

Rosana Fátima Dantas Ferreira

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

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

São Paulo
2014

Rosana Fátima Dantas Ferreira

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

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira, Rosana Fátima Dantas.

Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados - implicações no comportamento alimentar e peso corporal / Rosana Fátima Dantas Ferreira. – São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neurobiologia.

Versão do título para o inglês: Effects of therapeutic central replacement of melatonin in pinealectomized animals - implications on feeding behavior and body weight.

1. Melatonina 2. Comportamento alimentar 3. Resistência à insulina
4. Pinealectomia 5. Injeção intracerebroventricular I. Cipolla Neto,
Prof. Dr. José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III.
Título.

ICB/SBIB0205/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rosana Fátima Dantas Ferreira.

Título da Tese: Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em animais pinealectomizados - implicações no comportamento alimentar e peso corporal.

Orientador(a): Prof. Dr. José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Avenida de Santos Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - telex: (55) (011) 3091-7458
e-mail: icb@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.047/2008

DECLARAÇÃO

Em atendimento ao Certificado 79/04/CEEA, datado de 16.12.04 e por solicitação do Prof. Dr. José Cipolla Neto, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **ROSANA FÁTIMA DANTAS FERREIRA** ao Projeto de Pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: Interações hormonais, ações centrais e periféricas: (papel, obesidade, diabetes e envelhecimento)*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 22 de setembro de 2008.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, meus grandes incentivadores e exemplos e ao meu irmão, meu companheiro.

À todos do meu grupo de trabalho Fernanda, Caroline, Sinésio, Jéssica, Lívia e principalmente à Julieta que esteve sempre lá quando precisei e que fora do trabalho considero como uma segunda mãe.

Ao meu orientador José Cipolla Neto pela atenção jamais negada.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na realização neste trabalho.

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: Serotonina

5-HTP: 5-hidroxi-triptamina

AA-NAT: Arilalquilamina N-acetiltransferase

AMFK: N-acetil-N-formil-5-metoxiquinuramina

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

CEEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREB: Elemento responsivo ao AMPc

CTL: Controle

DAB: diaminobenzidina

GCS: gânglio cervical superior

GLUT4: Transportador de glicose do tipo 4

HIOMT: Hidroxi-indol-O-metiltransferase

ICV: Intracerebroventricular

KPBS: Tampão fosfato de sódio

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MEL: Melatonina

MT-1: Receptor de melatonina do tipo 1

MT-2: Receptor de melatonina do tipo 2

NAS: N-actil-serotonina

NDS: soro normal feito em burro

NOR: Noradrenalina

NPV: Núcleo paraventricular hipotalâmico

NSQ: Núcleo supraquiasmático

PET-CT: Tomografia de emissão de Póstrons

PINX: Pinealectomizado

PKA: proteína quinase A

PKB: Proteína quinase B

PKC: Proteína quinase C

SNC: Sistema nervoso central

TAM: Tecido adiposo Marrom

TPH: Triptofano hidroxilase

ZT: Zeitgeber Time

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	O Complexo pineal.....	14
Figura 2.	Estrutura molecular da melatonina.....	15
Figura 3.	Via de produção da melatonina (Adaptado de CIPOLLA-NETO E AFECHÉ, 2008).....	17
Figura 4.	Desenho experimental.....	25
Figura 5.	Glicemia média entre os grupos no momento do sacrifício.....	29
Figura 6.	Peso do tecido adiposo periepididimal.....	30
Figura 7.	Peso do tecido adiposo retroperitoneal. Valor de $p < 0.005$	31
Figura 8.	Consumo alimentar dos grupos pinx e controle antes do início da injeção ($p < 0.0001$).....	32
Figura 9.	Consumo alimentar antes do início da injeção e após 30 dias de injeção (valor de $p < 0.0001$).....	33
Figura 10.	Evolução do consumo alimentar dos animais pinealectomizados durante o experimento.....	33
Figura 11.	Peso dos animais Controle 3 semanas antes do início da injeção comparado com o peso dos animais Pinx na mesma época.....	34
Figura 12.	Média dos pesos de todos os grupos 3 semanas antes do início da injeção comparada à média dos pesos após 4 semanas de injeção.....	35
Figura 13.	Quantificação da proteína do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) no tecido muscular e comparação entre os grupos experimentais.....	36
Figura 14.	Quantificação da proteína do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) no tecido adiposo periepididimal e comparação entre os grupos experimentais.....	37

Figura 15. Quantificação da proteína do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) no tecido adiposo retroperitoneal e comparação entre os grupos experimentais.....38

Figura 16. Quantificação da proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPC-K) no tecido hepático e comparação entre os grupos experimentais.....39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A Glândula Pineal e seu principal hormônio: a Melatonina	14
1.2	Os mecanismos de ação da Melatonina	18
1.3	Ações da melatonina no comportamento alimentar e metabolismo energético	19
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Procedimentos para injeção ICV de melatonina	25
4.1.1	<i>Animais e desenho experimental</i>	25
4.1.2	<i>Implantação das cânulas para injeção ICV no terceiro ventrículo</i>	26
4.1.3	<i>Injeção intracerebroventricular</i>	26
4.1.4	<i>Avaliação do consumo alimentar</i>	27
4.1.5	<i>Avaliação do peso corporal</i>	27
4.1.6	<i>Avaliação da glicemia e do peso do tecido adiposo visceral</i>	27
4.2	Procedimentos de Western Immunoblotting para quantificação de proteínas envolvidas no metabolismo da glicose nos tecidos periféricos	27
4.2.1	<i>Extração protéica e immunoblotting</i>	27
4.3	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Avaliação da glicemia de jejum nos animais	29
5.2	Comparação do peso de tecido adiposo entre os grupos	29
5.3	Avaliação da evolução da ingestão alimentar durante o experimento	31
5.4	Avaliação da evolução do peso corporal durante o experimento	33
5.5	Procedimentos de western immunoblotting	35
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Glândula Pineal e seu principal hormônio: a Melatonina

