73.
316. Stefanidis A, Verty AN, Allen AM, Owens NC, Cowley MA, Oldfield BJ. The role of thermogenesis in antipsychotic drug-induced weight gain. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17(1):16-24.
317. Romo-Nava F, Alvarez-Icaza González D, Fresán-Orellana A, Saracco Alvarez R, Becerra-Palars C, Moreno J, Ontiveros Uribe MP, Berlanga C, Heinze G, Buijs RM. Melatonin attenuates antipsychotic metabolic effects: an eight-week randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled clinical trial. *Bipolar Disord.* 2014;16(4):410-21.

318. Modabbernia A, Heidari P, Soleimani R, Sobhani A, Roshan ZA, Taslimi S, et al. Melatonin for prevention of metabolic side-effects of olanzapine in patients with first-episode schizophrenia: randomized double-blind placebo-controlled study. *J Psychiatr Res.* 2014;53:133-40.
319. Lam DA, Miron JA. Global patterns of seasonal variation in human fertility. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;709:9-28.
320. Fischer T, Lundbye-Christensen S, Johnsen SP, Schønheyder HC, Sørensen HT. Secular trends and seasonality in first-time hospitalization for acute myocardial infarction--a Danish population-based study. *Int J Cardiol.* 2004;97(3):425-31.
321. Brainard GC, Sliney D, Hanifin JP, Glickman G, Byrne B, Greeson JM, Jasser S, Gerner E, Rollag MD. Sensitivity of the human circadian system to short-wavelength (420-nm) light. *J Biol Rhythms.* 2008;23(5):379-86.
322. Zubidat AE, Haim A. Artificial light-at-night - a novel lifestyle risk factor for metabolic disorder and cancer morbidity. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2017;28(4):295-313.
323. Russart KLG, Nelson RJ. Light at night as an environmental endocrine disruptor. *Physiol Behav.* 2018;190:82-89.
324. Brismar K, Hylander B, Eliasson K, Rössner S, Wetterberg L. Melatonin secretion related to side-effects of beta-blockers from the central nervous system. *Acta Med Scand.* 1988;223(6):525-30.

325. Myers BL, Badia P. Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: mechanisms and interventions. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995;19(4):553-71.
326. Chen KY, Cypess AM, Laughlin MR, Haft CR, Hu HH, Bredella MA, Enerbäck S, Kinahan PE, Lichtenbelt WV, Lin FI, Sunderland JJ, Virtanen KA, Wahl RL. Brown Adipose Reporting Criteria in Imaging Studies (BARCIST 1.0): Recommendations for Standardized FDG-PET/CT Experiments in Humans. *Cell Metab.* 2016;24(2):210-22.
327. Sampath SC, Bredella MA, Cypess AM, Torriani M. Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology.* 2016;280(1):4-19.
328. Virtanen KA. The rediscovery of BAT in adult humans using imaging. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(4):471-7.
329. Borga M, Virtanen KA, Romu T, Leinhard OD, Persson A, Nuutila P, Enerbäck S. Brown adipose tissue in humans: detection and functional analysis using PET (positron emission tomography), MRI (magnetic resonance imaging), and DECT (dual energy computed tomography). *Methods Enzymol.* 2014;537:141-59.
330. Martinez-Tellez B, Sanchez-Delgado G, Garcia-Rivero Y, Alcantara JMA, Martinez-Avila WD, Muñoz-Hernandez MV, Olza J, Boon MR, Rensen PCN, Llamas-Elvira JM, Ruiz JR. A New Personalized Cooling Protocol to Activate Brown Adipose Tissue in Young Adults. *Front Physiol.* 2017;8:863.

