LUCIANA TOCCI BELPIEDE

Caracterização e influência da ausência e da reposição terapêutica de melatonina materna sobre o metabolismo energético, hepático e adiposo de descendentes machos submetidos a diferentes desafios ambientais

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

São Paulo
2020

LUCIANA TOCCI BELPIEDE

Caracterização e influência da ausência e da reposição terapêutica de melatonina materna sobre o metabolismo energético, hepático e adiposo de descendentes machos submetidos a diferentes desafios ambientais

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Professor Doutor José Cipolla Neto

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UPS (BDTD).

São Paulo
2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tocci Belpiede, Luciana
Caracterização e influência da ausência e da reposição terapêutica de melatonina materna sobre o metabolismo energético, hepático e adiposo de descendentes machos submetidos a diferentes desafios ambientais / Luciana Tocci Belpiede; orientador José Cipolla Neto. -- São Paulo, 2020.
126 p.

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

1. Melatonina materna. 2. Metabolismo energético. 3. Sensibilidade à insulina. 4. Tecido adiposo. 5. Tecido hepático. I. Cipolla Neto, José , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): **Luciana Tocci Belpiede**

Titulo da Dissertação/Tese: **Caracterização e influência da ausência e da reposição terapêutica de melatonina materna sobre o metabolismo energético, hepático e adiposo de descendentes machos submetidos a diferentes desafios ambientais**

Orientador: **José Cipolla Neto**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

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

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

CERTIFICADO

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

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

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

CERTIFICATE

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

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

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

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

São Paulo, 13 de setembro de 2016.

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

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

AGRADECIMENTOS

Ao longo de meu percurso acadêmico muitas foram as pessoas que marcaram as diferentes fases que vivenciei e que merecem agradecimento por me ajudarem direta ou indiretamente. Inicio pelos meus pais Mauro Belpiede e Fátima Nilza Estevan Tocci Belpiede que me proporcionaram a vida; sou extremamente grata a educação e ensinamentos recebidos e que me fazem o ser humano que sou; grata por investirem em meus estudos e batalharem para que eu chegasse onde estou....o caminho não foi fácil, mas isso tornou cada conquista mais interessante, sábia e significante para minha formação e experiência de vida.

Tenho imensa gratidão pelo professor José Cipolla Neto e todos os colegas e colaboradores do laboratório, pela receptividade em meu ingresso e nova jornada no doutorado. Toda mudança nos dá medo e muita insegurança, mas o apoio que recebi foi imprescindível. Em especial agradeço a Caroline Mendes, Patrícia Gomes e Sinésio Júnior, que me auxiliaram no desenvolvimento de experimentos ao longo do trabalho; Lívia Clemente e Fernanda Amaral (e também suas queridas alunas Carol, Ludmila, Camila e Paula!!) que também estavam sempre dispostas a sanar dúvidas; à Maria Nathália de Carvalho que foi uma pessoa extremamente querida, dedicada, paciente que me auxiliou em vários momentos, além de me ensinar diversas formas de análise e transmitir de maneira extremamente humilde e humana seus conhecimentos; Julieta Scialfa que, com toda sua serenidade e bom humor esteve presente em vários momentos e horários críticos no desenvolvimento do trabalho. Agradeço pesquisadores, além dos de nosso grupo, como Guilherme Gomes que me auxiliou nos experimentos de termografia, sempre solícito, receptivo e com boa vontade em transmitir seus conhecimentos; professora Fernanda Cunha e seu aluno de doutorado Felipe que também me auxiliaram em experimentos complementares aos propostos no projeto, com muita paciência e dedicação!

Agradeço muito aos colaboradores do departamento, em especial Zé Maria e Paloma da secretaria que, com muita eficiência, administram os assuntos relacionados à pós-graduação, além dos queridos Leila, Tarcísio e Patrícia que sempre estiveram disponíveis quando precisei; À todos os professores e orientadores do programa que sempre me receberam de forma acolhedora e que foram, são e serão muito importantes como exemplos de profissionais; aos colegas de pós-graduação que, assim como eu, batalharam e batalham muito pelas suas conquistas; Aos colaboradores do biotério, da limpeza, da portaria e do apoio didático que realizam um trabalho impecável nas dependências do departamento; Aos colaboradores de outros departamentos que também se disponibilizaram quando precisei; Aos colaboradores da biblioteca que se dedicam em manter um acervo bibliográfico eficiente e de extrema importância para nossa atualização e aprimoramento do conhecimento científico.

Agradeço aos componentes de minha banca de qualificação: Ângelo Carpinelli, Rosana Mori e Tatiana Loureiro que me motivaram e auxiliaram na evolução do projeto e da tese; À Deus que **SEMPRE** me acolhe com muito carinho e que **NUNCA** me deixa sem qualquer explicação; a pessoa mais perfeita que já existiu neste universo e que nunca falha.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica), CNPq (142258/2018-0) e FAPESP (2014/50457-0)

RESUMO

BELPIEDE, L.T. **Caracterização e influência da ausência e da reposição terapêutica de melatonina materna sobre o metabolismo energético, hepático e adiposo de descendentes machos submetidos a diferentes desafios ambientais.** 2020. 126 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A melatonina é produzida por todo ser vivo, sistemicamente, pela glândula pineal e é capaz de controlar diversas funções fisiológicas, além de modular a interface materno-fetal. A melatonina materna possui importante função na maturação de ritmicidade do feto e no preparo do neonato às interações/desafios com o meio externo, além de ser imprescindível em seu desenvolvimento metabólico. O tecido hepático exerce diversas funções metabólicas para garantir a homeostase glicêmica, além de utilizar glicose, o fígado é capaz de sintetizá-la e liberá-la para a circulação sanguínea em determinadas situações. A insulina liberada em período pós-prandial, interage com receptores específicos e promove uma cascata de sinalização intracelular responsável pela ativação de enzimas específicas que, por sua vez, recrutarão fatores transcricionais reguladores de genes lipogênicos, entretanto, na resistência à insulina hepática, essas vias não se ativam e recrutam-se vias associadas a gliconeogênese, por exemplo. O tecido adiposo branco, que há tempos foi reconhecido apenas por sua função no armazenamento, atualmente é considerado significante para homeostase energética: quanto maior seu volume, maior sua participação na homeostase glicêmica, porém, quando a resistência à insulina se instala nesse tecido, pode exacerbar a hiperglicemia e provocar desajustes metabólicos. Em conjunto com demais tecidos metabolicamente ativos, o tecido adiposo marrom também participa da homeostase energético por meio do controle da temperatura corporal com aumento no consumo de energia pela termogênese, além de se correlacionar, na idade adulta, com melhor sensibilidade à insulina e controle glicêmico. O objetivo do trabalho foi caracterizar a influência da ausência de melatonina materna, durante a gestação e lactação, em tecidos metabolicamente ativos e o impacto funcional dessas características no perfil metabólico de descendentes machos submetidos a diferentes desafios ambientais. O estudo foi inicialmente conduzido com ratas wistar que constituíram os seguintes grupos experimentais: grupo controle; grupo com ausência experimental de melatonina pineal (pinealectomizadas) e grupo de fêmeas pinealectomizadas com reposição oral terapêutica de melatonina a 1mg/Kg peso/dia. Para seus descendentes machos, cada grupo foi subdividido de acordo com a ração experimental a ser utilizada (ração normolipídica e ração hiperlipídica), ao longo de 12 semanas, cuja principal diferença relaciona-se à

distribuição de macronutrientes. As evidências mostraram que, filhotes de mães pinealectomizadas apresentaram aumento de peso corporal no desmame, maior índice de Lee, maior glicemia e resistência à insulina; reduzida expressão do transportador de glicose em tecidos adiposos branco e marrom, aumento de expressão de alguns genes termogênicos e de diferenciação celular no tecido adiposo marrom que, por sua vez, não correponderam à eficiência funcional observadas nas análises de termografia, e maior dificuldade em termorregular pela cauda. A ausência materna de melatonina durante a gestação impactou em características metabólicas da prole com diferente magnitude nos parâmetros metabólicos, moleculares e funcionais de seus descendentes machos.

Palavras-chave: Melatonina materna. Metabolismo energético. Sensibilidade à insulina. Tecido adiposo. Tecido hepático

ABSTRACT

BELPIEDE, L.T. **Characterization and influences of the absence and therapeutic replacement of maternal melatonin on the energy, hepatic and adipose metabolism of male offspring subjected to different environmental challenges.** 2020. 126 p. PhD thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

In mammals, melatonin, as hormone, is produced by the pineal gland and controls several physiological functions, in addition to modulating the maternal-fetal interface. Maternal melatonin plays an important role in fetal development and programming, preparing the newborn for interactions / challenges with the external environment, and being essential in its metabolic development. Liver and adipose tissue, either white or brown, are important metabolic tissues participating in glucose homeostasis. In order to promote this, the liver performs several metabolic functions. White adipose tissue has long been known only for its energy storage function, but it is currently considered an important player in the control of energy homeostasis. Moreover, brown adipose tissue also participates in energy homeostasis by controlling body temperature with an increase in energy consumption by thermogenesis, in addition to correlating, in adulthood, with better insulin sensitivity and glycemic control. The aim of the study was to characterize the influences of the absence of maternal melatonin, during pregnancy and lactation, on the above metabolically active tissues and the functional impact of these characteristics on the metabolic profile of male offspring subjected to different environmental challenges. The study was conducted with Wistar rats that constituted the following experimental groups: offspring to a control group of intact dams; offspring to a group of pinealectomized dams (absence of maternal melatonin during gestation and lactation) and offspring to a group of pinealectomized dams subjected to melatonin replacement therapy (1mg / kg weight / day, during the night). Each group of male offspring was subdivided after weaning according to the experimental diet to be used (normolipidic diet and hyperlipidic diet), over 12 weeks. The results showed, in offspring to pinealectomized mothers, increased body weight at weaning, a higher Lee index, higher blood glucose and insulin resistance; reduced expression of the glucose transporter in white and brown adiposes tissues, increased expression of some thermogenic and cell differentiation genes in brown adipose tissues, which, in turn, did not show functional efficiency in thermography analyzes, and greater difficulty in thermoregulation by the tail. Several of these disorders were obviate if the pinealectomized mothers were treated with melatonin during gestation and lactation. In summary, maternal absence of melatonin during pregnancy and lactation impacted the

metabolic characteristics of the offspring with different magnitude molecular and functional parameters of metabolic function in male offspring.

Keywords: Maternal melatonin. Energy metabolism. Insulin sensitivity. Adipose tissue. Liver tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via de sinalização intracelular da melatonina via receptores acoplados à proteína Gi..... 23
Figura 2 - Via de sinalização intracelular da melatonina via receptores acoplados à proteína Gq..... 24
Figura 3 - Via de sinalização intracelular da insulina em tecidos responsivos..... 29
Figura 4 - Glicogênese ativada em hepatócitos..... 31
Figura 5 - Glicogenólise e gliconeogênese ativada em hepatócitos..... 32
Figura 6 - Lipogênese ativada em hepatócitos..... 34
Figura 7 - Ativação de adipócitos marrons via receptor ß3..... 39
Figura 8 - Ativação de adipócitos marrons via receptor α1..... 40
Figura 9 - Representação circadiana dos ZTs ao longo das 24 horas e sua relação com a fase luminosa..... 45
Figura 10 - Esquema de tratamento das fêmeas e de seus descendentes..... 46
Quadro 1 - Composição nutricional da ração hiperlipídica..... 47
Quadro 2 - Composição nutricional da ração normolipídica..... 48
Figura 11 - Gel de agarose para verificação de integridade de RNA..... 51
Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão de RNAm em tecido hepático..... 52
Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão de RNAm em tecido adiposo marrom interescapular..... 52
Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão de RNAm em tecido adiposo branco..... 52
Figura 12 - Média de peso corporal antes do tratamento alimentar..... 55
Figura 13 - Evolução de peso corporal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar..... 56
Figura 14 - Média de consumo alimentar diário ao final de 4 semanas de tratamento alimentar..... 57
Figura 15 - Média de consumo alimentar diário ao final de 12 semanas de tratamento alimentar..... 58
Figura 16 - Evolução de consumo alimentar ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar..... 59
Figura 17 - Conteúdo de tecidos adiposos brancos relativo ao peso corporal..... 60
Figura 18 - Conteúdo de tecido adiposo marrom interescapular relativo ao peso corporal..... 61
Tabela 4 - Correlações antropométricas..... 62
Figura 19 - Glicemia após privação alimentar em ZT 10..... 63
Figura 20 - Constante de decaimento de glicose..... 65
Figura 21 - Tolerância à glicose..... 66

Figura 22 - Expressão de RNAm para o gene *NR1H3* em tecido hepático..... 67

Figura 23 - Expressão de RNAm para o gene *SREBP1C* em tecido hepático..... 68

Figura 24 - Expressão de RNAm para o gene *ACACA* em tecido hepático..... 69

Figura 25 - Expressão de RNAm para o gene *FASN* em tecido hepático..... 70

Figura 26 - Expressão de RNAm para o gene *PPARG* em tecido hepático..... 71

Figura 27 - Expressão de RNAm para o gene *SLC2A2* em tecido hepático..... 72

Figura 28 - Expressão de RNAm para o gene *PCK1* em tecido hepático..... 73

Figura 29 - Conteúdo proteico de SREBP1C em tecido hepático no ZT 6..... 74

Figura 30 - Conteúdo proteico de SREBP1C em tecido hepático no ZT 18..... 74

Figura 31 - Conteúdo proteico de PPARG em tecido hepático no ZT 6..... 75

Figura 32 - Conteúdo proteico de PPARG em tecido hepático no ZT 18..... 75

Figura 33 - Conteúdo proteico de GLUT2 em tecido hepático no ZT 6..... 76

Figura 34 - Conteúdo proteico de GLUT2 em tecido hepático no ZT 18..... 76

Figura 35 - Conteúdo proteico de PEPCK em tecido hepático no ZT 6..... 77

Figura 36 - Conteúdo proteico de PEPCK em tecido hepático no ZT 18..... 77

Figura 37 Expressão de RNAm para o gene *TNFA* em tecido adiposo perigonadal..... 78

Figura 38 - Expressão de RNAm para o gene *IL1B* em tecido adiposo perigonadal..... 79

Figura 39 - Expressão de RNAm para o gene *IL6* em tecido adiposo perigonadal.. 80

Figura 40 -Expressão de RNAm para o gene *SLC2A4* em tecido adiposo perigonadal..... 81

Figura 41 - Expressão de RNAm para o gene *SLC2A4* em tecido adiposo marrom interescapular..... 82

Figura 42 - Expressão de RNAm para o gene *PKA* em tecido adiposo marrom interescapular..... 83