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

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

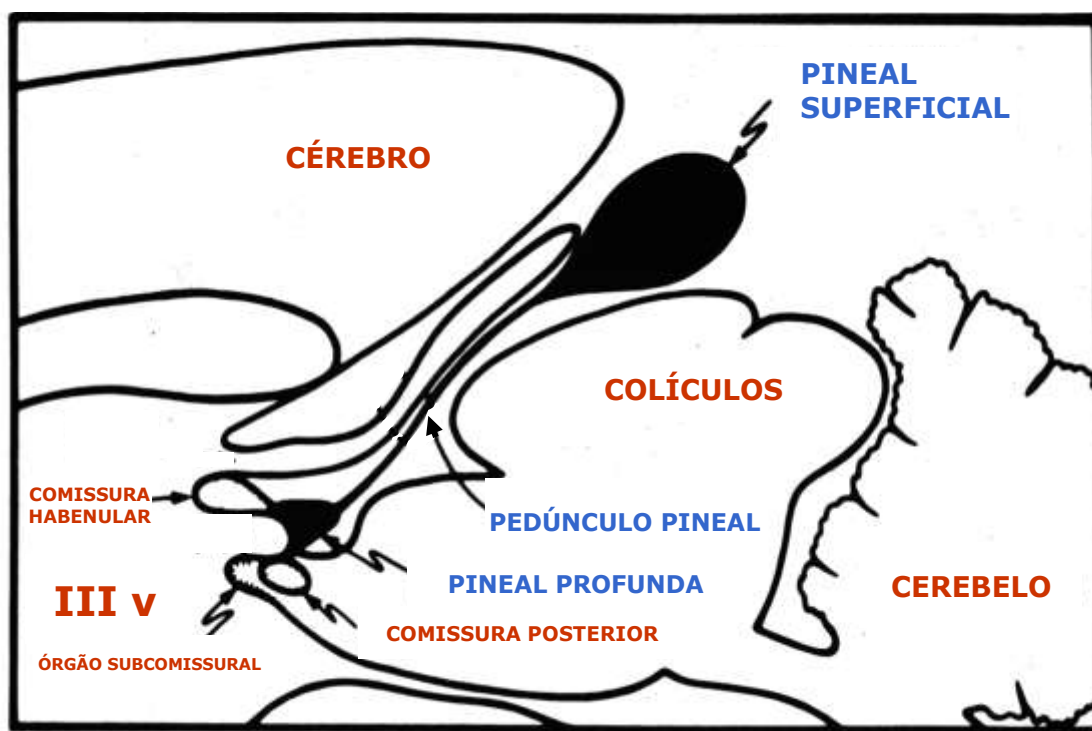


Figura 1. O Complexo pineal.

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

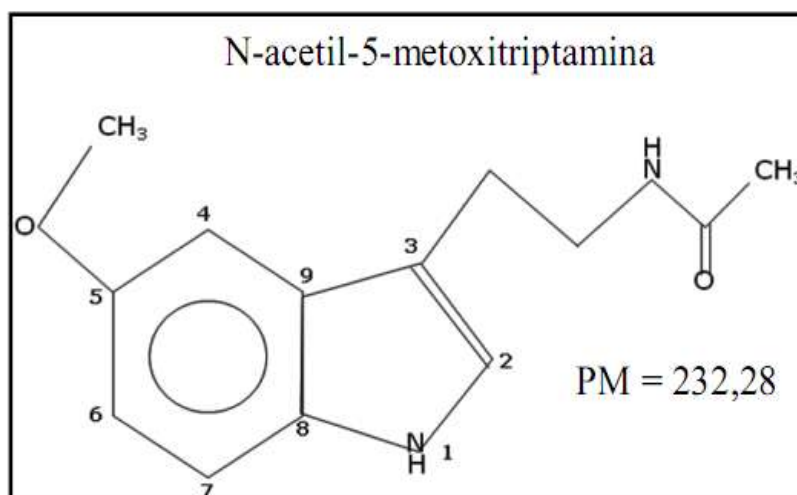


Figura 2. Estrutura molecular da melatonina.

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

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

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

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

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

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

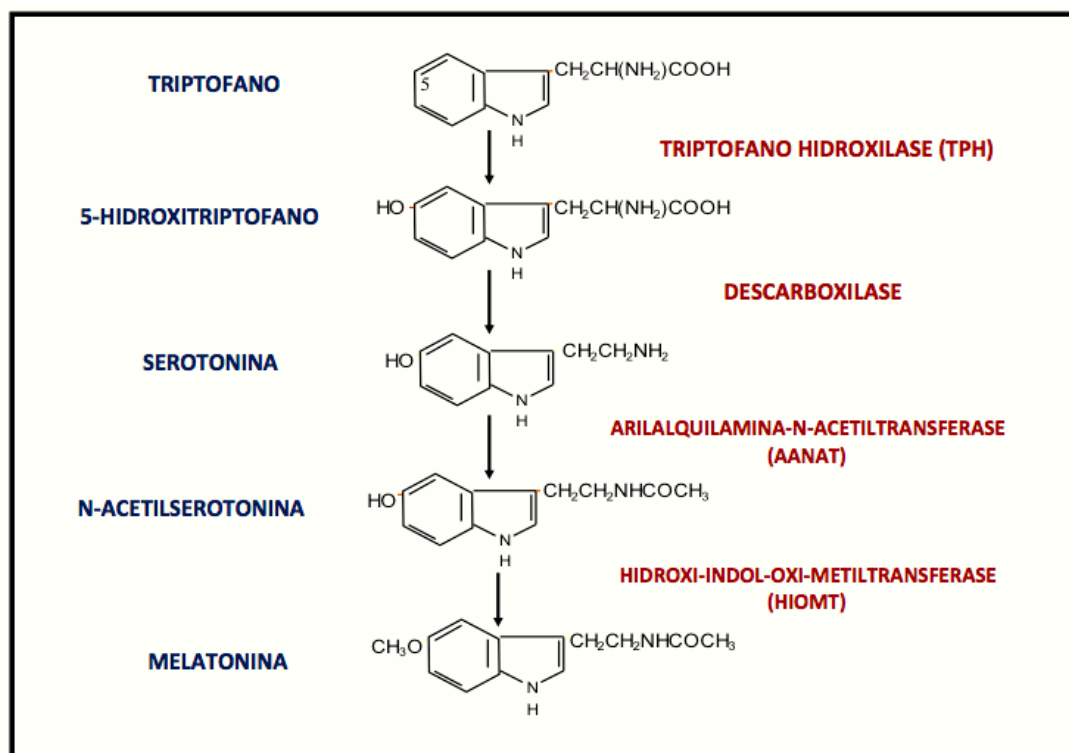


Figura 3. Via de produção da melatonina (Adaptado de CIPOLLA-NETO E AFECHE, 2008).

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

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

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

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

1.2 Os mecanismos de ação da Melatonina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Ações da melatonina no comportamento alimentar e metabolismo energético

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

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

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

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

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

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

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

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

essas áreas de extrema importância na regulação central do consumo alimentar e termogênese.