-
331. McCallister A, Zhang L, Burant A, Katz L, Branca RT. A pilot study on the correlation between fat fraction values and glucose uptake values in supraclavicular fat by simultaneous PET/MRI. *Magn Reson Med*. 2017;78(5):1922-32.
332. Franz D, Karampinos DC, Rummeny EJ, Souvatzoglou M, Beer AJ, Nekolla SG, Schwaiger M, Eiber M. Discrimination Between Brown and White Adipose Tissue Using a 2-Point Dixon Water-Fat Separation Method in Simultaneous PET/MRI. *J Nucl Med*. 2015;56(11):1742-7.
333. Gariani K, Gariani J, Amzalag G, Delattre BM, Ratib O, Garibotto V. Hybrid PET/MRI as a tool to detect brown adipose tissue: Proof of principle. *Obes Res Clin Pract*. 2015;9(6):613-7.
334. Rossato M, Cecchin D, Vettor R. Brown adipose tissue localization using 18F-FDG PET/MRI in adult *Endocrine*. 2016;54(2):562-3.
335. Sun L, Yan J, Velan SS, Leow MKS. A synopsis of brown adipose tissue imaging modalities for clinical research. *Diabetes Metab*. 2017;43(5):401-10.
336. Holstila M, Virtanen KA, Grönroos TJ, Laine J, Lepomäki V, Saunavaara J, Lisinen I, Komu M, Hannukainen JC, Nuutila P, Parkkola R, Borra RJ. Measurement of brown adipose tissue mass using a novel dual-echo magnetic resonance imaging approach: a validation study. *Metabolism*. 2013;62(8):1189-98.

337. Reddy NL, Jones TA, Wayte SC, Adesanya O, Sankar S, Yeo YC, Tripathi G, McTernan PG, Randeve HS, Kumar S, Hutchinson CE, Barber TM. Identification of brown adipose tissue using MR imaging in a human adult with histological and immunohistochemical confirmation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(1):E117-21.
338. Ong FJ, Ahmed BA, Oreskovich SM, Blondin DP, Haq T, Konyer NB, Noseworthy MD, Haman F, Carpentier AC, Morrison KM, Steinberg GR. Recent advances in the detection of brown adipose tissue in adult humans: a review. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(10):1039-54.
339. Ring EF, Ammer K. Infrared thermal imaging in medicine. *Physiol Meas.* 2012;33(3):R33-46.
340. Ang QY, Goh HJ, Cao Y, Li Y, Chan SP, Swain JL, Henry CJ, Leow MK. A new method of infrared thermography for quantification of brown adipose tissue activation in healthy adults (TACTICAL): a randomized trial. *J Physiol Sci.* 2017;67(3):395-406.
341. Jang C, Jalapu S, Thuzar M, Law PW, Jeavons S, Barclay JL, Ho KK. Infrared thermography in the detection of brown adipose tissue in humans. *Physiol Rep.* 2014;2(11). pii: e12167.
342. Lee P, Ho KK, Greenfield JR. Hot fat in a cool man: infrared thermography and brown adipose tissue. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13(1):92-3.

343. Crane JD, Mottillo EP, Farncombe TH, Morrison KM, Steinberg GR. A standardized infrared imaging technique that specifically detects UCP1-mediated thermogenesis in vivo. *Mol Metab.* 2014;3(4):490-4.
344. Gatidis S, Schmidt H, Pfannenberger CA, Nikolaou K, Schick F, Schwenzer NF. Is It Possible to Detect Activated Brown Adipose Tissue in Humans Using Single-Time-Point Infrared Thermography under Thermoneutral Conditions? Impact of BMI and Subcutaneous Adipose Tissue Thickness. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151152.
345. Symonds ME, Henderson K, Elvidge L, Bosman C, Sharkey D, Perkins AC, Budge H. Thermal imaging to assess age-related changes of skin temperature within the supraclavicular region co-locating with brown adipose tissue in healthy children. *J Pediatr.* 2012;161(5):892-8.
346. Chen Y, Buyel JJ, Hanssen MJ, Siegel F, Pan R, Naumann J, Schell M, van der Lans A, Schlein C, Froehlich H, Heeren J, Virtanen KA, van Marken Lichtenbelt W, Pfeifer A. Exosomal microRNA miR-92a concentration in serum reflects human brown fat activity. *Nat Commun.* 2016;7:11420.
347. Holmes D. Adipose tissue: miR-92a hits the mark. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(7):373.
348. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.

349. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(2):346-61.
350. Arner P, Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(5):276-88.
351. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):940-8.
352. Amaral FG, Turati AO, Barone M, Scialfa JH, do Carmo Buonfiglio D, Peres R, Peliciari-Garcia RA, Afeche SC, Lima L, Scavone C, Bordin S, Reiter RJ, Menna-Barreto L, Cipolla-Neto J. Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. *J Pineal Res*. 2014;57(1):67-79.
353. Baba S, Jacene HA, Engles JM, Honda H, Wahl RL. CT Hounsfield units of brown adipose tissue increase with activation: preclinical and clinical studies. *J Nucl Med*. 2010;51(2):246-50.
354. Carvalho G, Marin JF, Garcez AT, Duarte PS, Sapienza MT, Buchpiguel CA. SUV Normalized by Skeletal Volume on 18F-Fluoride PET/CT Studies. *Clin Nucl Med*. 2016;41(7):529-33.
355. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):943-9.

356. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384(9943):618-25.
357. Kokkinos PF, Fernhall B. Physical activity and high density lipoprotein cholesterol levels: what is the relationship? *Sports Med*. 1999;28(5):307-14.
358. Sprecher DL. Raising high-density lipoprotein cholesterol with niacin and fibrates: a comparative review. *Am J Cardiol*. 2000;86(12A):46L-50L.
359. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4453-8.
360. Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*. 2014;20(3):396-407.
361. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab*. 2015;22(4):546-59.
362. Wang X, Minze LJ, Shi ZZ. Functional imaging of brown fat in mice with 18F-FDG micro-PET/CT. *J Vis Exp*. 2012(69) . pii: 4060.
363. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 1:S36-42.

364. Bartness TJ, Wade GN. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behav Neurosci*. 1984;98(4):674-85.
365. Foster DO, Depocas F, Zuker M. Heterogeneity of the sympathetic innervation of rat interscapular brown adipose tissue via intercostal nerves. *Can J Physiol Pharmacol*. 1982;60(6):747-54.
366. Vaughan CH, Zarebidaki E, Ehlen JC, Bartness TJ. Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Methods Enzymol*. 2014;537:199-225.
367. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglind M, Elander L, Slawik M, Mussack T, Nilsson D, Romu T, Nuutila P, Virtanen KA, Beuschlein F, Persson A, Borga M, Enerbäck S. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*. 2013;19(5):631-4.
368. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(5):581-91.
369. Leliavski A, Dumbell R, Ott V, Oster H. Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *J Biol Rhythms*. 2015;30(1):20-34.
370. Arlt W. The approach to the adult with newly diagnosed adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(4):1059-67.

371. Barclay JL, Agada H, Jang C, Ward M, Wetzig N, Ho KK. Effects of glucocorticoids on human brown adipocytes. *J Endocrinol.* 2015;224(2):139-47.
372. Minn H, Zasadny KR, Quint LE, Wahl RL. Lung cancer: reproducibility of quantitative measurements for evaluating 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake at PET. *Radiology.* 1995;196(1):167-73.
373. Weber WA, Gatsonis CA, Mozley PD, Hanna LG, Shields AF, Aberle DR, Govindan R6, Torigian DA7, Karp JS7, Yu JQ8, Subramaniam RM9, Halvorsen RA10, Siegel BA; ACRIN 6678 Research team; MK-0646-008 Research team. Repeatability of 18F-FDG PET/CT in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Prospective Assessment in 2 Multicenter Trials. *J Nucl Med.* 2015;56(8):1137-43.
374. Dulloo AG. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obes Rev.* 2011;12(10):866-83.
375. Dulloo AG. Translational issues in targeting brown adipose tissue thermogenesis for human obesity management. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1302:1-10.
376. Gonçalves AL, Martini Ferreira A, Ribeiro RT, Zukerman E, Cipolla-Neto J, Peres MF. Randomised clinical trial comparing melatonin 3 mg, amitriptyline 25 mg and placebo for migraine prevention. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87(10):1127-32.

377. Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*. 2002;36(2):199-211.
378. Wu DW, Bischof WF, Kingstone A. Looking while eating: the importance of social context to social attention. *Sci Rep*. 2013;3:2356.
379. Marcelino AS, Adam AS, Couronne T, Köster EP, Sieffermann JM. Internal and external determinants of eating initiation in humans. *Appetite*. 2001;36(1):9-14.
380. Robinson E, Blissett J, Higgs S. Social influences on eating: implications for nutritional interventions. *Nutr Res Rev*. 2013;26(2):166-76.
381. Cappuccio FP, Miller MA. Sleep and Cardio-Metabolic Disease. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(11):110.
382. Mårtensson LG, Andersson RG, Berg G. Melatonin together with noradrenaline augments contractions of human myometrium. *Eur J Pharmacol*. 1996;316(2-3):273-5.
383. Takahashi A, Shimazu T, Maruyama Y. Importance of sympathetic nerves for the stimulatory effect of cold exposure on glucose utilization in brown adipose tissue. *Jpn J Physiol*. 1992;42(4):653-64.
384. Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*. 1983;305(5936):712-3.