Figura 43 - Expressão de RNAm para o gene *UCP1* em tecido adiposo marrom interescapular..... 84

Figura 44 - Expressão de RNAm para o gene *PPARGC1A* em tecido adiposo marrom interescapular..... 85

Figura 45 - Expressão de RNAm para o gene *PPARG* em tecido adiposo marrom interescapular..... 86

Figura 46 - Expressão de RNAm para o gene *PRDM16* em tecido adiposo marrom interescapular..... 87

Figura 47 - Expressão de RNAm para o gene *CIDEA* em tecido adiposo marrom interescapular..... 88

Figura 48 - Delta temperatura entre o tecido adiposo marrom interescapular e a temperatura ambiente..... 89

Figura 49 - Imagem representativa da termografia da região dorsal da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar sob condição basal..... 90

Figura 50 - Imagem representativa da termografia da região dorsal da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar em ambiente subneutro..... 91

Figura 51 - Temperatura média da cauda da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar..... 92
Figura 52 - Imagem representativa da termografia da cauda da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar sob condição basal..... 93
Figura 53 - Imagem representativa da termografia da cauda da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar em ambiente subneutro..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS

AANAT	Arilalquilamina *N*-acetiltransferase
AC	Adenilato ciclase
ACC	do inglês, *acetyl-CoA carboxylase*
AGL	Ácido graxo livre
AKT/PKB	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ASMT	Acetilserotonina metiltransferase
ATP	Adenosina trifosfato
C	Filhotes de fêmeas CTL
CIDEA	do inglês, *cell death activator*
CTL	Controle
DAG	Diacilglicerol
DM2	Diabetes *mellitus* do tipo 2
FAS	do inglês, *fatty acid synthase*
FASN	Gene que codifica FAZ
FOXO1	do inglês, *forkhead box protein O1*
G6Pase	do inglês, *glucose-6-phosphatase*
GLUT2	Transportador de glicose de isoforma 2
GLUT4	Transportador de glicose de isoforma 4
GMP	Guanina monofosfato
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSK3	do inglês, *glycogen synthase kinase-3*
GTT	Teste de tolerância à glicose
H	Ração hiperlipídica
HIOMT	Hidroxindol-*O*-metiltransferase
IL1B	do inglês, *interleucin 1 beta*
IL6	do inglês, *interleucin 6*
IMC	Índice de massa corporal
IP3	1,4,5-inositol trifosfato
IRS	Substrato do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
kITT	Constante de decaimento da glicose

LXR	do inglês, *liver X receptors*
NA	Noradrenalina
MCP1	do inglês, *monocyte chemoattractant protein 1*
MT1 ou MTNR1	Receptor de membrana específico para melatonina 1
MT2 ou MTNR2	Receptor de membrana específico para melatonina 2
MT3	Receptor de membrana específico para melatonina 3
N	Ração normolipídica
NSQ	Núcleo supraquiasmático
P	Filhotes de fêmeas PINX
PEPCK	do inglês, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*
PDK1	Fosfoinositídeos 1
PGC1A	do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PINX	Pinealectomizado
PINX + MEL	Pinealectomizado com reposição terapêutica de melatonina
PIP2	Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PM	Filhotes de fêmeas PINX + MEL
PPARG	do inglês, *peroxisome proliferator receptor gamma*
PRDM16	do inglês, *PR domain containing 16*
PVH	Núcleo paraventricular hipotalâmico
RNA	do inglês, *ribonucleic acid*
RNAm	RNA mensageiro
RZR	Receptor nuclear da família retinóide
ROR	Receptor nuclear da família retinóide
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Superóxido dismutase
SREBP	do inglês, *sterol regulatory elemento-binding protein*
TAB	Tecido adiposo branco

TAI	Tecido adiposo inguinal
TAM	Tecido adiposo marrom
TNFA	do inglês, *tumor necrosis factor alpha*
UCP1	do inglês, *uncounpling protein 1*
VLDL	do inglês, *very low density lipoprotein*
ZFP516	do inglês, *zinc-finger protein 516*
ZT	do inglês, *zeitgeber time*

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Cálcio
K_{ATP}	Canal para potássio sensível ao ATP
%	Percentual
Kg	Quilograma
ºC	Graus *Celsius*
h	Hora
g	Grama
g	De velocidade
cm	Centímetro
mL	Mililitro
Kcal	Quilocalorias
Kg	Quilograma
®	Registrado
Δ	Delta
UI	Unidade internacional
µL	Microlitros
Ct	Cycle threshold
nm	Nanômetros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO…… 21

1.1 Melatonina materna e plasticidade fenotípica..... 26

1.2 Insulina, metabolismo energético e melatonina..... 27

1.3 Tecido hepático, metabolismo energético e melatonina..... 30

1.3 Tecidos adiposos (branco e marrom), metabolismo energético e melatonina..... 34

2 JUSTIFICATIVA…… 42

3 OBJETIVOS…… 43

3.1 Objetivo geral…… 43

3.2 Objetivos específicos……. 43

4 MATERIAL E MÉTODOS…… 44

4.1 Animais de experimentação…… 44

4.2 Pinealectomia…… 44

4.3 Reposição oral de melatonina…….. 44

4.4 Determinação da massa corporal…… 45

4.5 Tratamento dos descendentes……. 45

4.5.1 Determinação da massa corporal e consumo de ração..... 46

4.5.2 Composição nutricional das rações do tratamento alimentar..... 47

4.5.3 Obtenção de dados de temperatura superficial por meio de termografia..... 48

4.5.4 Teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ITT)..... 49

4.5.5 Coleta de tecidos…… 50

4.5.6 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) 50

4.5.7 Western blotting…….. 53

4.6 Análise de resultados…… 54

5 RESULTADOS…… 55

5.1 Média de peso corporal antes do tratamento alimentar..... 55

5.2 Evolução de peso corporal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar..... 56

5.3 Média de consumo alimentar diário ao final de 4 semanas de tratamento alimentar..... 57

5.4 Média de consumo alimentar diário ao final de 12 semanas de tratamento alimentar..... 58

5.5 Evolução de consumo alimentar semanal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar..... 59

5.6 Análises em tecidos adiposos…… 60

5.6.1 Conteúdo de tecidos adiposos brancos relativo ao peso corporal..... 60

5.6.2 Conteúdo de tecidos adiposos marrom interescapular relativo ao peso corporal.... 61

5.7 Correlações antropométricas……... 62

5.8 Homeostase glicêmica……... 63

5.8.1 Glicemia após privação alimentar no ZT 10..... 63

5.8.2 Sensibilidade à insulina……... 64

5.8.3 Tolerância à glicose…… 66

5.9 Análises de expressão gênica em tecido hepático..... 67

5.9.1 Expressão de RNAm para o gene NR1H3..... 67

5.9.2 Expressão de RNAm para o gene SREBP1C..... 68

5.9.3 Expressão de RNAm para o gene ACACA..... 69

5.9.4 Expressão de RNAm para o gene FASN..... 70

5.9.5 Expressão de RNAm para o gene PPARG..... 71

5.9.6 Expressão de RNAm para o gene SLC2A2..... 72

5.9.7 Expressão de RNAm para o gene PCK1..... 73

5.10 Análises de conteúdo proteico em tecido hepático..... 74

5.10.1 Conteúdo proteico de SREBP1C……... 74

5.10.2 Conteúdo proteico de PPARG……... 75

5.10.3 Conteúdo proteico de GLUT2……... 76

5.10.4 Conteúdo proteico de PEPCK……. 77

5.11 Análises de expressão gênica em tecido adiposo branco perigonadal..... 78

5.11.1 Expressão de RNAm para o gene TNFA..... 78

5.11.2 Expressão de RNAm para o gene IL1B..... 79

5.11.3 Expressão de RNAm para o gene IL6..... 80

5.11.4 Expressão de RNAm para o gene SLC2A4..... 81

5.12 Análises de expressão gênica em tecido adiposo marrom interescapular..... 82

5.12.1 Expressão de RNAm para o gene SLC2A4..... 82

5.12.2 Expressão de RNAm para o gene PKA..... 83

5.12.3 Expressão de RNAm para o gene UCP1..... 84

5.12.4 Expressão de RNAm para o gene PPARGC1A..... 85

5.12.5 Expressão de RNAm para o gene PPARG..... 86

5.12.6 Expressão de RNAm para o gene PRDM16..... 87

5.12.7 Expressão de RNAm para o gene CIDEA..... 88

5.13 Análises de termorregulação…… 89

5.13.1 Delta temperatura entre tecido adiposo marrom interescapular e ambiente..... 89

5.13.1.1 Imagem representativa da termografia da região dorsal..... 90

5.13.2 Temperatura média da cauda……... 92

5.13.2.1 Imagem representativa da termografia da cauda..... 93

6 DISCUSSÃO…… 95

7 CONCLUSÃO…….. 111

REFERÊNCIAS…….. 113

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo não se identificou qualquer função específica da glândula pineal. Somente no século XVII, foi descrita por René Descartes como uma estrutura responsável pela distribuição de fluidos do cérebro para os músculos e, em 1958, o dermatologista Aaron Lerner identificou e isolou o hormônio produzido pela glândula, a melatonina (ARENDT, 1995).

A secreção de melatonina obedece a um ritmo circadiano endógeno, com duração aproximada de 24 horas, o que não corresponde às exatas 24 horas do ambiente externo e, por esse motivo, é sincronizada/arrastada por pistas ambientais (STENVERS, 2018). Em mamíferos, a luminosidade ambiental (REITER, 1991; STEHLE et al., 2011) é considerada uma das mais significantes pistas uma vez que a produção de melatonina pela glândula pineal ocorre exclusivamente à noite e na ausência de luz. Essa síntese é determinada por um sistema neural que se inicia no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVH) e termina no sistema simpático torácico alto associado ao gânglio cervical superior. Esse sistema, por sua vez, é temporizado pelo relógio circadiano central (principal oscilador circadiano), localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), para onde projetam-se os axônios das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (CIPOLLA-NETO et al., 2014; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; MESSNER et al., 2001; PANDI-PERUMAL et al., 2006). Essa população de células retinianas é capaz de detectar alterações de claro-escuro ambiental, converter o estímulo fótico em elétrico, conduzir tal informação ao sistema nervoso central e, desta forma, ser responsável tanto pela sincronização da ritmicidade circadiana ao claro/escuro ambiental quanto ao fenômeno conhecido por fotoinibição noturna que consiste no bloqueio da síntese de melatonina noturna pelos estímulos luminosos ambientais (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; PANDI-PERUMAL et al., 2006).

A nível celular, a ritmicidade circadiana expressa-se num processo de transcrição e tradução de certos genes (chamados de genes relógio), composto por alças de retroalimentação positivas e negativas, processo esse que é cíclico e dura aproximadamente 24 horas. A luz ambiental é capaz de ajustar a fase nos relógios centrais presentes nos NSQs e essa temporização é, então, transmitida aos tecidos periféricos por meio de sinalização hormonal (por exemplo, a melatonina) e neural. Alguns outros agentes ambientais, comportamentais e metabólicos podem modular e regular o processo de temporização circadiano do organismo, destaca-se o exercício físico e a ingestão alimentar (ALONSO-VALE et al., 2008; AMARAL et al., 2014; ARCHER et al., 2014; STENVERS, 2018).

O estado alimentado, por exemplo, é capaz de modular desde a absorção dos substratos energéticos a nível gastrointestinal, até a secreção de hormônios facilitadores do processo de absorção e distribuição desses compostos e, com isso, vias metabólicas/bioquímicas predominam à partir do estado em que o organismo se encontra: espera-se que, a privação alimentar durante a noite induza maior circulação plasmática de ácidos graxos livres e aumento de gliconeogênese hepática (posteriormente descrita). Diz-se, então, que o comportamento alimentar pode ser considerado um sincronizador e, a interrupção desse hábito, pode desajustar osciladores periféricos devido à modificação de pistas metabólicas (DRĂGOI, 2019).

Esses eventos são capazes de controlar a transcrição de genes relógio localizados nos tecidos centrais e periféricos o que capacita o organismo como um todo para as oportunidades e desafios alternados que acompanham as modificações associadas ao dia/noite (ALONSO-VALE et al., 2008; AMARAL et al., 2014; ARCHER et al., 2014; STENVERS, 2018).

A melatonina é uma indolamina produzida por todos os seres vivos e, portanto, ubiquamente presente na natureza (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; GOMEZ et al., 2012; MIGLIORI et al., 2012; STEHLE et al., 2011). Nos vertebrados, a melatonina hormonal, produzida pela glândula pineal, é capaz de controlar inúmeras funções fisiológicas (BUBENIK, 2001), possui ação sistêmica e é secretada tanto para a circulação sanguínea (complexada ou não a albumina) (CIPOLLA-NETO et al., 2014; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; PARDRIDGE; MIETUS, 1980) quanto para o fluido cérebro espinhal (CIPOLLA-NETO et al., 2014; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; REITER et al., 2014; TRICOIRE et al., 2003). Além disso, a melatonina pode ser sintetizada em diversos tecidos, com ação autócrina e/ou parácrina e, portanto, de exclusivamente local (sistemas respiratório, renal, digestório, cutâneo, retina, placenta, etc.) (CIPOLLA-NETO et al., 2014; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; KONTUREK et al., 2007; LEJA-SZPAK et al., 2007; MONTILLA et al., 1998; OKATANI; WAKATSUKI; KANEDA, 2000).