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

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

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

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

2 JUSTIFICATIVA

Além dos dados citados sobre as mudanças metabólicas causadas pela pinealectomia e suas consequências, trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram também que a reposição de melatonina por via oral resultou em redução do peso corporal, diminuição da ingestão alimentar, redução da massa adiposa, além do aumento da sensibilidade à insulina no hipotálamo, tecido muscular esquelético, tecido adiposo e fígado. Visto que a ação anti-hiperglicêmica da melatonina possivelmente se dá através de um sítio cerebral, e que a regulação da consumo alimentar se dá principalmente por uma via central, propõe-se avaliar essas alterações observadas mediante suplementação central de melatonina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo observar alterações no comportamento alimentar, variação de peso corporal e resposta insulínica em tecido adiposo, fígado e músculo em decorrência de injeções intracerebroventriculares (ICV) de melatonina em animais pinealectomizados.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a ingesta alimentar e o peso corpóreo;

Avaliar os níveis protéicos do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) no músculo esquelético e adiposo de ratos pinealectomizados suplementados com melatonina através de Western immunoblotting;

Verificar a reposição neoglicogênica desses animais através da quantificação proteica da enzima PEPC-K.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedimentos para injeção ICV de melatonina

4.1.1 Animais e desenho experimental

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar jovens (2 meses) pesando aproximadamente 300g no início do experimento. Os animais foram mantidos em biotério com ciclo de claro-escuro 12/12 (luzes acesas às 21:00) e temperatura controlada (21 ± 2 °C). Os animais receberam comida e água à vontade. Os procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB).

Os animais foram inicialmente divididos em 2 grupos: Controle (CTL) e Pinealectomizados (PINX). Após 7 dias da cirurgia de implantação das cânulas iniciou-se a avaliação do consumo alimentar desses animais que durou 90 dias e continuou na fase de injeção intracerebroventricular (ICV) por mais 30 dias. Na fase de injeção ICV os 2 grupos iniciais foram subdivididos em 4 grupos: CTL+RINGER, CTL+MEL, PINX+RINGER e PINX+MEL (Figura 4).

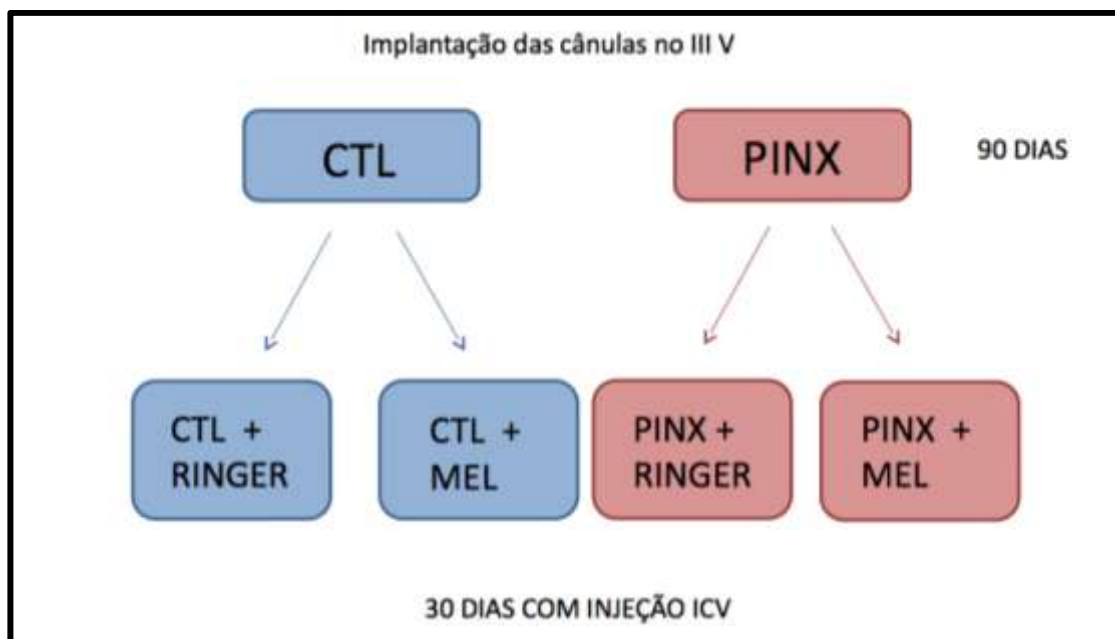


Figura 4. Desenho experimental.

4.1.2 *Implantação das cânulas para injeção ICV no terceiro ventrículo*

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Dopalen[®] (Paulínia, SP, Brasil) (5 ml) e Anasedan[®] (Paulínia, SP, Brasil) (1,7 ml), dessa mistura injetou-se intraperitonealmente 0,15 ml/100 g de peso do animal. Foram posicionados em aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) após perda dos reflexos. Todos os grupos experimentais foram implantados com cânulas feitas com agulha de seringa (23G) cortadas com Dremel, lixadas e polidas. Os animais foram anestesiados e posicionados em aparelho estereotáxico após perda de reflexos. Fez-se uma perfuração na posição, 2 mm posterior ao bregma, na linha média. Outras 2 perfurações foram feitas para colocação de parafusos que deram base para a fixação da cânula. Após a fixação dos parafusos a sonda foi implantada no 3^o ventrículo cerebral (coordenadas: anteroposteior -2,00 mm do bregma e dorsoventral 7.55 mm a partir da calota) (Nível 27, SWANSON, 1998). A cânula foi fixada na superfície do crânio com cimento dentário (co-polímero de acrílico e acrílico auto polimerizante- Clássico Artigos Odontológicos[®], São Paulo, SP, Brasil). Após a fixação da cânula os animais tiveram o escalpo suturado. O experimento se iniciou após 7 dias da cirurgia.

4.1.3 *Injeção intracerebroventricular*

As injeções foram realizadas durante o ZT 11, ou seja, 1 hora antes da transição do período claro para o período escuro. Os grupos CTL+RINGER e PINX+RINGER receberam 5uL de solução veículo, enquanto que os animais dos grupos CTL+MEL e PINX+MEL receberam 90 ng de melatonina diluídos em 5uL de RINGER. Todos os animais receberam injeção diariamente no período de 30 dias. O sistema de injeção é composto por adaptadores de tubos, tubos de polipropileno de 30 cm e seringas Hamilton de 10 uL. Antes da conexão ao animal o sistema é completo pela solução correspondente a cada grupo. O sistema cheio e sem bolhas é conectado ao animal e a outra ponta é conectada à seringa Hamilton. A injeção de 5 uL tinha duração de aproximadamente 1 minuto sendo que todos os animais tinham livre movimento pela caixa durante esse período (possibilitado pelo tubo de polipropileno).

4.1.4 Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar desses animais era avaliado diariamente no ZT 11 (uma hora antes do início do período escuro).

4.1.5 Avaliação do peso corporal

O peso corporal era medido semanalmente no mesmo período da pesagem de ração.