385. Trayhurn P, Milner RE. A commentary on the interpretation of in vitro biochemical measures of brown adipose tissue thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol*. 1989;67(8):811-9.
386. Agil A, Navarro-Alarcón M, Ruiz R, Abuhamadah S, El-Mir MY, Vázquez GF. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res*. 2011;50(2):207-12.
387. Chan TY, Tang PL. Effect of melatonin on the maintenance of cholesterol homeostasis in the rat. *Endocr Res*. 1995;21(3):681-96.
388. Hussain SA. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. *J Pineal Res*. 2007;42(3):267-71.
389. Sener G, Balkan J, Cevikbaş U, Keyer-Uysal M, Uysal M. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. *J Pineal Res*. 2004;36(3):212-6.
390. Rindone JP, Achacoso R. Effect of melatonin on serum lipids in patients with hypercholesterolemia: a pilot study. *Am J Ther*. 1997;4(11-12):409-11.
391. Seabra ML, Bignotto M, Pinto LR, Tufik S. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J Pineal Res*. 2000;29(4):193-200.
392. Fikenzer K, Fikenzer S, Laufs U, Werner C. Effects of endurance training on serum lipids. *Vascul Pharmacol*. 2018;101:9-20.

393. AIM-HIGH Investigators, Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, McBride R, Teo K, Weintraub W. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(24):2255-67.
394. Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res*. 2006;41(1):79-84.
395. Marchetti C, Sidahmed-Adrar N, Collin F, Jore D, Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D. Melatonin protects PLPC liposomes and LDL towards radical-induced oxidation. *J Pineal Res*. 2011;51(3):286-96.
396. Bonnefont-Rousselot D, Chevé G, Gozzo A, Tailleux A, Guilloz V, Caisey S, Teissier E, Fruchart JC, Delattre J, Jore D, Lesieur D, Duriez P, Gardès-Albert M. Melatonin related compounds inhibit lipid peroxidation during copper or free radical-induced LDL oxidation. *J Pineal Res*. 2002;33(2):109-17.
397. Bonnefont-Rousselot D, Guilloz V, Lepage S, Bizard C, Duriez P, Lesieur D, Delattre J, Jore D, Gardès-Albert M. Protection of endogenous beta-carotene in LDL oxidized by oxygen free radicals in the presence of supraphysiological concentrations of melatonin. *Redox Rep*. 2003;8(2):95-104.
398. Okatani Y, Wakatsuki A, Watanabe K, Ikenoue N, Fukaya T. Melatonin inhibits vasospastic action of oxidized low-density lipoprotein in human umbilical arteries. *J Pineal Res*. 2000;29(2):74-80.

-
399. Müller-Wieland D, Behnke B, Koopmann K, Krone W. Melatonin inhibits LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203(1):416-21.
400. Kozel'tsev VL, Volodina TV, Guseva VV, Kostiuk NV. Changes in lipids of granulation fibrous tissue in rats at various doses and routes of melatonin administration. *Biomed Khim.* 2007;53(1):50-6.
401. Daniels WM, Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Ortiz GG. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6 phosphatase activity. *J Pineal Res.* 1995;19(1):1-6.
402. Sewerynek E, Melchiorri D, Chen L, Reiter RJ. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(6):903-9.
403. Dauchy RT, Blask DE, Sauer LA, Davidson LK, Krause JA, Smith LC, Dauchy EM. Physiologic melatonin concentration, omega-3 fatty acids, and conjugated linoleic acid inhibit fatty acid transport in rodent hind limb skeletal muscle in vivo. *Comp Med.* 2003;53(2):186-90.
404. Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Olivan J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res.* 2000;28(3):150-5.

405. Castera L, Vilgrain V, Angulo P. Noninvasive evaluation of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):666-75.
406. Tapper EB, Lok ASF. Use of Liver Imaging and Biopsy in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2017;377(23):2296-7.