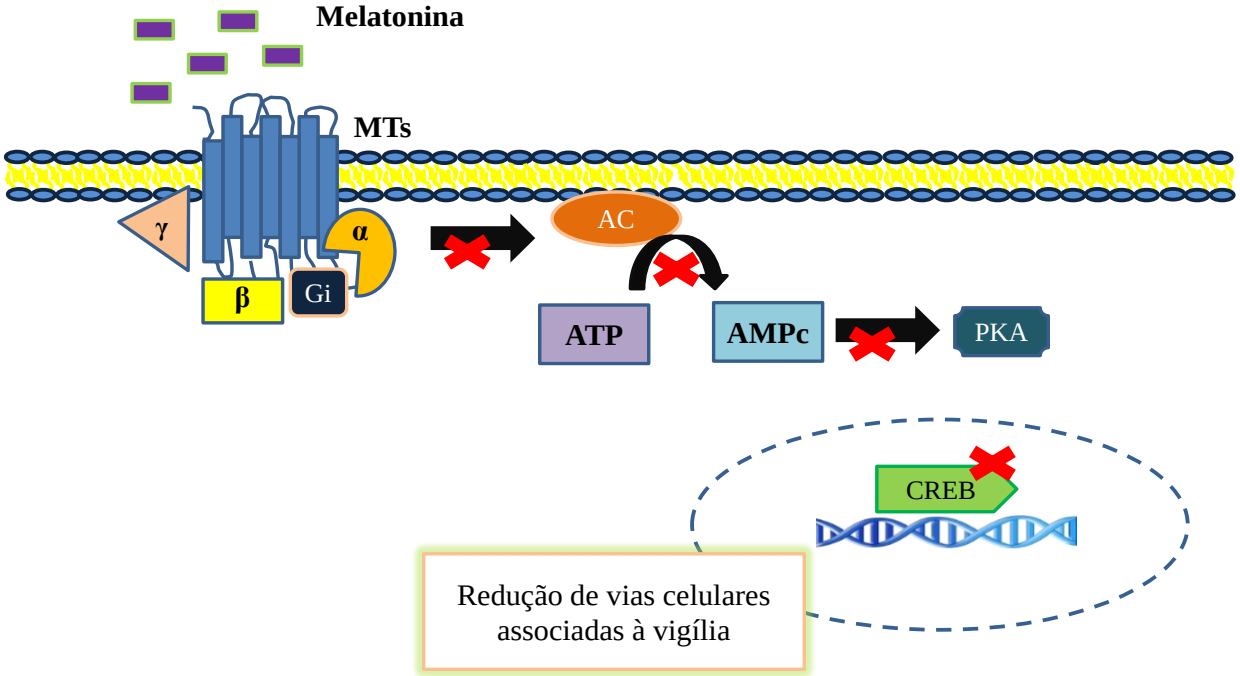
A via de síntese da melatonina inicia-se com o aminoácido essencial triptofano, o qual será hidroxilado, pela enzima triptofano-hidroxilase e originará a molécula 5-hidroxitriptofano, que por sua vez será substrato de uma descarboxilase de aminoácidos aromáticos inespecífica, o que resulta na síntese de serotonina (KLEIN et al., 2002; KLEIN; BERG; WELLER, 1970). A serotonina será acetilada, pela enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AANAT), e originará a *N*-acetilserotonina. A expressão/atividade da AANAT é determinante para desviar a serotonina para a via de síntese da melatonina e, portanto, essencial para sua síntese noturna. A partir daí a *N*-acetilserotonina será metilada

pela enzima acetilserotonina metiltransferase (ASMT), também chamada de hidroxindol-*O*-metiltransferase (HIOMT), e finalmente originará a melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) (HUANG; LIU; BORJIGIN, 2010; KLEIN et al., 2002; YU; SCHAAD; KLEIN, 1993).

Nos mamíferos esse mecanismo bioquímico torna-se ativo durante a noite, desde que na ausência de luz (conforme já mencionado), e seu pico de secreção, em seres humanos, na maioria da população, se dá por volta de 2 e 3 horas da manhã. Sua dosagem pode ser diretamente plasmática ou salivar ou, ainda, pela aferição de seu metabólito de excreção urinária, a 6-sulfatoximelatonina, formado a partir de seu metabolismo hepático (REITER, 1996).

Quando secretada, uma das formas de ação da melatonina decorre de sua interação com receptores específicos de membrana, acoplados à proteína G (MT1 ou MTNR1A; MT2 ou MTNR1B). Ao interagir com seus receptores ligados especificamente à proteína G_i, dispara uma via de sinalização intracelular caracterizada pela inibição da enzima adenilato ciclase (AC), a qual modula a conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e, portanto, essa reação estará reduzida e provocará menor concentração de AMPc intracelular. Esses eventos reduzirão a ativação da proteína quinase A (PKA), bem como fatores transcricionais CREB o que pode, por exemplo, inativar diversas vias associadas à vigília (**Figura 1**).

Figura 1- Via de sinalização intracelular da melatonina via receptores acoplados à proteína Gi.

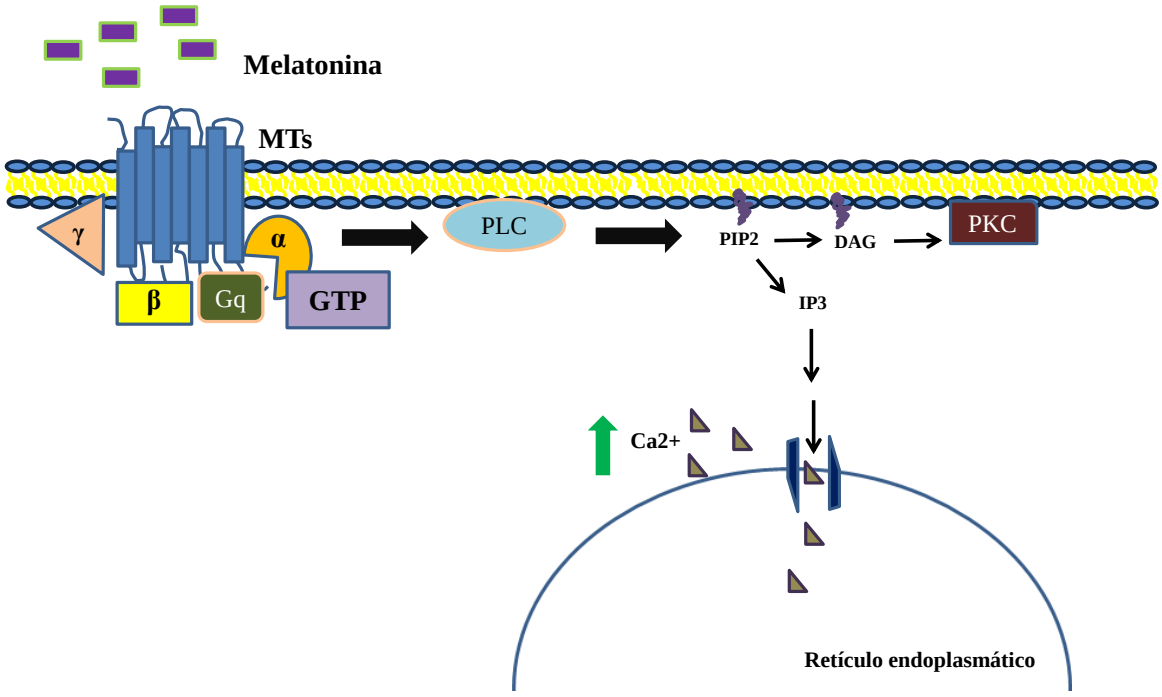


A interação entre melatonina e receptores MT1 ou MT2 acoplados à proteína Gi inibe a via de sinalização

intracelular (AC/ AMPc/ PKA/ CREB) o que promove redução na transcrição de genes, por exemplo, associados ao sistema de vigília (Elaborado pelo próprio autor).

Esses receptores também podem, dependendo do tecido no qual estão presentes, acoplar-se à proteína Gq e, nesse caso, a subunidade α ligada ao GTP ativará fosfolipase C (PLC) de membrana que, por sua vez, clivará fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP2) em dois componentes, o IP3 (1,4,5-inositol trifosfato) e o DAG (diacilglicerol). IP3 atua em um receptor específico/canal para Ca^{2+} localizado na membrana do retículo endoplasmático, o que induz liberação de cálcio para o citoplasma; DAG permanece na membrana e ativa proteína quinase C (PKC), a qual, também é dependente de Ca^{2+} (**Figura 2**) (AMARAL et al., 2019; BLASK et al., 2005; CECON; LIU; JOCKERS, 2019; CIPOLLA-NETO et al., 2014; COMAI; GOBBI, 2014; DUBOCOVICH et al., 2010; REPPERT; WEAVER; GODSON, 1996).

Figura 2- Via de sinalização intracelular da melatonina via receptores acoplados à proteína Gq.



A interação entre melatonina e receptores MT1 ou MT2 acoplados à proteína Gq ativa a via de sinalização intracelular (GTP/ PLC/ IP3 e DAG/ Ca^{2+}/ PKC) (Elaborado pelo próprio autor).

Os efeitos noturnos da melatonina, dependentes de sua interação com seus aceptores moleculares recebem o nome de "efeitos imediatos". Por outro lado, a presença noturna de melatonina também é capaz de expressar efeitos quando não mais está presente na circulação sanguínea: são denominados de "efeitos proximais" aqueles manifestados no período da manhã, e "efeitos tardios" aqueles manifestados ao longo do dia (CIPOLLA-NETO;

AMARAL, 2018)

De modo geral, a inibição decorrente à interação de melatonina com receptores cuja via de sinalização intracelular é dependente de proteína Gi é de extrema importância para que essa indolamina determine os chamados “efeitos proximais” ou “consecutivos”, que aparecem imediatamente após cessar a síntese de melatonina pineal, ou seja, na manhã. Há também efeitos descritos como “tardios”, “distais” ou “prolongados” que são dependentes da regulação, promovida pela melatonina, de genes relógio em diversos tecidos que podem ser dependentes de outros genes (genes controlados pelos genes relógio) e que, portanto, caracterizam funcionalmente esses tecidos e podem se expressar a qualquer momento das 24 horas seguintes. Nesse sentido, a presença noturna da melatonina é capaz de modular funções centrais e periféricas durante todo o dia seguinte até que ocorra um novo episódio de sua secreção na noite seguinte (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018).

Outro possível mecanismo de ação mediado por receptores decorre de sua capacidade de modular funções através de receptores nucleares da família retinóide (RZR e ROR). Essa interação induz aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e caracteriza uma importante função da melatonina na regulação da atividade de células do sistema imune (GUERRERO; POZO, 2000).

A melatonina também é capaz de desempenhar funções de maneira independente à interação com receptores (AMARAL et al., 2019; CIPOLLA-NETO et al., 2014), determinado por sua característica química anfifílica, que lhe permite difundir-se tanto em meio aquoso quanto lipídico e estar presente em qualquer compartimento do organismo. Um exemplo dessa ação não mediada por receptores é a sua capacidade antioxidante. Os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico da molécula de melatonina, são conectados por dupla ligação, tornando-a potente neutralizador de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Essa função antioxidante lhe confere um papel funcional importante nas mitocôndrias, pois é capaz de quelar diretamente radicais livres formados ao longo da respiração celular (AMARAL et al., 2019; REITER et al., 1999; TAN et al., 2002; TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005). Além disso, tem a capacidade (agora por uma ação dependente de receptores) de regular a expressão de enzimas antioxidantes clássicas como a glutationa peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) (REITER et al., 1999). A ação não mediada por receptores é considerada e decorre da interação molecular entre melatonina e enzimas do tipo quinona redutase 2 que, muitas vezes são mencionados como receptores MT3 (AMARAL et al., 2019).

Dentre a variedade de funções nas quais a melatonina pineal participa, destaca-se a regulação endócrina da reprodução (GOLDMAN, 2001); regulação do sistema cardiovascular,

mais precisamente da pressão arterial (MCKINLEY et al., 1990) e regulação do sistema imune (FRASCHINI et al., 1990). Ainda, como poderoso agente cronobiótico, a melatonina é responsável pela sincronização de diversos ritmos biológicos e capaz de controlar oscilações endógenas de parâmetros fisiológicos, tais como a secreção de hormônios, renovação celular, controle da temperatura do organismo, digestão, pressão arterial e frequência cardíaca (BRZEZINSKI, 1997; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018); parâmetros comportamentais, como humor, desempenho cognitivo (ECKEL-MAHAN et al., 2008; GERSTNER et al., 2009) e estado de sono e vigília (ARMSTRONG, 1989); além de estar envolvida em processos anti-inflamatórios, por meio de suas propriedades antioxidantes e imunomoduladoras (KARASEK, 2007). Outra importante função, que será abordada com mais detalhes adiante, refere-se à sua participação no metabolismo energético (CIPOLLA-NETO et al., 2014; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018).

1.1 Melatonina materna e plasticidade fenotípica

Durante o desenvolvimento intrauterino, fatores ambientais podem induzir alterações críticas no desenvolvimento do organismo e, portanto, no período pré-natal, insultos relacionados ao estresse, ingestão de álcool, fármacos, nutrição e exercícios físicos podem influenciar a estruturação, maturação e funcionamento dos sistemas fisiológicos (DRAKE; WALKER; SECKL, 2005; LAU; ROGERS, 2004; ROSENFELD; WELLER, 2012).

Especialmente no sistema reprodutor feminino, evidências demonstram capacidade de produção *per se* de melatonina por algumas estruturas que o compõe: oócitos (gametas femininos), ovários (gônadas femininas), células do *cumulus* (estruturas formadas ao longo do desenvolvimento folicular no ciclo ovariano) e placenta (órgão transitório de comunicação entre organismo materno e fetal). Em tais órgãos/estruturas é observada maior concentração de melatonina em relação à circulação sanguínea o que a confere relevante capacidade de, além de outras importantes ações, agir contra possíveis danos oxidativos durante a maturação dos oócitos e ovulação, momento em que há maior produção de radicais livres. Na placenta, durante a gestação, as células do trofoblasto (citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto que se desenvolvem ao longo da implantação uterina), além de serem importantes fontes de melatonina local, também possuem receptores desta indolamina (MT1 e MT2) (CHUFFA et al., 2020; REITER et al., 2014).

A melatonina é uma das poucas substâncias capazes de cruzar a barreira placentária sem sofrer alterações estruturais e, neste sentido, desempenha importante papel na regulação de ritmos biológicos no feto e neonato, além de ser detectada no leite materno (KLEIN, 1972;

OKATANI et al., 1998; SCHENKER et al., 1998; VERMOUTH et al., 1995) e de exercer importante função na neuroproteção e neurodesenvolvimento (MOTTA-TEIXEIRA et al., 2018; WILKINSON; SHEPHERD; EUAN, 2016). Esses fatores, associados a capacidade de melatonina hormonal materna sinalizar ao feto em desenvolvimento o fotoperíodo externo, demonstram claramente a importância da melatonina materna, não apenas na sincronização dos ritmos do feto, mas também na preparação o organismo fetal para lidar, ao nascer, com ambiente externo, representados pelo dia e a noite e pela estação do ano.

Em humanos observou-se o mesmo ritmo de melatonina circulante materna no feto (KENNAWAY; GOBLE; STAMP, 1996; OKATANI et al., 1998; REITER et al., 2014) e, experimentalmente, após exposição materna ao claro constante, a abolição deste ritmo interferiu na expressão fetal de genes relógio, eventos estes revertidos pela reposição diária de melatonina materna (REITER et al., 2014; TORRES-FARFAN et al., 2006). Assim, é importante ressaltar que o feto e os recém nascidos, são exclusivamente dependentes da melatonina materna, visto que, sua síntese só ocorre semanas após o nascimento (BELLAVÍA et al., 2006; KENNAWAY; GOBLE; STAMP, 1996; OKATANI et al., 1998).