4.1.6 Avaliação da glicemia e do peso do tecido adiposo visceral

Os animais foram sacrificados após 12 horas de jejum, no ZT 12, por decapitação sendo coletado o sangue do tronco para análise da glicemia imediatamente por glicosímetro de fita (Abbott®, Hill County, IL, EUA). Neste momento foram retirados os coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal que foram, imediatamente pesados em balança de precisão e armazenados para análise posterior.

4.2 Procedimentos de Western Immunoblotting para quantificação de proteínas envolvidas no metabolismo da glicose nos tecidos periféricos

4.2.1 Extração protéica e immunoblotting

Cada tecido foi submetido à sonicação em 3 ml de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C por 20 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (*Bio-Rad*®). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (v:v) e 50 a 100 µg de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida, em cada gel havia como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos (Prestained SDS-PAGE Standards #161-0318 – *Bio-Rad*®). A

transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose através de um aparelho semi-dry (*Bio-Rad*[®]) por 75 min a 15 V, porém no tampão foi acrescentado SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (LiCor) a 4 °C durante a noite. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada com solução basal (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%), por 30 min. As membranas foram então incubadas com anticorpo conjugado com fluoróforo (LiCor 600 anti-mouse e 800 anti-rabbit) por 1 h a temperatura ambiente, em caixa escura. A intensidade das bandas nas membranas foi determinada e quantificada através do scanner Odyssey (USA). Foram utilizados anticorpos contra PEPC-K no fígado e GLUT 4 no músculo e tecidos adiposos (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA,USA).

4.3 Análise estatística

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

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da glicemia de jejum nos animais

Não observamos uma alteração significativa na glicemia de jejum entre os grupos no momento do sacrifício (figura 5).

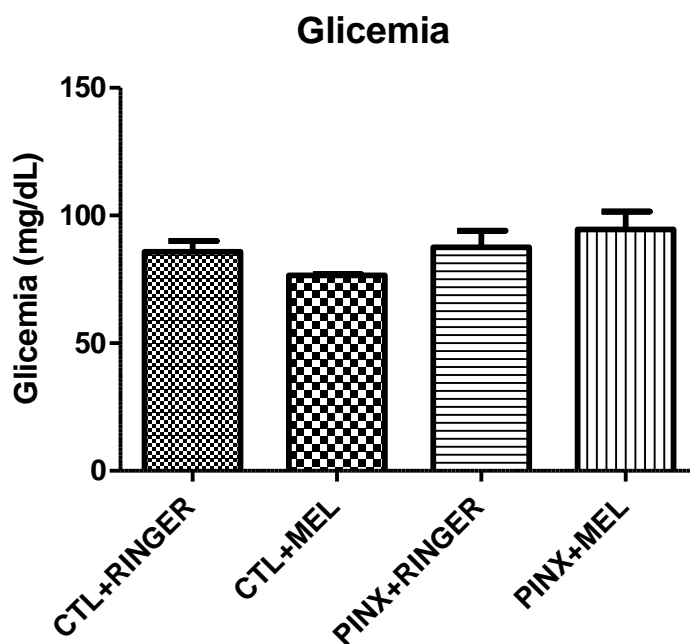


Figura 5. Glicemia média entre os grupos no momento do sacrifício (n=4 animais por grupo) ($p < 0,05$). Os valores são mostrados em média \pm erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

5.2 Comparação do peso de tecido adiposo entre os grupos

Observamos que não houve alteração significativa no peso do tecido adiposo periepididimal entre os grupos (figura 6), observando-se, no entanto, uma nítida tendência de diminuição nos animais que receberam melatonina.

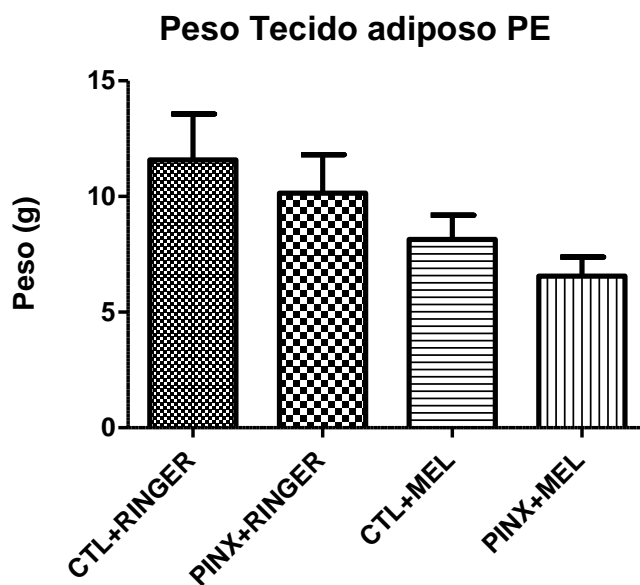


Figura 6. Peso do tecido adiposo periepididimal. (n=4 animais por grupo) ($p < 0,05$). Os valores são mostrados em média \pm erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

Já quando se trata do tecido adiposo retroperitoneal, observou-se, em primeiro lugar, um aumento do peso nos animais pinealectomizados não tratados com melatonina. Por outro lado, quando esses animais recebem a reposição terapêutica de melatonina diretamente no sistema nervoso central, mostram uma redução considerável do peso do tecido adiposo retroperitoneal em relação ao grupo pinealectomizado não tratado que passa a ser comparável ao dos animais controles (figura 7).

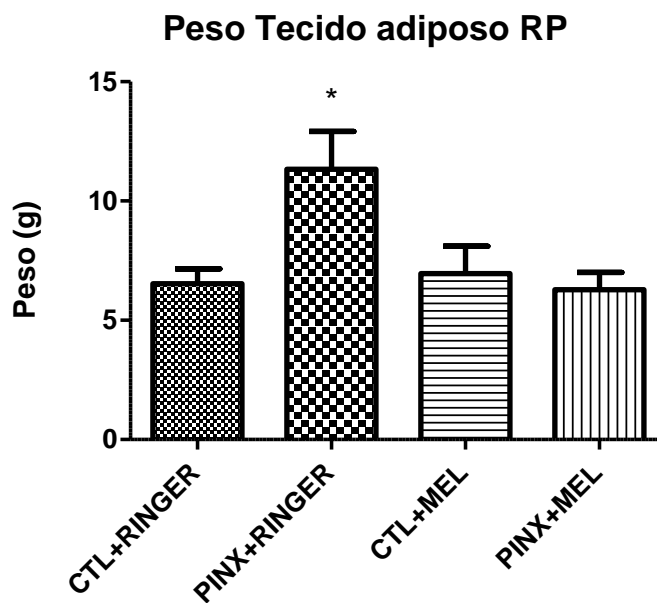


Figura 7. Peso do tecido adiposo retroperitoneal (n=4 animais por grupo) ($p < 0,05$). Os valores são mostrados em média \pm erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

5.3 Avaliação da evolução da ingestão alimentar durante o experimento

Em primeiro lugar, a medição da ingestão alimentar, antes dos procedimentos de injeção central, mostram que os animais pinealectomizados ingerem relativamente mais que os animais controles (figura 8).