Em relação ao metabolismo energético, já foi demonstrado experimentalmente que, a ausência de melatonina, durante a gestação e lactação, determina nos descendentes, quando adultos, intolerância à glicose, principalmente em decorrência da resistência hepática à insulina e da secreção reduzida desse hormônio (FERREIRA et al., 2012a).

1.2 Insulina, metabolismo energético e melatonina

Nos últimos anos diversos trabalhos descreveram o importante papel da melatonina na atividade de tecidos metabolicamente ativos, como fígado e tecidos adiposos (branco e marrom), bem como na fisiopatologia do diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) e da obesidade (BORGES-SILVA et al., 2005; GOSH et al., 2007; LIMA et al., 2017; NISHIDA et al., 2003; PICINATO et al., 2008; SERAPHIM et al., 1997; ZANQUETTA et al., 2003), o que a destaca como reguladora do metabolismo de carboidratos, por meio do controle da secreção de insulina (PICINATO et al., 2008) e de sua ação biológica (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

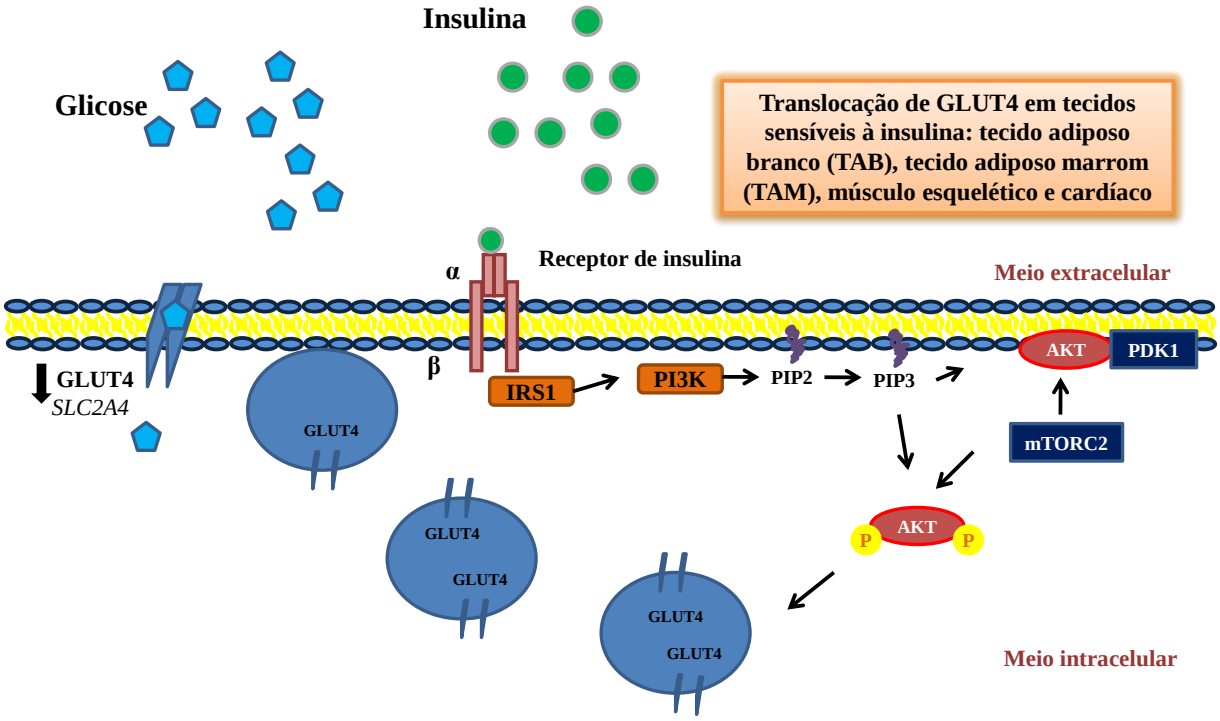
A insulina é um hormônio proteico sintetizado pelas células beta das ilhotas pancreáticas e estocado em vesículas secretórias até que haja estímulo para sua extrusão (DEENEY; PRENTKI; CORKEY, 2000). É composto de duas cadeias polipeptídicas (cadeia A e cadeia B), as quais são ligadas por pontes dissulfeto e, sua síntese, ocorre no retículo endoplasmático rugoso, posteriormente transportado para o complexo de Golgi, onde será empacotado na forma de grânulos secretores (GANONG, 2006).

Destes grânulos, a insulina é secretada para a circulação sanguínea, principalmente, por estímulo proveniente da metabolização de substratos energéticos, pelas células secretoras de insulina, tais como a glicose, que é seu principal secretagogo (HABER et al., 2001). Este estímulo é percebido pelo influxo de glicose na célula beta, através do transportador de glicose de isoforma 2 (GLUT2), (MUECKLER, 1994), com consequente fosforilação e metabolização da molécula de glicose, que promove aumento da relação ATP/ADP e que, por sua vez, induz aumento da probabilidade de fechamento dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e, consequentemente, acúmulo intracelular deste íon o que resulta na despolarização da membrana celular. Esses eventos favorecem a abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem e aumento do influxo de cálcio que, aliado à metabolização de glicose, promove consecutivas fosforilações de proteínas, e exocitose dos grânulos com insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN, 2002; HABER et al., 2001).

O receptor para insulina é uma glicoproteína constituída por duas subunidades, α e β, unidas por ligações dissulfeto. A subunidade α é localizada externamente à membrana celular e possui o sítio de ligação para o hormônio. A subunidade β cruza a membrana e possui atividade tirosina quinase intrínseca (no citosol), a qual permite que estas subunidades se autofosforilem em tirosina (BJÖRNHOLM; ZIERATH, 2005; KAHN, 1985; KASUGA; KARLSSON; KAHN, 1982).

Quando fosforilado, o receptor para insulina permitirá tanto a ligação quanto a fosforilação de resíduos de tirosina de vários substratos proteicos intracelulares, chamados de IRS (*insulin receptor substrate*), por exemplo, o IRS1 (CARVALHEIRA; ZECCHIN, 2002). Na sequência, há ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (BIDDINGER; KAHN, 2006; CARVALHEIRA; ZECCHIN, 2002; GOSH et al., 2007; KANZAKI, 2006) e estímulo para sua mobilização à membrana plasmática (OLSON, 2012), o que favorece sua ação em substratos lipídicos, em particular, o PIP2 que origina o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; KANZAKI, 2006; OLSON, 2012). O PIP3 pode recrutar proteínas como a AKT/PKB (*protein kinase B*), pela interação com domínios específicos (domínio PH). A AKT deverá ser fosforilada pela quinase dependente de fosfoinositídeos 1 (PDK1) e pelo complexo mTORC2 (OLSON, 2012; TOKER; MARMIROLI, 2014) e, a partir daí, vários eventos podem ocorrer, em destaque, a translocação das vesículas citoplasmáticas contendo transportadores de glicose de isoforma 4 (GLUT4) (**Figura 3**) (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; OLSON, 2012), altamente expresso nos tecidos adiposos branco (TAB) e marrom (TAM) e nos músculos cardíaco e esquelético.

Figura 3- Via de sinalização intracelular da insulina em tecidos responsivos.



Na figura acima é possível observar que a interação entre o hormônio e seu receptor [expresso em tecidos sensíveis a sua ação, tais como os adiposos branco (TAB) e marrom (TAM), além de músculo esquelético e cardíaco], desencadeia uma série de fosforilações intracelulares que culminam em ativar a AKT, por meio da fosforilação, a qual estimula a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática e posterior captação de glicose pela célula e, portanto, seu *clearance* plasmático (Elaborado pelo próprio autor).

A translocação de GLUT4, em reposta ao estímulo insulínico (CARVALHEIRA; ZECCHIN, 2002; JENNI et al., 2014; ROSENBAUM; LEIBEL, 2014; THORENS; CHARRON; LODISH, 1990; TOZZO; GNUDI; KAHN, 1997; WARDZALA; CUSHMAN; SALANS, 1978), induz o aumento do número destes transportadores de glicose na membrana celular e, consequentemente, a captação da glicose (BRADY; PESSIN; SALTIEL, 1999; MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1994; NOV et al., 2013). Contrariamente, quando decaem os níveis de insulina, há internalização desses transportadores, e redução do influxo de glicose (REA; JAMES, 1997).

Caso estas vias não funcionem de forma adequada, caracteriza-se a resistência à insulina que é definida como uma resposta biológica menor do que a esperada para determinada dose de insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Existem evidências de que a resistência à insulina, em longo prazo, está relacionada com a redução no conteúdo de GLUT4 e na sua expressão (cuja codificação se dá pelo gene *Slc2a4*) (BELPIEDE, 2015; CÔRREA-GIANNELA; MACHADO, 2013). Nesse sentido, por mais que a insulina interaja com seu receptor e desencadeie sua resposta intracelular, conforme

descrito anteriormente, se houver redução de *Slc2a4/*GLUT4, a densidade de transportadores na membrana celular será reduzida e a captação de glicose pelos tecidos não será eficiente, o que resultará em hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória (BELPIEDE, 2015).

Estudos demostraram que a ausência experimental da melatonina (decorrente da pinealectomia) pôde induzir resistência à insulina e intolerância à glicose, devido tanto a redução da responsividade à insulina (ANHÊ et al., 2004; LIMA et al., 1998) quanto à redução na expressão de *SLC2A4* e conteúdo proteico de GLUT4 (GOSH et al., 2007; SERAPHIM et al., 1997; ZANQUETTA et al., 2003).

Há evidências de que a melatonina, *per se*, ao interagir com receptores MT1, seja capaz de fosforilar em tirosina o receptor da insulina e desencadear subsequentes fosforilações intracelulares associadas aos efeitos biológicos da insulina (ANHÊ et al., 2004; PICINATO et al., 2008).

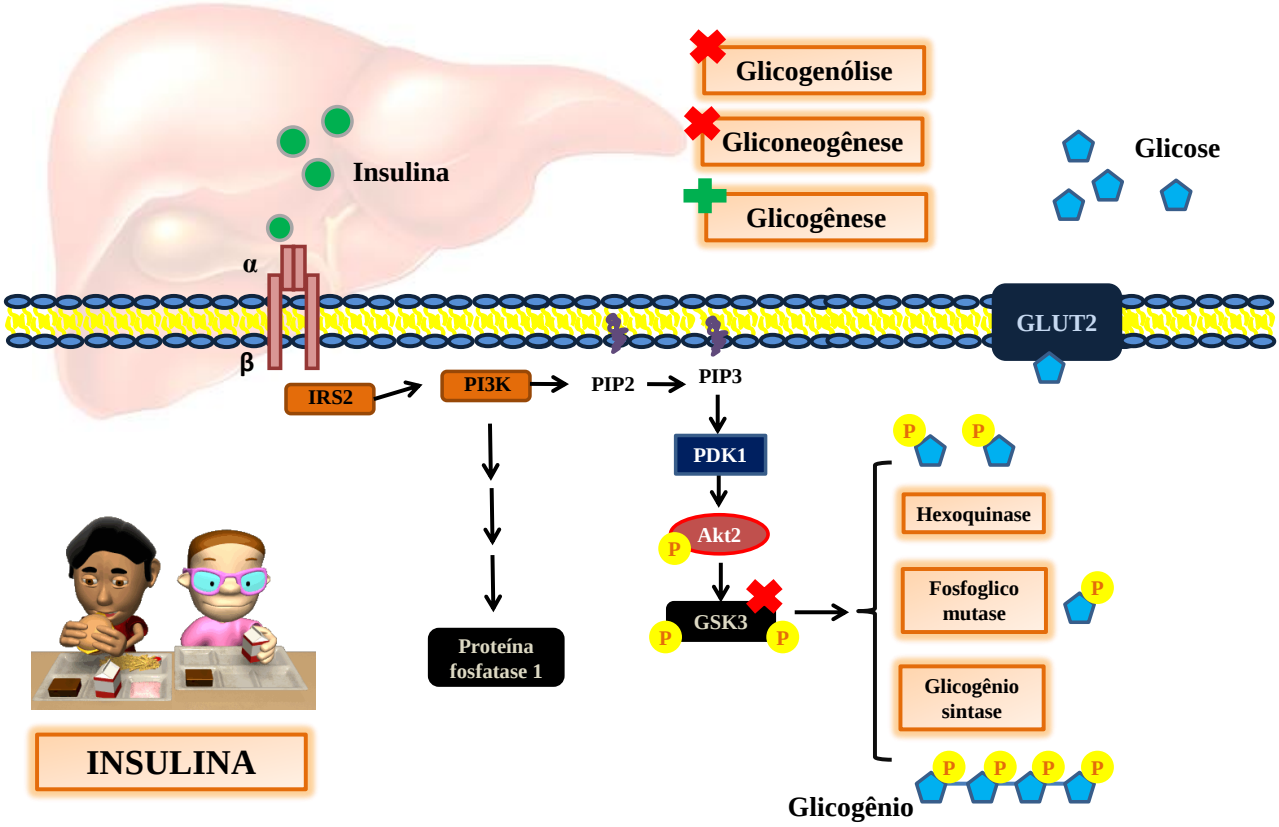
1.3 Tecido hepático, metabolismo energético e melatonina

O tecido hepático exerce diversas funções metabólicas para garantir a homeostase glicêmica (ADEVA-ANDANY et al., 2016; MADRIGAL-MATUTE; CUERVO, 2016): além de utilizar glicose, o fígado é capaz de sintetizá-la e liberá-la para a circulação sanguínea (GUILLEMAIN et al., 2000). A glicose absorvida da alimentação acessa o hepatócito por meio do transportador GLUT2, codificado pelo gene *Slc2a2*, e pode seguir diferentes vias metabólicas que se caracterizam por processos de síntese ou de degradação (oxidação). Dentre esses processos pode-se destacar a glicólise que representa uma via de degradação de glicose para produção imediata de energia, a glicogênese (síntese de glicogênio) e lipogênese (síntese de lipídeos) como exemplos de vias de síntese e a glicogenólise (degradação de glicogênio) que caracteriza outra importante via oxidativa (ADEVA-ANDANY et al., 2016; IYNEDJIAN et al., 1995; PERRY et al., 2014).

Uma vez que a insulina interage com seu receptor específico na célula hepática, promove uma via de sinalização intracelular semelhante a discutida anteriormente para translocação de GLUT4: ativa-se IRS2 que induzirá ativação de PDK1 e fosforilação de AKT2 que, por sua vez, promove a fosforilação da GSK3 (*glycogen synthase kinase-3*). A GSK3 fosforilada e, portanto, inativa, permite que outras enzimas importantes para a via sejam ativadas: a hexoquinase, por exemplo, incorpora grupo fosfato no carbono 6 das moléculas de glicose que acessaram o citoplasma celular através do GLUT2; a fosfoglicomutase troca o fosfato do carbono 6 para o carbono 1 e a glicogênio sintase que, por fim, promove a união das moléculas de glicose-1-fosfato para formação da molécula de

glicogênio (**Figura 4**). Apesar de a insulina ser de extrema importância para ativação de enzimas responsáveis pela síntese de glicogênio, a presença de glicose também é imprescindível para inibir a enzima glicogênio fosforilase, que participa do processo de glicogenólise (**Figura 5**) (PERRY et al., 2014).