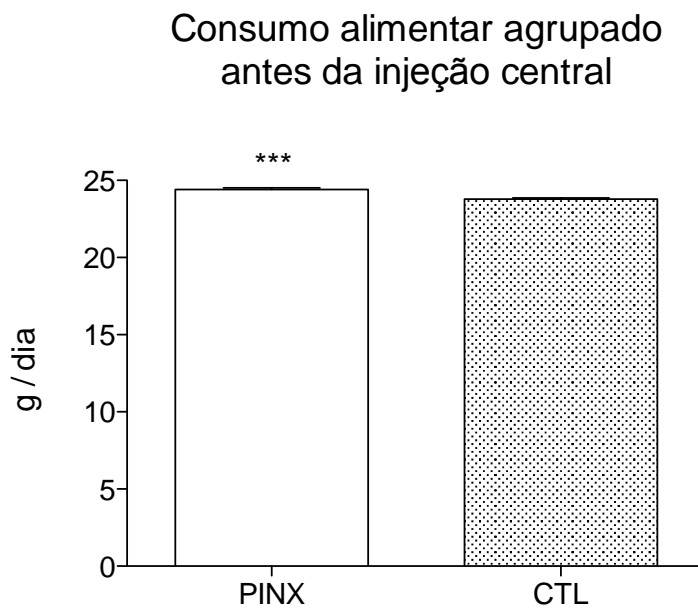


Figura 8. Consumo alimentar dos grupos pinx e controle antes do início da injeção (n=4 animais por grupo) ($p < 0,0001$). Os valores são mostrados em média +/- erro padrão. Análise estatística: teste t.

Da mesma forma, pudemos observar uma diferença no consumo alimentar entre os grupos que receberam injeção intracerebroventricular de melatonina. Assim, quando se analisa o consumo alimentar depois da injeção, os grupos injetados com melatonina, seja controle ou pinealectomizado se diferenciam mostrando uma redução da ingestão alimentar (figura 9).

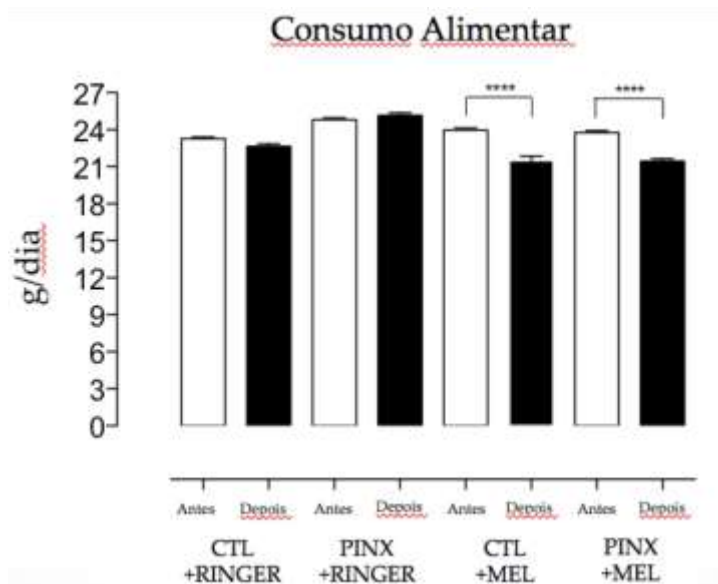


Figura 9. Consumo alimentar antes do início da injeção e após 30 dias de injeção. (n=4 animais por grupo) ($p < 0,0001$). Os valores são mostrados em média +/- erro padrão.

5.4 Avaliação da evolução do peso corporal durante o experimento

Observamos nos grupos PINX que houve uma redução significativa no peso corporal nos animais que receberam injeção ICV diária de melatonina quando comparados com os animais pinealectomizados injetados com veículo (figura 10).

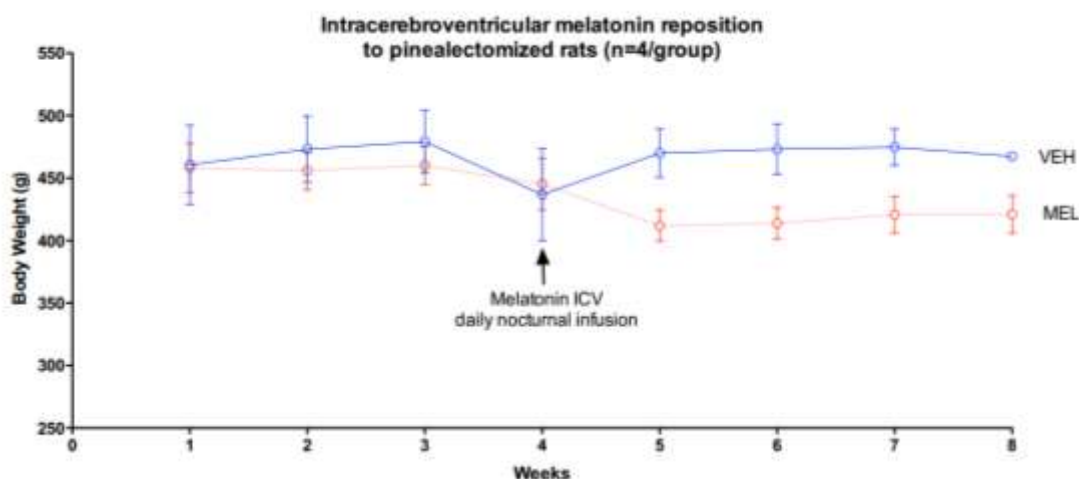


Figura 10. Evolução do consumo alimentar dos animais pinealectomizados durante o experimento. (n=4 animais por grupo) ($p < 0,005$). Os valores são mostrados em média +/- erro padrão.

A análise dos pesos corporais médios de todos os animais controles e de todos os animais pinealectomizados, durante as 3 semanas que antecederam a microinjeção ICV (figura 11), mostra que os animais pinealectomizados, como esperado, são significativamente mais pesados.