Figura 4- Glicogênese ativada em hepatócitos.

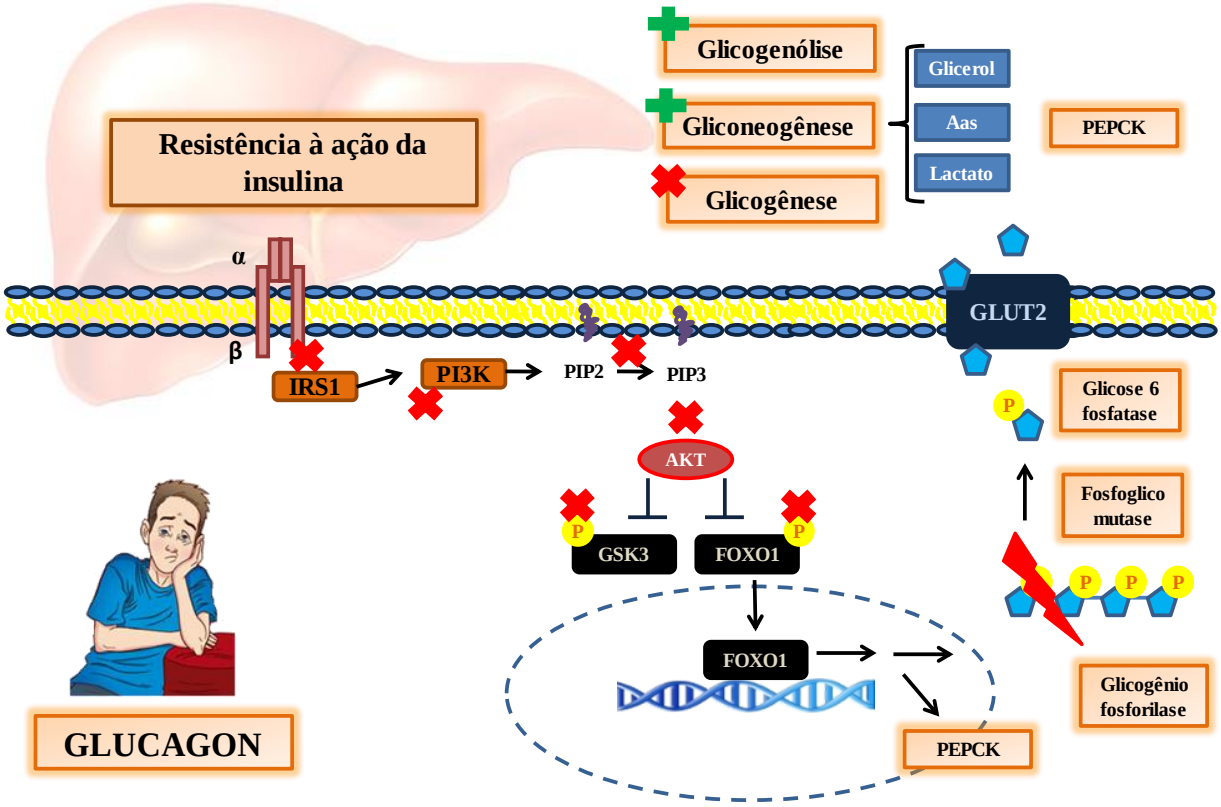


A presença da insulina na circulação sanguínea em período pós prandial promove maior atividade de proteínas e enzimas responsáveis por vias de síntese. A imagem representa a via da glicogênese que também ocorre em tecido muscular esquelético: Após captação de glicose pelo GLUT2, a maquinaria intracelular/molecular proporciona síntese de glicogênio como reserva energética, a partir da fosforilação da glicose em seu carbono 6 (por ação da hexoquinase) seguida de modificação do grupo fosfato pela enzima fosfoglicomutase e, por último, união das moléculas de glicose fosforiladas em glicogênio, pela ação da glicogênio sintase (Elaborado pelo próprio autor).

Outra via metabólica capaz de ser ativada no fígado relaciona-se à conversão de moléculas não glicídicas em glicose, a gliconeogênese (CHUNG et al., 2015; NELSON; COX, 2014; TAPPY; JÉQUIER; SCHNEITER, 2000) que envolve ação da enzima-chave PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*), codificada pelo gene *Pck1*. A insulina é o principal hormônio inibidor da gliconeogênese, pois modula a expressão de *Pck1*: em uma situação de resistência à insulina ou em situações de privação alimentar, a PEPCK torna-se ativa e permite a produção hepática de glicose à partir de substratos provenientes de

moléculas lipídicas e proteicas, o que pode contribuir para hiperglicemia (MICHAEL et al., 2000; NELSON; COX, 2014). Nessas condições a atividade de AKT2 está diminuída o que facilita a translocação de FOXO1 (*forkhead box protein O1*) para o núcleo e aumento da expressão de proteínas relacionadas a gliconeogênese, como a PEPCK, além da via de síntese hepática de glicose à partir de enzimas como a G6Pase (*glucose-6-phosphatase*) e a glicogênio fosforilase que torna-se ativa na ausência de glicose (**Figura 5**) (PERRY et al., 2014).

Figura 5- Glicogenólise e gliconeogênese ativada em hepatócitos.



Em situações de privação alimentar ou de resistência à ação da insulina é possível que vias catabólicas sejam ativadas no tecido hepático: a glicogenólise, que é desencadeado, principalmente pela ausência de insulina (durante a privação alimentar) ou, ainda, pela resistência à sua ação, o que reduz a fosforilação de determinadas proteínas e enzimas da via de sinalização intracelular o que facilita a translocação de FOXO1 para o núcleo, cujo principal papel é ativar enzimas como PEPCK (responsável pela gliconeogênese), além da glicogênio fosforilase e G6Pase (responsáveis pela degradação hepática de glicogênio) (Elaborado pelo próprio autor).

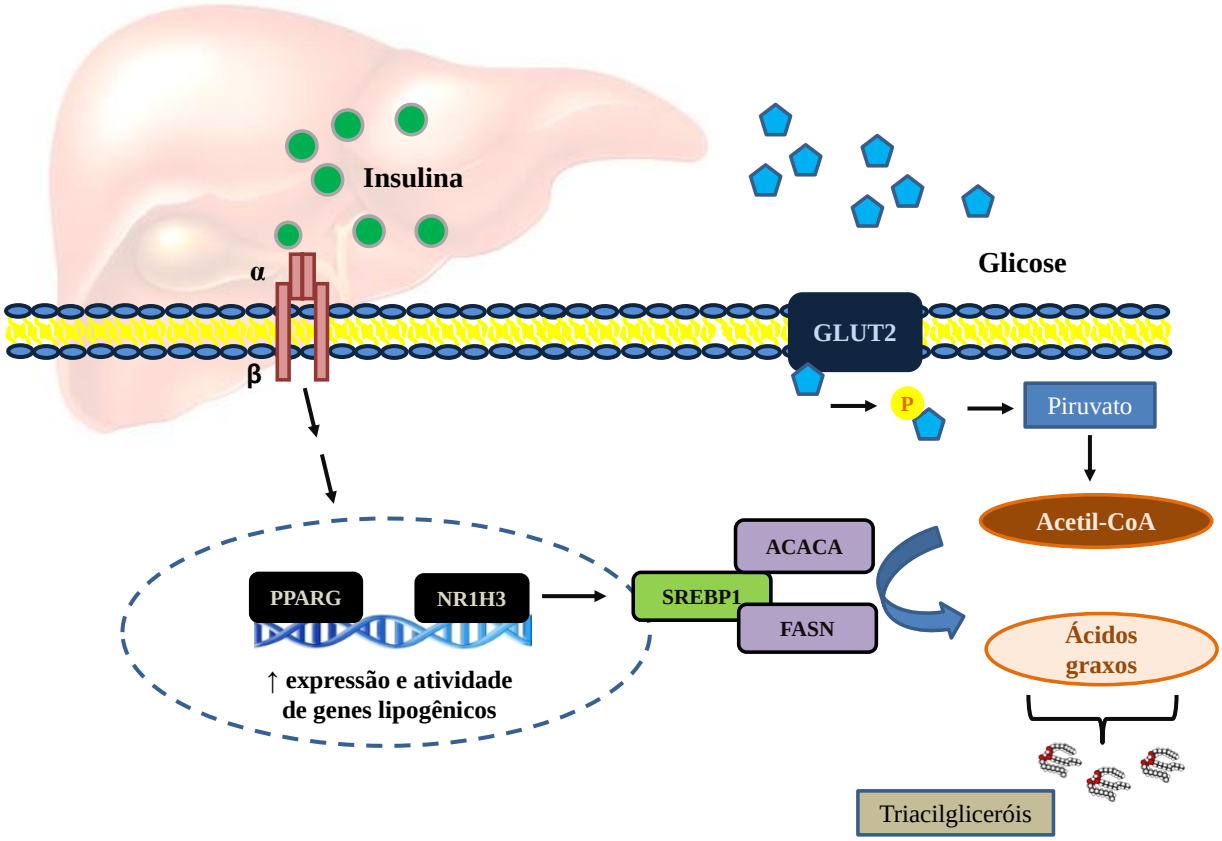
A capacidade hepática em estocar carboidratos após sua captação é limitada e, quando excedida, a glicose adicional é convertida inicialmente a ácidos graxos, os quais são esterificados e originam triacilgliceróis e são secretados na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein*- VLDL). Essa produção se dá pelo aumento do influxo de piruvato no interior da mitocôndria, onde serão convertidos a acetil-CoA; moléculas de acetil-CoA retornarão ao citoplasma na forma de citrato estimulado por fatores

nutricionais e hormonais. A insulina, presente na circulação sanguínea em período pós-prandial, interage com receptores específicos e promove uma cascata de sinalização intracelular responsável pela ativação de enzimas específicas que, por sua vez, recrutarão fatores transcricionais reguladores de genes lipogênicos (DENTIN; GIRARD; POSTIC, 2005).

Dentre os principais fatores transcricionais envolvidos nesse processo pode-se destacar o LXR (*liver X receptors*, codificado pelo gene *NR1H3*) que deverá interagir com regiões promotoras de genes lipogênicos, tais como SREBPs (*sterol regulatory element-binding protein*) que, por sua vez, ativará ACC (*acetyl-CoA carboxylase*, codificado pelo gene *ACACA*) e FAS (*fatty acid synthase*, codificado pelo gene *FASN*) considerados enzimas-chave para esse processo (CARVALHEIRA et al, 2002; WANG et al, 2015; DRÃGOI et al, 2019) e o PPARG (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) que regula a expressão de genes associados ao metabolismo de lipídios e de lipoproteínas em diversos tecidos, tais como no fígado (GAO et al., 2013). A lipogênese é ativada e a formação de ácidos graxos ocorre a partir de moléculas de acetil-CoA (que pode ser proveniente do metabolismo de carboidratos ou de outros substratos) no citosol dos hepatócitos, o que propicia e caracteriza o desenvolvimento de um fígado gorduroso (**Figura 6**) (DRĂGOI, 2019; MCDEVITT et al., 2001).

Ao considerar a homeostase glicêmica, evidências científicas apresentaram efeitos positivos da administração de melatonina neste processo: além de ser importante no controle da tolerância à glicose, sensibilidade à insulina e aumento de massa adiposa, parece modular a gliconeogênese hepática; efeitos estes contrariamente apresentados após pinealectomia (DIAZ; BLAZQUEZ, 1986). Logo, a ausência de melatonina em animais, se correlaciona à características diabetogênicas por meio da intolerância à glicose e resistência à insulina (LIMA et al., 1998). Alterações metabólicas associadas à redução dos níveis plasmáticos de melatonina, como ocorrem no envelhecimento, trabalho noturno e exposição à luz durante a noite, podem ser melhoradas com sua reposição (AMARAL et al., 2019; CIPOLLA-NETO et al., 2014).

Figura 6- Lipogênese ativada em hepatócitos.



A insulina ou mesmo um estado de resistência à sua ação e a presença de inflamação subclínica podem ativar a expressão de genes lipogênicos, tais como como PPARG, NR1H3, SREBP, ACACA e FASN. O aumento na captação de glicose pelo tecido hepático facilita a formação do substrato acetil-CoA para a lipogênese e esses dois eventos em conjunto proporcionarão a formação de moléculas de triacilgliceróis e maior depósito lipídico nesse tecido (Elaborado pelo próprio autor).

1.3 Tecidos adiposos (branco e marrom), metabolismo energético e melatonina

Há tempos o TAB foi conhecido com sua função de armazenamento de energia, sob a forma de moléculas de triacilgliceróis, entretanto, à partir de 1994, com a descoberta da leptina, o tecido adiposo passou a ser visto como um importante órgão endócrino (ZHANG et al., 1994). Atualmente é considerado com significante função na homeostase energética (PARK, 2014). As células que compõem o TAB interagem entre si por meio da secreção de adipocinas, as quais atuam de maneira autócrina, parácrina e endócrina (ARMSTRONG, 1989; LIMA, F. B.; CURI, 2012; ROSENWALD; WOLFRUM, 2014).

A descoberta da leptina como adipocina foi um importante marco para que o TAB fosse considerado como um importante órgão endócrino e com fundamental importância na homeostase energética. Fisiologicamente a leptina quando presente em maior quantidade na circulação sanguínea sinaliza ao organismo maior volume de massa adiposa branca e induz efeitos anorexigênicos em neurônios hipotalâmicos. Além da leptina, a concentração de outras

adipocinas pode estar elevada quando há maior volume de massa adiposa branca, o que aumenta o risco para desenvolvimento de diversas desordens metabólicas (TRAN; KAHN, 2010). As evidências demonstram correlação positiva entre um maior volume de TAB e a atividade de adipocinas pró-inflamatórias (HOTAMISLIGIL et al., 1995), em adição ao aumento de MCP1 (*monocyte chemoattractant protein* 1) que promove diferenciação dos monócitos em macrófagos ativos (XU et al., 2015). Dentre essas adipocinas destaca-se elevada expressão de TNFA (*tumor necrosis factor alpha*) (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993), IL1B (*interleukin* 1beta) (KOIVISTO; PELKONEN; CANTELL, 1989; NELSON; WALSH; SHEEHAN, 1994) e IL6 (*interleukin* 6) (PICKUP et al., 1997; YUDKIN et al., 1999).