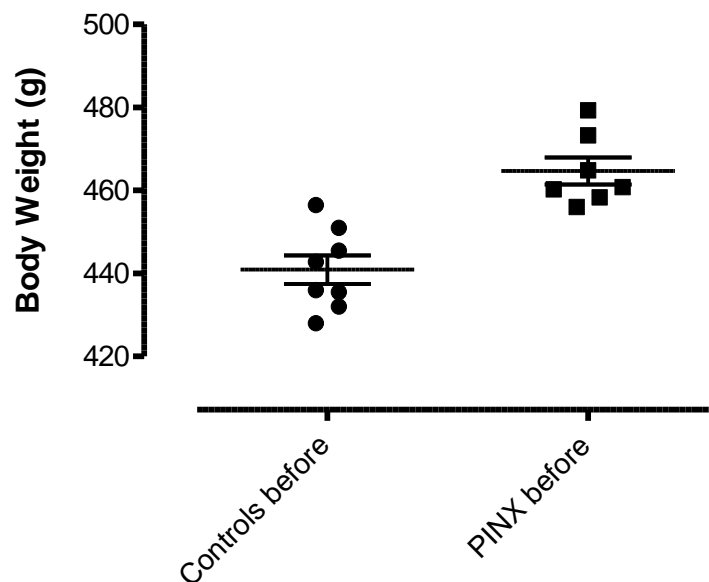


Figura 11. Peso dos animais Controle 3 semanas antes do início da injeção comparado com o peso dos animais Pinx na mesma época. Os valores são mostrados em média +/- erro padrão. Análise estatística: teste t.

Comparando-se a média dos pesos de todos os grupos 3 semanas antes do início da injeção com os pesos 4 semanas depois da injeção no fim do experimento (figura 12) podemos observar que os controles infundidos com RINGER ganham peso, como esperado. Diferentemente, os controles injetados com Mel mantêm o mesmo peso, portanto os pesos dos controles com injeção de mel são menores do que os do grupo controle sem Mel. Os animais pinealectomizados injetados com RINGER são os que apresentam maior peso corporal antes do início da injeção e mantêm o peso, enquanto que os animais do grupo PINX+MEL emagrecem, portanto, o peso dos animais do grupo PINX+MEL depois da injeção é estatisticamente diferente do peso do grupo PINX+ RINGER e obviamente diferente de todos os outros grupos.

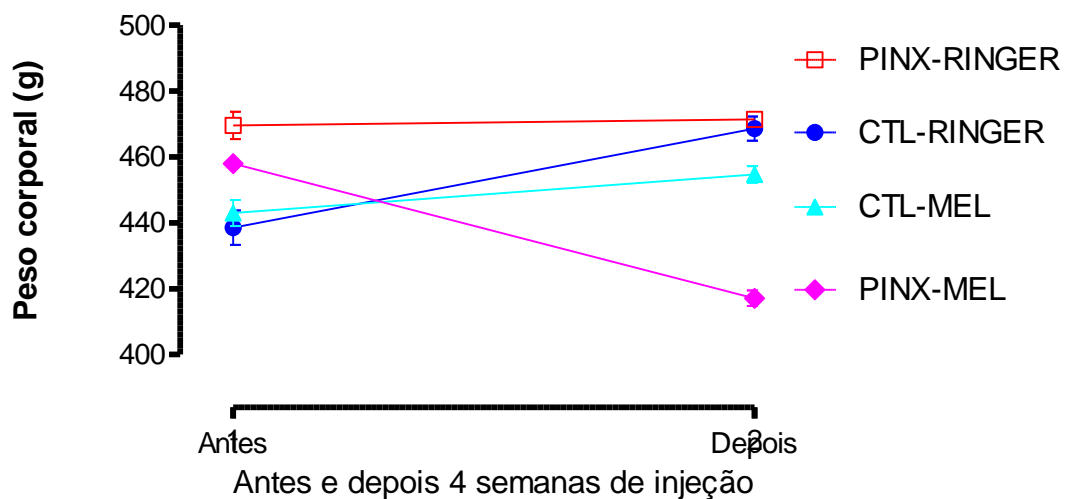


Figura 12. Média dos pesos de todos os grupos 3 semanas antes do início da injeção comparada à média dos pesos após 4 semanas de injeção.

5.5 Procedimentos de western immunoblotting

Não observamos uma diferença estatisticamente significativa no conteúdo de GLUT-4 muscular entre os grupos experimentais (figura 13), porém observamos uma nítida tendência de aumento do seu conteúdo nos animais que foram suplementados centralmente com melatonina.

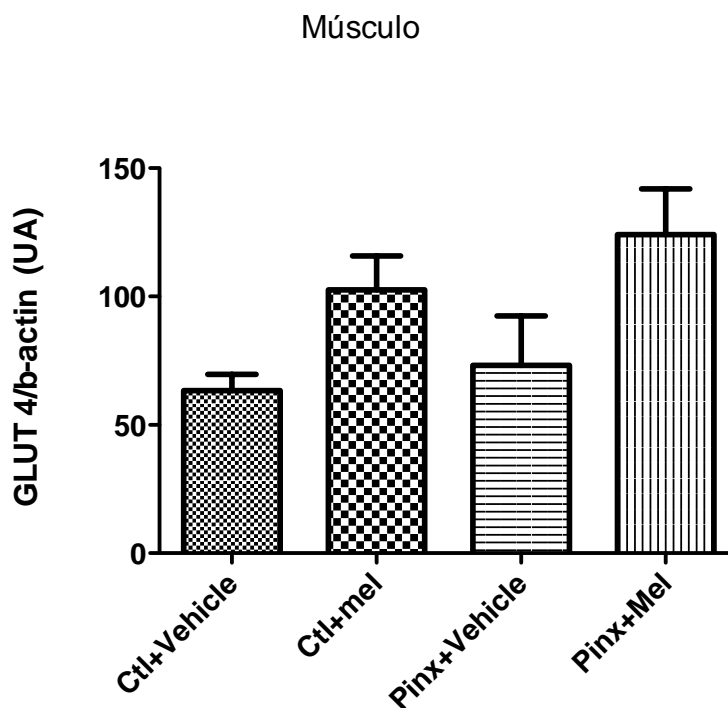


Figura 13. Quantificação da proteína do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) no tecido muscular e comparação entre os grupos experimentais. Os valores são mostrados em média +/- erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

Quando analisamos o conteúdo total de GLUT-4 nos tecidos adiposos periepidual (figura 14) e retroperitoneal (figura 15), não encontramos diferenças entre os grupos.

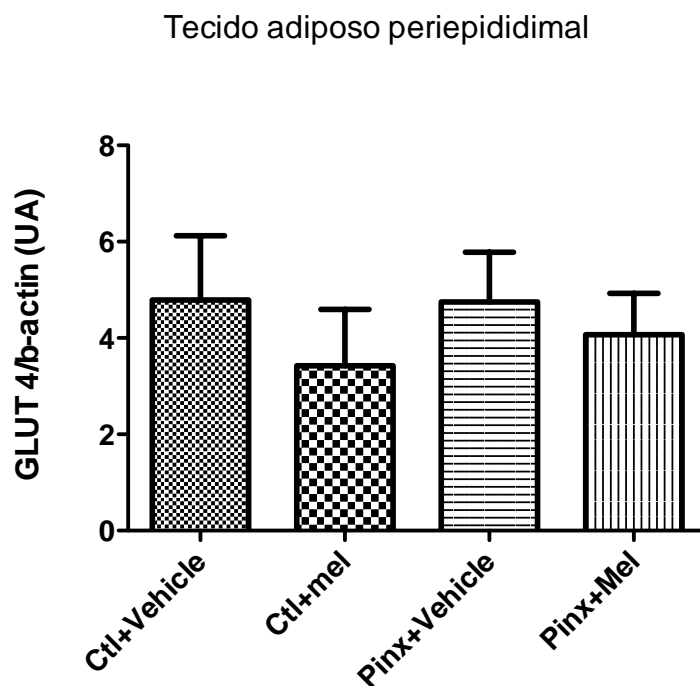


Figura 14. Quantificação da proteína do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) no tecido adiposo periepididimal e comparação entre os grupos experimentais. Os valores são mostrados em média +/- erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

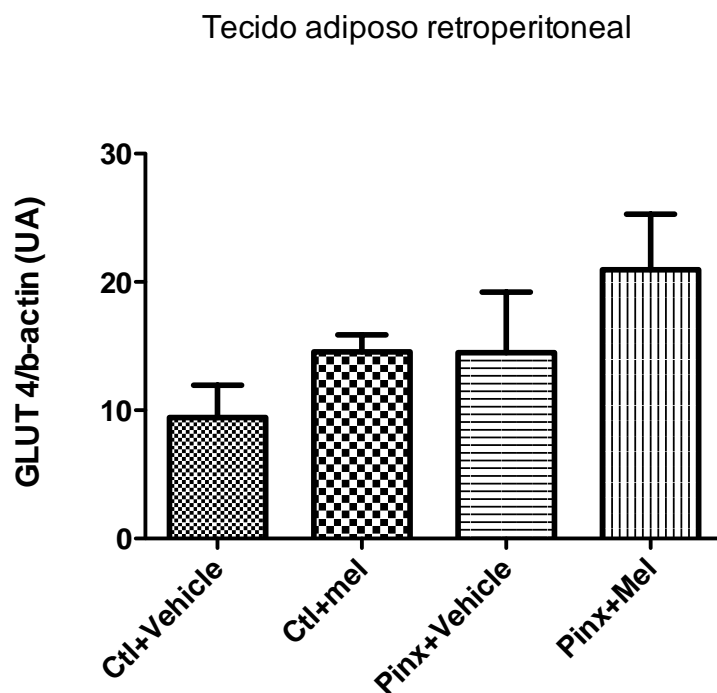


Figura 15. Quantificação da proteína do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) no tecido adiposo retroperitoneal e comparação entre os grupos experimentais. Os valores são mostrados em média +/- erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

Quando analisamos o conteúdo de PEPC-K no fígado não encontramos diferenças entre os grupos.

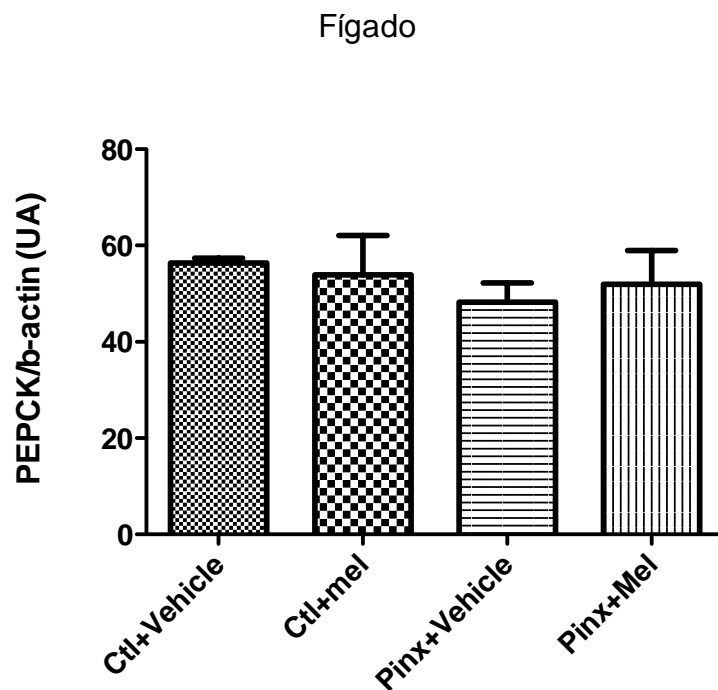


Figura 16. Quantificação da proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPC-K) no tecido hepático e comparação entre os grupos experimentais. Os valores são mostrados em média +/- erro padrão. Análise estatística: One-way ANOVA.

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que a melatonina tem um papel importante na modulação de vários processos fisiológicos como o metabolismo lipídico e da secreção e ação da insulina e que a pinealectomia causa severas alterações nesses processos.

Além de importante papel na modulação do metabolismo energético existem evidências de que a melatonina poderia influenciar o consumo alimentar que é um dos fatores que mais influenciam o metabolismo energético. Os resultados presentes são inéditos, pois indicam uma diminuição no consumo alimentar e no peso corporal de animais que recebem reposição terapêutica de melatonina diretamente no sistema nervoso central, visto que estudos pilotos anteriores nossos indicam não ter reflexo algum na melatonina circulante.

Trabalhos envolvendo administração de melatonina via oral a ratos de meia idade (10 meses) por 12 semanas demonstraram uma queda no peso de gordura visceral, no peso corporal e nos níveis de leptina e insulina plasmática restabelecendo níveis plasmáticos desses hormônios a níveis de animais jovens (4 meses). (Puchalski et al., 2003; Rasmussen et al., 1999; Wolden-Hanson et al., 2000) Porém essas mudanças foram independentes de mudanças no comportamento alimentar desses animais (Wolden-Hanson et al., 2000).

Em trabalho recente do nosso grupo (Zanuto et al., 2013), observou-se que em ratos idosos, a redução da produção de melatonina (que acontece naturalmente com o avançar da idade), pode estar relacionada ao desenvolvimento de resistência à insulina e que a suplementação de melatonina por via oral por 8 semanas melhora a resposta à insulina em hipotálamo, tecido adiposo, muscular e hepático (comprovada pelo teste de tolerância à insulina). Já a suplementação via oral por 12 semanas, além de melhorar a resposta à insulina, foi também capaz de diminuir o peso corporal o consumo alimentar e o peso do tecido adiposo periepididimal desses animais em aproximadamente 10%, 15% e 30% respectivamente. No presente trabalho a suplementação de melatonina centralmente por apenas 4 semanas levou a uma queda de aproximadamente 15% no peso corporal e de aproximadamente 10% no consumo alimentar nos animais pinealectomizados quando comparados aos respectivos controles (Pinx+Ringer).