Nesse sentido, uma condição inflamatória crônica originária do TAB e provocada pela maior secreção de adipocinas pró-inflamatórias vem sendo associada à co-existência de doenças, tais como o DM2, doença metabólica caracterizada pelo aumento de glicose sanguínea induzido por anormalidade na secreção e/ou na ação da insulina, bem como redução na expressão de *Slc2a4* e conteúdo de GLUT4) (BELPIEDE, 2015; CÔRREA-GIANNELA; MACHADO, 2013). O DM2 parece ser precedido de resistência à insulina em três importantes territórios metabólicos: fígado e tecidos adiposos branco e marrom, que podem ser afetados por diversos outros eventos a serem discutidos ao longo do trabalho.

O tecido adiposo marrom (TAM), apesar de não ter uma função diretamente relacionada com reservatório de energia, possui importância na manutenção do gasto energético, visto que sua principal característica é a participação na regulação do dispêndio energético, principalmente por meio do controle da temperatura corporal (MÖSSENBÖCK et al., 2014), pela maior ou menor termogênese, a qual oxida um substrato e dissipa a energia gerada sob a forma de calor (CANNON; NEDERGAARD, 2004; MÖSSENBÖCK et al., 2014). A função termogênica deste tecido decorre da presença da proteína desacopladora 1 (*uncounpling protein* 1- UCP1), expressa na membrana interna das mitocôndrias de seus adipócitos (BAE et al., 2014).

A presença de TAM em humanos adultos não era tão bem definida, mas nos últimos anos, vêm sendo investigada e relacionada ao gasto energético, controle glicêmico e sensibilidade à insulina (MÖSSENBÖCK et al., 2014). Nos mamíferos, esse tecido é inervado por fibras simpáticas e, a liberação de noradrenalina (NA), induz aumento da atividade termogênica pela produção de calor, além do aumento na capacidade termogênica pela adipogênese marrom, biogênese mitocondrial e síntese de proteínas termogênicas, tais como a UCP1 (BAE et al., 2014; CANNON; NEDERGAARD, 2004).

O TAM também pode ser influenciado pela inflamação proveniente do TAB, o que parece induzir menor expressão de RNA mensageiro (RNAm) para UCP1. Em consequência desse evento há redução na atividade mitocondrial local, o que dificulta o dispêndio de energia (BAE et al., 2014). Além disso, existem evidências de que o consumo lipídico elevado (gordura saturada) pode levar à resistência à insulina no TAM (YIFU QIU et al., 2014).

A termorregulação designa um mecanismo de controle da temperatura corporal, mantendo-a em níveis aproximadamente constante em diferentes condições ambientais, através de um balanço entre produção e dissipação de calor do corpo para o ambiente, com a utilização de processos fisiológicos e comportamentais. As trocas de calor com o ambiente em animais endotérmicos (por exemplo, os roedores), em alguns intervalos de temperatura ambiente, os permite gastar menos energia para termorregulação, o que denomina-se de intervalo de termoneutralidade. Um ambiente com temperaturas abaixo deste intervalo é conhecido como subneutro ou frio e requer elevação da taxa da produção de calor metabólico, por processos de termogênese, e redução das perdas. Já um ambiente com temperaturas acima do intervalo termoneutro é denominado de supraneutro ou quente e caracterizado por elevar a dissipação de calor e reduzir a termogênese (GORDON, 1990).

Portanto, animais endotérmicos são capazes de manter a temperatura interna, dentro de limites estreitos, independentemente das variações de temperatura externa (BLIGH; JOHNSON, 1973) o que depende da integração entre informação térmica interna e ambiental pelo sistema nervoso central (SNC) ativadora de uma resposta termorregulatória apropriada (BOULANT, 1998). Em ratos, há quatro componentes principais do sistema termorregulatório: (1) os receptores térmicos (sensores); (2) os neurônios integrativos e de controle do SNC (comparador); (3) os mecanismos efetores responsáveis pela produção, conservação e dissipação de calor (controlador); (4) e a temperatura da pele da cauda (sistema controlado pela constrição ou dilatação vascular) (GORDON, 1990).

Neste sentido, a depender da temperatura em que são expostos, animais endotérmicos necessitam reduzir ou aumentar as trocas de calor com o ambiente, por meio de estruturas que se caracterizam por elevada razão superfície/volume, ausência de pêlos, densa rede de vasos sanguíneos e presença de anastomoses arteriovenosas (comunicação direta entre arteríolas e vênulas). Estes locais são de extrema importância para trocas de calor, ou seja, possuem elevada eficiência termorregulatória e são chamados de janelas térmicas (ANDRADE, 2015). A cauda dos roedores é um importante exemplo de janela térmica, haja visto que representa 7% da área de superfície corporal total, é um tecido altamente vascularizado, não apresenta

pêlos e permite rápida modificação do fluxo sanguíneo durante situações de estresse térmico (ROMANOVSKY; IVANOV; SHIMANSKY, 2002). A temperatura interna é, então, o resultado entre a produção de calor metabólico e a sua dissipação mantida por um conjunto de ajustes neurais, hormonais e comportamentais e que caracteriza a atividade termoefetora (MAICKEL et al., 1991)

Em ratos, os mecanismos autonômicos responsáveis pela dissipação de calor são o fluxo sanguíneo cutâneo e a perda evaporativa de calor (NAGASHIMA et al., 2000), enquanto que os responsáveis pela produção de calor são a termogênese associada ao tremor e a termogênese não associada ao tremor, sendo o último dependente da atividade fisiológica, principalmente, de adipócitos marrons.

Conforme brevemente antecipado, durante muito tempo acreditou-se que o TAM, em humanos, estivesse presente apenas em recém-nascidos, responsável pela termogênese sem tremor e que, ao longo do crescimento, sofresse involução e tornar-se-ia inexistente e/ou irrelevante na idade adulta (LEAN et al., 1986). A presença de TAM ativo em humanos adultos e sua importância fisiológica foi primeiramente sugerida em 2007 (NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007) e finalmente reconhecida em 2009 (CYPESS et al., 2009; SAITO et al., 2009; VAN MARKEN LICHTENBELT et al., 2009).

Atualmente, tanto a presença do TAM em humanos adultos, quanto sua capacidade termogênica nestes indivíduos, são consenso na literatura científica com estimativas de que este tecido seja responsável por um gasto calórico equivalente a 4.1 Kg por ano nesta fase da vida (VIRTANEN, 2009). A atividade do TAM parece reduzir com a idade (YONESHIRO et al., 2011), é inversamente proporcional ao índice de massa corporal (IMC) e à adiposidade visceral (CYPESS et al., 2009; WANG et al., 2015) e, ainda, parece ser menor em homens do que em mulheres (COHADE; MOURTZIKOS; WAHL, 2003; CYPESS et al., 2009; WANG et al., 2015).

O TAM é o único órgão encontrado com exclusividade em mamíferos. Uma de suas funções, a produção de calor, assegura a capacidade adaptativa desses seres vivos às mudanças ambientais de temperatura, especialmente no frio (JANSKÝ, 1973). A preparação para reserva energética e alterações metabólicas em antecedência ao ambiente hostil (baixas temperaturas e disponibilidade inadequada de alimentos) apresentam efeitos benéficos em termos de sobrevivência. Neste sentido, hipertrofiar, recrutar e ativar o TAM durante o inverno é um processo natural, capaz de aumentar a probabilidade de sobrevivência da espécie (TAN et al., 2011).

Conforme mencionado anteriormente o TAM também possui importante função na homeostase do balanço energético sinalizado pelo aumento da produção de calor e, consequentemente, maior gasto calórico, por exemplo, em situações de hiperfagia (STOCK, 1979). Neste caso, a função da termogênese induzida pela dieta é de transformar a energia química consumida a partir dos alimentos, em calor, contrariamente à função do TAB, de estocá-la, principalmente, sob a forma de gordura.

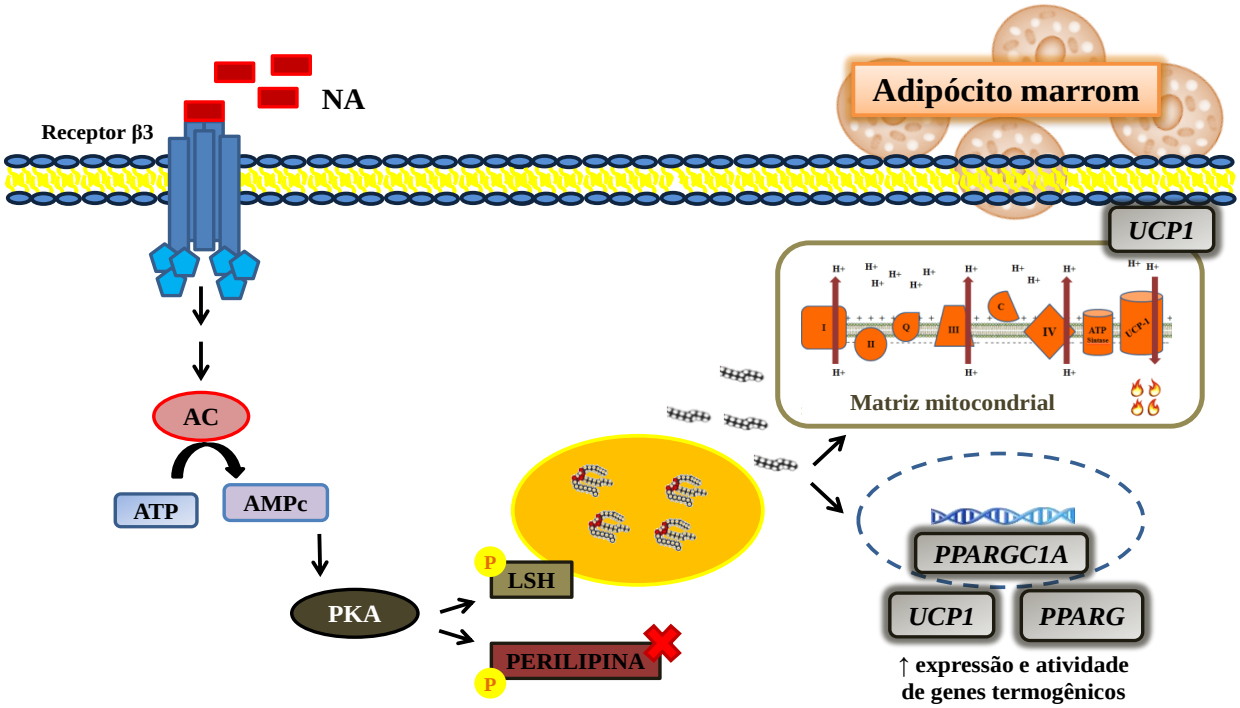
É importante destacar que o TAM é um tecido altamente vascularizado devido à necessidade de aporte adequado de nutrientes e oxigênio, bem como para permitir o processo de dissipação de calor. Neste tecido há gotículas que representam limitados depósitos de triacilglicerol, os quais são utilizados para um rápido suprimento energético e, sua inervação simpática, é necessária para rápida ativação. Para manutenção de termogênese prolongada, o TAM deve receber substratos (ácidos graxos e glicose) a partir da circulação (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Adipócitos marrons caracteristicamente expressam UCP1, proteína desacopladora responsável pelo seqüestro de elétrons na cadeia respiratória que, ao invés de serem incorporados na forma de energia química em moléculas de ATP, serão dissipados sob a forma de calor (GOLOZOUBOVA, VALERIA; HOHTOLA, E.; MATTHIAS, A.; JACOBSSON, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, 2001). Portanto, o TAM é metabolicamente ativo e sua função termogênica é capaz de deslocar o balanço energético no sentido do gasto calórico e retardar o ganho de peso corporal e, em alguns casos, induzir a perda. Acredita-se que a UCP1 seja a única proteína responsável por mediar a termogênese sem tremor: um trabalho publicado por GOLOZOUBOVA e colaboradores, em 2001, mostrou que camundongos deficientes em UCP1 tornaram-se incapazes de ativar o TAM quando expostos a baixas temperaturas e mesmo quando em condições de termoneutralidade, além de obesos, o que também demonstra importante função desta proteína na regulação do dispêndio energético (FELDMANN et al., 2009).

O recrutamento do TAM é mediado pela NA, o neurotransmissor do sistema nervoso simpático (SNS), que atua em receptores de membrana noradrenérgicos β3 e α1. Os receptores β3 encontram-se acoplados à proteína Gs; o estímulo simpático nestes receptores ativa a AC o que induz aumento intracelular de AMPc nos adipócitos marrons. Como resultado, a PKA formada estimula a lipase sensível à hormônio, uma importante enzima da lipólise, responsável pela liberação de ácidos graxos livres (AGLs) a partir dos triacilgliceróis. Esses AGLs, além de serem substratos para a β-oxidação e, portanto, importantes para geração de calor (via aumento da atividade da UCP1) na mitocôndria das células do TAM,

também aumentam a atividade de PGC1A (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*, codificado pelo gene *PPARGC1A*) e PPARG (COSTFORD, S.; GOWING, A.; HARPER, 2001; KALINOVICH et al., 2017; ROMAN et al., 2015; SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009) (**Figura 7**).

Figura 7- Ativação de adipócitos marrons via receptor ß3.

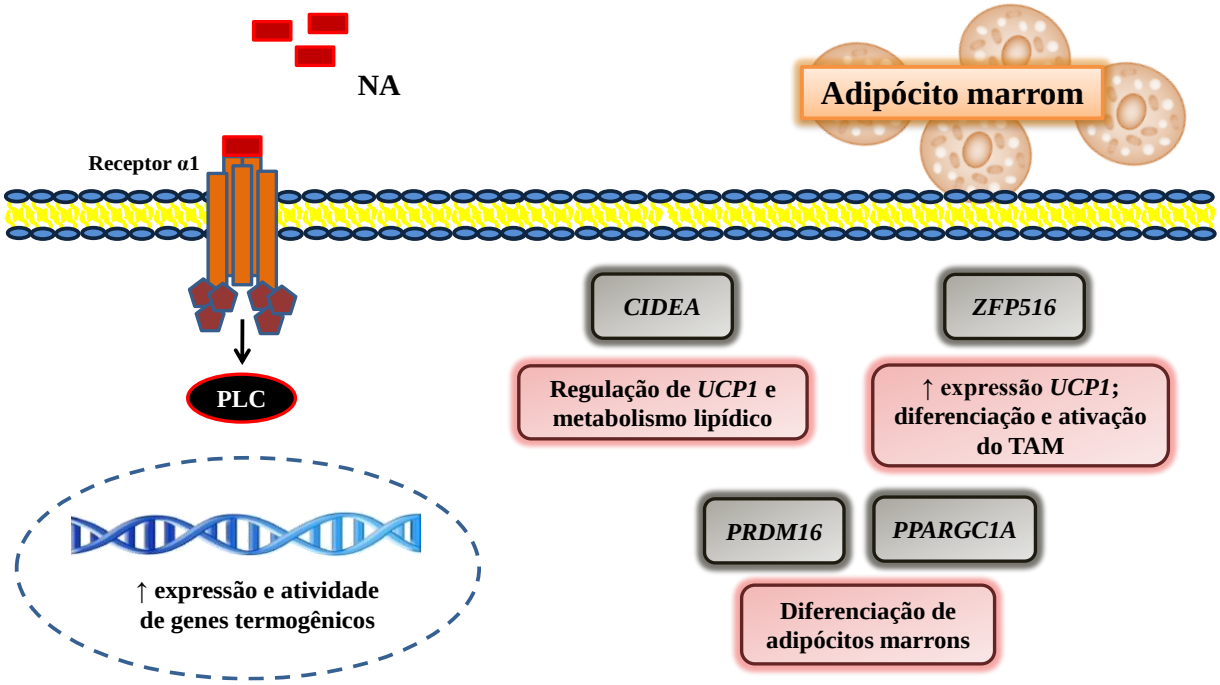


Mediado NA, que ao se ligar a receptores β3, acoplado à proteína Gs, ativa a adenilato ciclase (AC) que converte moléculas de ATP em AMPc e que induz seu aumento intracelular e ativa a proteína quinase A (PKA) que, por sua vez, fofosrila a lipase sensível à hormônio (LSH) ativando-a e a perilipina desativando-a, com intuito de estimular a via lipolítica. A LSH é responsável pela liberação de ácidos graxos livres (AGL) a partir dos triacilgliceróis que, além de estimularem fatores transcricionais, como o *PPARGC1A* e *PPARG*, serão direcionados para fosforilação oxidativa, na matriz mitocondrial à partir da atividade de UCP1 (Elaborado pelo próprio autor).

Já os receptores adrenérgicos do tipo α1, também encontram-se na membrana de adipócitos marrons, acoplados à proteína Gq e, quando estimulados, ativam a PLC que, em última instância, é responsável pela ativação do aumento da expressão dos genes típicos do TAM (CANNON; NEDERGAARD, 2004; MOHELL, 1984; SELL; DESHAIES; RICHARD, 2004), como *PPARGC1A* e *PRDM16 (PR domain containing 16)*, genes que codificam fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação de adipócitos marrons (SEALE et al., 2008); *ZFP516* (*zinc-finger protein 516*), cuja função principal é aumentar a ativação transcricional da UCP1, além de também promover diferenciação e ativação do TAM (SEALE, 2015) e *CIDEA* (*cell death activator)*, gene predominante expresso nas células de

gordura marrom, onde regula a atividade da UCP1 e do metabolismo lipídico (SEALE; KAJIMURA; SPIEGELMAN, 2009) (**Figura 8**).

Figura 8- Ativação de adipócitos marrons via receptor α1.



Mediado pela noradrenalina (NA), que ao se ligar a receptores α1 ativa a fosfolipase C (PLC) o que induz aumento na expressão e na atividade de genes termogênicos, tais como *CIDEA*, *ZFP516*, *PRDM16* e *PPARGC1A* (Elaborado pelo próprio autor).

Recentemente, evidências tanto em animais quanto em humanos, demonstraram que adipócitos brancos, de território subcutâneo, podem apresentar fenótipo e características funcionais de adipócitos marrons (BOSTRÖM et al., 2012). Estas células são denominadas de adipócitos beges (WU et al., 2012) e, assim como os adipócitos marrons, apresentam morfologia multilocular, são ricas em mitocôndrias, expressam UCP1 e regulam outras proteínas e fatores relacionados com a termogênese (KAJIMURA; SEALE; SPIEGELMAN, 2010). Esta transformação celular recebe o nome de *browning* ou escurecimento e ocorre, principalmente, em resposta ao frio e ao estímulo simpático.

Evidências mostram a importante influência da melatonina na fisiologia do TAM, principalmente, em relação ao aumento de sua atividade metabólica, o que parece ocorrer de maneira central ou periférica. A atividade do TAM parece ser centralmente regulada por neurônios de NSQ e do PVH, onde há receptores de melatonina MT1 e MT2 (TAN et al., 2011; WU et al., 2006) e perifericamente por ação em MT1 e MT2 de adipócitos marrons (AARSETH; NORDØY; STOKKAN, 2001; MÅRTENSSON; ANDERSSON; BERG, 1996).

No NSQ a melatonina é capaz de exacerbar o estímulo simpático, induzir o *turnover* de NA e de aumentar a expressão de genes para *UCP1*, *PPARG* e *PPARGC1A* (BAMSHAD; SONG; BARTNESS, 2017; BARTNESS; DEMAS; SONG, 2002).

Na mitocôndria de adipócitos marrons também parece haver interação da melatonina. O que se acredita é que, sua função antioxidante seja capaz de proteger essa organela de danos oxidativos e, consequentemente, otimizar a função termogênica mitocondrial do TAM (LÓPEZ et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância da melatonina para o metabolismo energético e seu papel na programação intrauterina e perinatal nesta regulação, o presente trabalho busca caracterizar a influência da ausência de melatonina materna, durante a gestação e lactação, em tecidos metabolicamente ativos e o impacto funcional dessas características no perfil metabólico da prole quando submetida a diferentes desafios ambientais.

Dentre esses desafios ambientais destaca-se a própria ausência materna de melatonina durante janelas importantes de desenvolvimento, bem como o excesso de gordura saturada na dieta, exposição ao frio e indução de privação alimentar prévia à coleta de tecidos.

Vale destacar que, a população atual vem sendo bastante caracterizada por um perfil alimentar inadequado, rotina/jornada de trabalho extenuante, exposição à iluminação noturna, maior risco para transtornos metabólicos muitas vezes associados a ineficiente homeostase do peso corporal e/ou comportamento alimentar que podem induzir anormalidades presentes ou futuras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a influência da ausência de melatonina materna, durante a gestação e lactação, em tecidos metabolicamente ativos e o impacto funcional dessas características no perfil metabólico dos descendentes submetidos a diferentes desafios ambientais.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o impacto da melatonina materna em aspectos relacionados ao desenvolvimento metabólico dos descendentes, sob desafios ambientais:

- Ganho de peso ao longo do tempo;
- Consumo alimentar (em gramas e em calorias);
- Sensibilidade à insulina e tolerância à glicose;
- Tecido hepático: metabolismo energético, presença e grau de esteatose;
- Tecido adiposo marrom interescapular: atividade termogênica;
- Tecido adiposo branco: metabolismo energético e inflamação;
- Regulação da temperatura corporal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Ratas Wistar foram mantidas em biotério sob as seguintes condições: a) temperatura controlada de, aproximadamente, 24ºC; b) ciclo claro/escuro (12/12h), com crepúsculos de 15 minutos; oferta plena de água e ração (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Após período de adaptação, as fêmeas foram distribuídas nos seguintes grupos experimentais: (1) fêmeas controles (CTL); (2) fêmeas pinealectomizadas (PINX); (3) fêmeas pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PINX + MEL). Após cirurgia, foram mantidos em gaiolas coletivas, entre 3 a 4 animais e, após 4 semanas do procedimento cirúrgico, foram separados para acasalamento. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e está registrado sob o número 86/2016 para uso de animais de experimentação sob responsabilidade do Professor Doutor José Cipolla Neto.

4.2 Pinealectomia

Para a realização da pinealectomia as fêmeas foram anestesiadas com ketamina (0,4g/kg) e xilazina (0,02g/kg) e o procedimento cirúrgico foi iniciado com a fixação da cabeça em suporte para cirurgia estereotáxica. A pinealectomia se realizou por meio da abertura mediana do escalpo, sagitalmente, com exposição da sutura lambdóide. Nesse local foi realizada uma trepanação da calota craniana seguida de uma perfuração circular do osso. A peça óssea foi retirada expondo-se a confluência venosa posterior. Com uma pinça cirúrgica, a glândula pineal, localizada imediatamente abaixo da superfície, foi retirada. Após breve hemostasia, o retalho ósseo foi recolocado e o escalpo suturado (HOFFMAN; REITER, 1965).

4.3 Reposição oral de melatonina

A reposição de melatonina foi realizada por via oral, iniciada imediatamente após a pinealectomia e mantida até o desmame de sua prole. As fêmeas receberam 1mg/kg de melatonina dissolvida em 0,0001% de etanol na água de beber. O bebedouro com a solução de melatonina foi disponibilizado imediatamente antes do início da fase de escuro até imediatamente após o início da fase de claro. Os demais grupos receberam, correspondentemente, água com 0,0001% de etanol. A concentração da solução foi corrigida diariamente levando-se em consideração o peso do animal e o volume ingerido na noite anterior.

4.4 Determinação da massa corporal

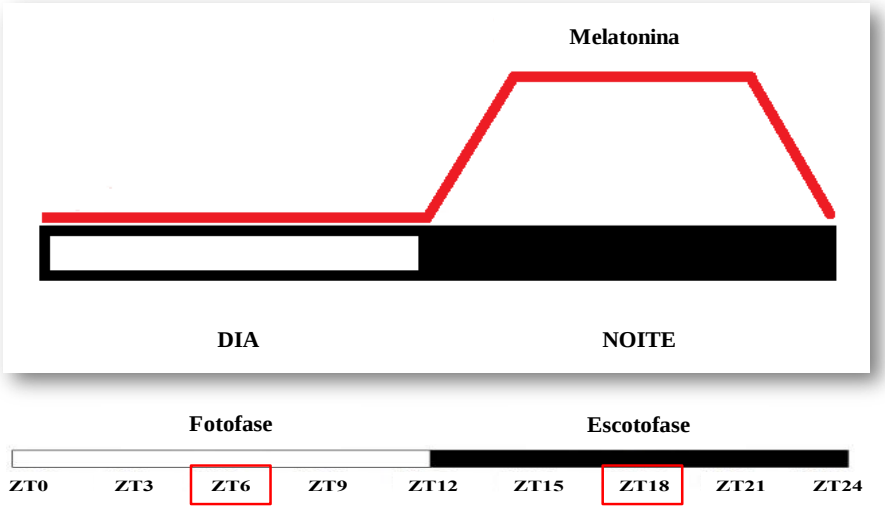
O peso corporal das fêmeas foi semanalmente monitorado, em balança digital, e utilizado para cálculo da dosagem de reposição de melatonina e para análise de evolução de ganho de peso.

4.5 Tratamento dos descendentes

Após nascimento, foram utilizados apenas descendentes machos para prosseguimento do trabalho. Para cada grupo de filhotes (C, filhotes de fêmeas CTL; P, filhotes de fêmeas PINX e PM, filhotes de fêmeas PINX+MEL), uma semana após desmame, parte foi alimentada com ração hiperlipídica- 60% (H) (**Quadro 1**) e parte alimentada com ração normolipídica (N) (**Quadro 2**) (Prag Soluções Biociências- Jaú-SP, Brasil), durante 12 semanas.

Para as análises considerou-se os *Zeitgebers Time* (ZTs) mencionados nos procedimentos a seguir. O ZT é uma padronização dos horários do ciclo circadiano (ciclo claro/escuro, de 12/12 h): por exemplo, o ZT 12 é o momento da transição do claro para o escuro (independentemente do horário em que o biotério apague ou acenda suas luzes), e o ZT 15 é correspondente às três primeiras horas após essa transição. Após tratamento da prole, a eutanásia ocorreu nos ZTs 6 (6 horas após o início da fase de claro) e 18 (6 horas após o início da fase de escuro) (**Figura 9**).

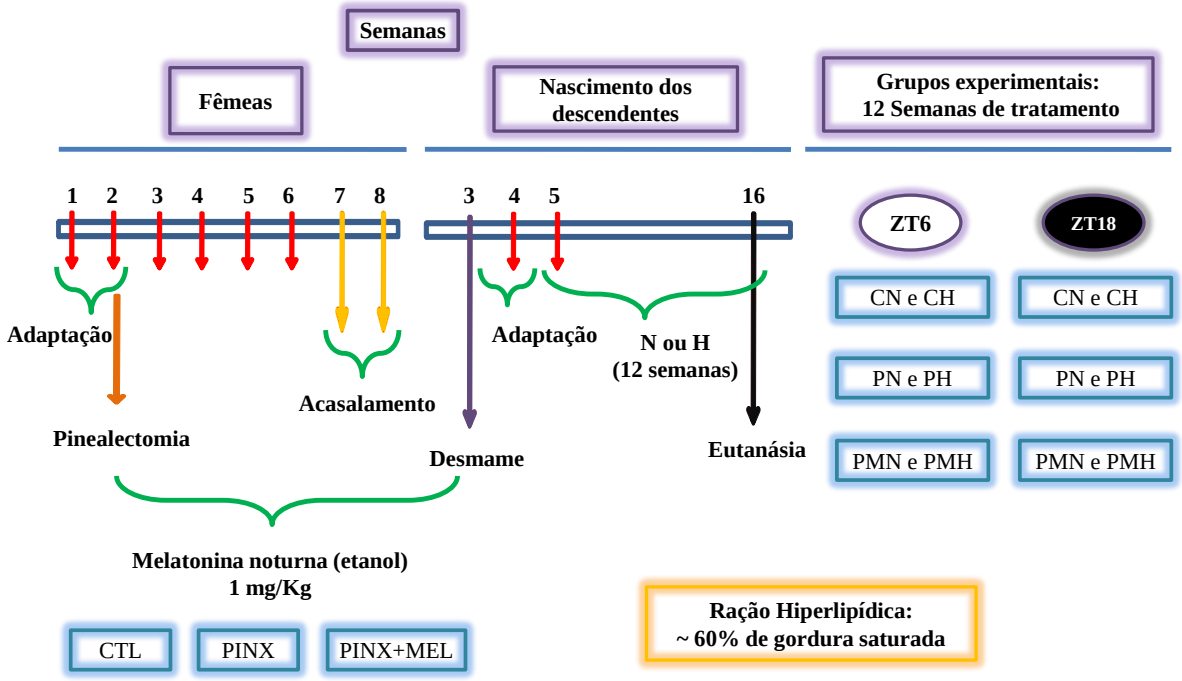
Figura 9- Representação circadiana dos ZTs ao longo das 24 horas e sua relação com o ciclo de claro e escuro.



No presente trabalho as análises foram e serão realizadas nos ZTs 6 e 18, na tentativa de observar principais diferenças entre os parâmetros na fotofase e na escotofase.