Não se observou uma diferença estatisticamente significativa no peso de tecido adiposo periepididimal, porém observamos uma queda de aproximadamente

30% no peso do tecido adiposo retroperitoneal nos animais pinealectomizados em relação aos respectivos controles. O peso desse tecido adiposo nesses animais passa a ser comparado a seu peso nos animais controle.

Outros trabalhos também demonstraram a ação hipofágica da melatonina em outras espécies. Pinillos et al. (2001), observaram em peixes que a injeção intraperitoneal de melatonina e seu agonista 2-iodomelatonina diminuiu significativamente o consumo alimentar em goldfish (*Carassius auratus*). Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que a melatonina está envolvida nos mecanismos periféricos de saciedade nesta espécie já que a injeção ICV não surtiu nenhum efeito. Mais recentemente este mesmo grupo (de Pedro et al., 2008), demonstraram no mesmo modelo experimental que a melatonina reduz o peso corporal e está envolvida no metabolismo energético diminuindo os estoques de glicogênio muscular e aumentando a mobilização lipídica. Em 2004, Rubio et al., mostraram que a melatonina inibe o comportamento alimentar em robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) de maneira dose dependente quando administrada oralmente em cápsulas de gelatina.

É interessante notar que apesar de haver uma redução do consumo alimentar, indicando um possível papel da melatonina central na regulação central da ingestão alimentar, ele é pequeno para justificar uma queda tão acentuada do peso corpóreo e dos coxins adiposos. Isto poderia indicar que, adicionalmente à redução da ingesta, a melatonina central poderia aumentar os gastos energéticos, provavelmente ativando o catabolismo e a termogênese dependente do tecido adiposo marrom. Sabe-se que a melatonina tem um papel hipertrófico no tecido adiposo marrom (Tan et al., 2011). O tecido adiposo marrom (TAM) tem uma estrutura química única e um papel metabólico específico que é a geração de calor. Tanto que em indivíduos magros observa-se uma proporção maior de TAM que em indivíduos obesos (Ginter, Skimo, 2012). A descoberta da existência de uma quantidade substancial de TAM em adultos fornece um alvo potencial para o tratamento da obesidade. Sabe-se que a fisiologia do TAM é prontamente regulada pela melatonina, que não só aumenta o recrutamento do TAM como também aumenta sua atividade metabólica (Tan et al., 2011). Estudos do nosso grupo em andamento, usando imageamento por PET-CT, mostram que a ativação do tecido adiposo marrom em animais com 15 dias de pinealectomia é cerca de 4 vezes menor comparado com animais controles quando colocados a 4 °C durante 4

horas.

Não podemos afirmar, ainda, exatamente, como a melatonina exerce essa ação termogênica e inibidora da ingesta alimentar (e possivelmente, regulatória da ação periférica da insulina), porém, como mostramos anteriormente, encontramos receptores de melatonina do tipo MT-1 em todas as áreas hipotalâmicas envolvidas com o comportamento alimentar, a regulação metabólica e ativação do TAM (Schwartz et al., 2000).

O hipotálamo tem um papel importante em vários mecanismos pelos quais o SNC é informado sobre a disponibilidade de nutrientes ingeridos e estocados e com isso, gera respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas (Berthold et al., 2011). Sabe-se que aproximadamente 110 estruturas cerebrais apresentam receptores de melatonina (Simmoneaux, Ribelayga, 2003).

Wu, et. al., em trabalho desenvolvido em 2006, descreveram a distribuição do receptor de melatonina do tipo MT-1 em hipotálamo e pituitária de humanos por imunocitoquímica. Demonstraram uma ampla distribuição desse receptor no hipotálamo. Além da observação da presença desse receptor nas áreas classicamente descritas (NSQ e Pars tuberalis) observou-se também sua expressão em áreas como nos núcleos paraventricular, periventricular, supraóptico, núcleo sexualmente dimórfico, banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert, núcleo infundibular, ventromedial e dorsomedial, tuberomamilar, corpo.

Outro trabalho identificou receptores de melatonina do tipo MT-1 por autoradiografia *in vitro* e por hibridização *in situ* em cérebros de fetos humanos. Esse receptor foi localizado nas meninges, no cerebelo, tálamo, hipotálamo e tronco encefálico. No hipotálamo especificamente as ligações foram observadas no núcleo supraquiasmático, arqueado, ventromedial e mamilar (Thomas et al., 2002).

A glândula pineal de roedores pode receber sinais das áreas hipotalâmicas envolvidas no controle do comportamento alimentar seja através de projeções centrais diretas para a glândula, seja através de projeções para o núcleo paraventricular hipotalâmico que, sabidamente se projeta, através do sistema simpático periférico, sobre a glândula pineal. Além disso, sinais do estado alimentar e metabólico dos animais (leptinemia, insulinemia, glicemia) podem diretamente influenciar o metabolismo pineal (Amaral et al., 2014; Garcia et al., 2008; Peliciari-Garcia et al., 2010). Isto indica que essa modulação da melatonina no metabolismo energético é uma via de mão dupla, ou seja, a melatonina tem o poder de modular

o comportamento alimentar e termogênese assim como o estado metabólico modula a liberação de melatonina pela glândula pineal.

Mais recentemente, o distúrbio metabólico causado pela ausência de melatonina nos animais pinealectomizados foi caracterizado como uma síndrome diabetogênica que inclui intolerância à glicose e resistência central e periférica à insulina (Cipola-Neto et al., 2014).

Porém, neste trabalho apesar de não termos observado a alteração da glicemia de jejum nos animais estudados, esse fato não implica em que os animais não tivessem resistência insulínica e intolerância à glicose o que só se mostraria com desafios específicos (GTT e ITT, p. exemplo). Não observamos diferença entre os grupos na quantidade de transportadores de glicose do tipo 4 nos tecidos adiposos estudados, porém observamos uma nítida tendência de aumento no número desses transportadores do músculo esquelético (figura 13), demonstrando que de fato, a ação anti-hiperglicêmica da melatonina pode, também, estar sendo mediada centralmente (Shima et al., 1997). Os resultados encontrados nos outros tecidos podem ser explicados pelo fato de que a melatonina, quando suplementada diretamente no SNC, não tenha efeito periféricamente ficando restrita a suas ações centrais.

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

Kappers JA. The development, topographical relations and innervations of epiphysis cerebri in albin rat. *Zeitschrift fur Zellforschung*. 1960;52:163-215.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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