A razão da escolha desses dois pontos ao longo das 24 horas decorre da radical mudança no metabolismo entre o período de repouso e não alimentação (ZT 6), com predomínio da neoglicogênese hepática e reduzida sensibilidade à insulina fisiológica, e o período de atividade (ZT 18), com ingestão alimentar e metabolismo predominantemente glicolítico e de síntese de estoques de reserva metabólica e da elevada sensibilidade à insulina fisiológica. Na eutanásia, todos os tecidos de interesse foram imediatamente armazenados a -80 °C. As coletas foram realizadas sem restrição alimentar induzida, mimetizando e respeitando as características e demandas metabólicas dos animais. A figura a seguir (**Figura 10**) ilustra a organização temporal dos procedimentos desenvolvidos ao longo do presente trabalho.

Figura 10- Esquema de tratamento das fêmeas e de seus descendentes.



A pinealectomia das fêmeas originou os grupos CTL (sem intervenção cirúrgica); PINX (com pinealectomia) e PINX+MEL (com pinealectomia e reposição oral de melatonina). Os descendentes foram identificados como C (quando gerados pelas fêmeas CTL), P (quando gerados pelas fêmeas PINX) e PM (quando gerados pelas fêmeas PINX+MEL) e receberam a designação de acordo com o tipo de ração consumida ao longo das 12 semanas de tratamento: N, aos que receberam ração normolipídica (CN, PN e PMN) e H, aos que receberam ração hiperlipídica (CH, PH e PMH). A eutanásia foi realizada em ZT 6 e ZT 18, sem privação alimentar prévia a coleta de tecidos.

4.5.1 Determinação da massa corporal e consumo de ração

Os animais foram semanalmente pesados e o consumo diário de ração (da gaiola) também foi avaliado. Os valores obtidos dessa ingestão (diferença entre a quantidade de ração reposta e a sobra do dia seguinte) foram divididos pelo número de animais de cada gaiola. Para avaliar o grau de obesidade, foi utilizado o índice de Lee calculado pela raiz cúbica do

peso corporal do animal (g), dividido pelo comprimento naso-anal (cm), e multiplicado por 100 (PAPA et al., 2002).

4.5.2 Composição nutricional das rações do tratamento alimentar

A ração hiperlipídica é utilizada em modelos experimentais para induzir alterações metabólicas (EL-DEEN; HEEBA, 2019; NEBAIHI et al., 2019; SMALL et al., 2020) e possibilitar a investigação de mecanismos terapêuticos ou de controle desses eventos. Conforme descrito anteriormente, o desafio alimentar nos descendentes foi realizado por meio do tratamento com ração hiperlipídica, caracterizada pela presença de 51,9% de banha de porco e 6,65% de óleo de soja em sua composição (**Quadro 1**). Ao compararmos o conteúdo nutricional desta ração com a ração controle (normolipídica- **Quadro 2**) é possível e importante notar que, a principal diferença entre seus conteúdos nutricionais, está na distribuição de macronutrientes: carboidratos representados pelo amido de milho, amido dextrinizado e sacarose; proteínas representadas pela caseína e gorduras representadas pelo óleo de soja e banha de porco (conforme previamente mencionado). Neste sentido foram mantidos em ambas as rações igual distribuição de micronutrientes (mix de vitaminas e de minerais) o que minimiza influência de possível deficiência desses compostos na caracterização metabólica observada nesses animais.

Quadro 1- Composição nutricional da ração hiperlipídica.

Item	***Quantidade prescrita (%)***	***g/Kg***	***Kcal/Kg***	***% das Kcal***
Amido de milho	18,87	188,70	754,80	13,95
Caseína	14,00	140,00	560,00	10,35
Amido dextrinizado	10,00	100,00	400,00	7,39
Sacarose	12,00	120,00	480,00	8,87
Óleo de soja	4,00	40,00	360,00	6,65
Celulose microcristalina	5,00	50,00	0,00	0,00
Mix de minerais	3,50	35,00	0,00	0,00
Mix de vitaminas	1,00	10,00	40,00	1,04
L-cisteína	0,18	1,80	7,20	0,13
Bitartarato de colina	0,25	2,50	0,00	0,00
Banha de porco	31,20	312,00	2808,00	51,90
TOTAL	**100,00**	**1000,00**	**5410,00**	**100,00**

Fonte: Prag Soluções Biociências- Jaú-SP, Brasil, 2016.

Quadro 2- Composição nutricional da ração normolipídica.

Item	*Quantidade prescrita (%)*	*g/Kg*	*Kcal/Kg*	*% das Kcal*
Amido de milho	46,70	465,70	1862,80	48,38
Caseína	14,00	140,00	560,00	14,55
Amido dextrinizado	15,50	155,00	620,00	16,10
Sacarose	10,00	100,00	400,00	10,39
Óleo de soja	4,00	40,00	360,00	9,35
Celulose microcristalina	5,00	50,00	0,00	0,00
Mix de minerais	3,50	35,00	0,00	0,00
Mix de vitaminas	1,00	10,00	40,00	1,04
L-cisteína	0,18	1,80	7,20	0,19
Bitartarato de colina	0,25	2,50	0,00	0,00
TOTAL	**100,00**	**1000,00**	**3850,00**	**100,00**

Fonte: Prag Soluções Biociências- Jaú-SP, Brasil, 2016.

4.5.3 Obtenção de dados de temperatura superficial por meio de termografia

A avaliação da temperatura/termorregulação foi realizada por meio de termopares do tipo K acoplados em *datalogger* de quatro canais modelo RDXL4SD Omega®, *datalogger* de umidade relativa e temperatura modelo RHT10 Extech®, além da utilização de uma câmera termográfica com visor infravermelho (Flir System® - SC640). Esse experimento foi realizado nas dependências do biotério do Laboratório de Neurobiologia. As salas foram condicionadas em duas temperaturas diferentes, às quais os animais foram expostos: temperatura de base (24 ºC) e frio (18 ºC).

Os animais, nos diferentes tratamentos, foram aclimatados nas temperaturas de estudo e realizada duas rotinas de captura de imagens: a primeira captura se deu 30 minutos após a sala estar equilibrada na temperatura de avaliação, com recaptura das imagens após duas horas de exposição dos animais a essa condição. Essa repetição foi necessária para avaliar o tempo no qual os animais se aclimataram e, também, avaliar o efeito de estresse térmico nos quais foram expostos durante a experimentação.

Para a obtenção da emissão térmica superficial de diferentes regiões corpóreas dos animais analisados utilizou-se uma câmera infravermelha, modelo SC640 (Flir Systems). A temperatura média superficial das regiões de escolha foi obtida por meio de análise das termografias por rotinas específicas, no programa Thermacam 2.9 (Flir Systems), com

emissividade utilizada de 0,98. A temperatura média das diferentes porções corpóreas foi obtida por ferramentas de área e linhas, as quais ofereceram mais de 50 pontos de temperatura por porção observada. As regiões analisadas foram: região escapular (depósito de TAM); cauda (janela térmica de controle da temperatura corporal) e região inguinal (TAI) (depósito de adipócitos beges). Para análise estatística utilizou-se a relação entre a temperatura do TAM e da região inguinal e a temperatura ambiente, por meio da subtração dos valores, conforme demonstrado abaixo:

$$\Delta T \begin{cases} \text{Temperatura TAM} - \text{Temperatura do ambiente} \\ \text{Temperatura TAI} - \text{Temperatura do ambiente} \end{cases}$$

A temperatura da pele sobre o TAM também foi obtida por termopares, do tipo K acoplados em registradores de quatro canais, modelo RDXL4SD Omega®, os quais foram posicionados na porção do dorso localizada sobre o depósito interscapular do TAM e obtida por contato com a pele, entre os pelos. Ao mesmo tempo, durante os experimentos, foram utilizadas medidas de umidade relativa e ponto de orvalho (*datalogger* de umidade relativa e temperatura modelo RHT10 Extech®) com intuito de obter informações fundamentais para compreensão dos processos termodinâmicos existentes durante a termorregulação desses animais no ambiente em que estavam expostos, tendo em vista que a umidade relativa do ambiente pode auxiliar na evaporação de água e assim facilitar ou dificultar o fluxo de calor entre animal e ambiente.

4.5.4 Teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ITT)

Todos os testes metabólicos foram realizados no ZT 10 (duas horas antes do período de escuro), com os animais em privação alimentar de 10 h, uma semana antes da eutanásia. Para o GTT, a primeira coleta de sangue foi realizada por meio de um único corte na extremidade da cauda de cada animal (tempo 0). Após a injeção intraperitoneal de uma solução de glicose na proporção de 2 g/kg de peso corporal, amostras subsequentes de sangue foram coletadas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min. A aferição da glicemia foi realizada com o glicosímetro Optium Xceed® (Medisense®, Reino Unido) e as respectivas tiras reagentes (Optium Blood Glucose Test Strips, Medisense®, Reino Unido).

O ITT consistiu na injeção intraperitoneal de insulina (2 UI/Kg) e coleta de amostras

de sangue nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos para aferição da glicose plasmática. A taxa de decaimento de glicose (kITT) e a análise da curva de decaimento foram utilizadas para estimar a tolerância à insulina.

4.5.5 Coleta de tecidos

O tecido hepático, adiposo marrom e tecido adiposo branco perigonadal e retroperitoneal, foram coletados para análises de RNAm e conteúdo protéico, conforme mencionado a seguir. Amostras do tecido hepático e os tecidos adiposos brancos também foram coletados para análise histológica.

4.5.6 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Para análise de expressão gênica a extração de RNA foi realizada para cada tecido investigado no presente estudo. O protocolo de extração seguido baseou-se na lise por Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA): para cada 0,1 g de tecido adicionou-se 1 mL de trizol (para tecidos adiposos considerou-se 1 mL de Trizol® para cada 0,3 g de tecido). Procedeu-se a homogeneização em Polytron® (PT 1200 E) e o homogenato foi mantido a temperatura ambiente durante 5 minutos. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol® utilizado na etapa anterior; os tubos foram agitados até homogeneização e mantidos sob temperatura ambienta durante 10 minutos. Seguiu-se à etapa de centrifugação a 12.000 g, durante 15 minutos, a 4 ºC e a fase transparente foi transferida para novos tubos. Nesses novos tubos foram adicionados 500 µL de ácool isopropílico para cada 1 mL de trizol utilizado, agitar e deixar sob temperatura ambienta durante 10 minutos. Seguiu-se à etapa de centrifugação a 12.000 g, durante 15 minutos, a 4 ºC e soltar; soltar o pellet e lavá-lo com 1 mL de etanol a 75% (preparado com Água DEPC- dietilpirocarbonato) e centrifugar a 7.600 g, durante 5 minutos, a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o tubo mantido aberto para secagem do pellet. Foi adicionado de 100 a 200 µL de água miliQ ultrapura, a depender do tamanho do pellet e incubado em banho-maria, durante 10 minutos, a 60ºC.

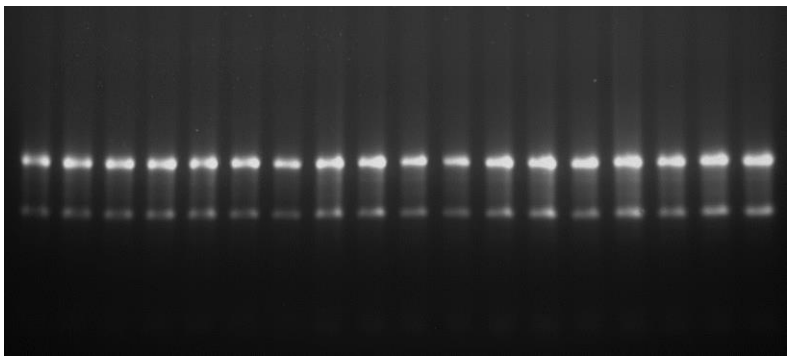
Para extração de tecidos adiposos, após as etapas de lise em Trizol® e incubação sob temperatura ambiente realizou-se uma centrifugação a 1.200 g, durante 10 minutos, a 4ºC para separar a fração de gordura. O intranadante foi retirado com auxílio de uma pipeta pasteur e procedeu-se o protocolo à partir da adição do clorofórmio. Na etapa final de adição de água miliQ ultrapura, para os tecidos adiposos considerou-se um volume inicial de 10 µL, a depender do tamanho do pellet. Para todos os tecidos investigados, o volume de água miliQ

ultrapura foi ajustado após leitura de RNA, realizada em NanoDrop 200 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA).

A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose a 2% e brometo de etídio. Adicionou-se às amostras, mantidas sob concentração de 1 µL, 2,5 µL de RNA Loading Dye 2x (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) para pipetagem no gel após polimerização. Procedeu-se a corrida a 100 V, durante, aproximadamente 45 minutos, e a captura de imagem foi realizada por meio do transiluminador (UVP Banchtop 3UV Transilluminators), sendo considerada a posição e integridade das bandas, conforme exemplo a seguir (**Figura 11**):

Após seleção das amostras realizou-se o cDNA a partir do protocolo descrito no kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho Quant Studio 6 Flex PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 50 ng de cDNA, adicionados à mistura para reação contendo 3 µL de Power SYBR® Green 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA); 1,52 µL de água miliQ ultrapura e 0,48 µL dos *primers* específicos para cada gene (**Tabela 1**, **2** e **3**).

Figura 11- Gel de agarose para verificação de integridade de RNA.



Para o <u>fígado</u> os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 50 °C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos; 2) 40 ciclos que incluem a desnaturação a 95 °C por 15 segundos, o anelamento dos *primers* e a extensão a 60 °C por 1 minuto; 3) 1 ciclo para análise do *melting* que consiste em 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de *melting*. Para o <u>TAM</u> e <u>TAB</u> considerou-se 50 ciclos para amplificação do RNAm sob as mesmas condições de tempo e temperatura descritas para o tecido hepático.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para calcular a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do controle endógeno. Essa relação é denominada Delta Ct (Δ Ct):

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Com objetivo de avaliar a variação de expressão entre os grupos foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct (Δ Δ Ct) que é calculado por meio do Delta Ct da média dos controles (grupo CN), através da seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}})$$

Os dados de Δ Δ Ct foram transformados em escala logarítmica (2^{-}(Δ Δ Ct) para comparar dados entre os grupos. A expressão foi interpretada pelo aumento ou diminuição após o tratamento. A seguir estão descritos nas tabelas os alvos de cada tecido avaliado neste projeto:

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão de RNAm em tecido hepático.

Alvo	Código de acesso	5' – 3' (Forward primer)	5' – 3' (Reverse primer)
RPL37A	NM_001205318.1	CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG	GCCACTGTTTTCATGCAGGAAC
SLC2A2	NM_012879.2	TCTTCACGGCTGTCTCTG	GCACAGAAAAACATGCCA
PCK1	NM_198780.3	CCACAGGATGAGGAACCG	TAATGGGACATTGGCTGGCA
SREBP1C	NM_001276707.1	ACGAGCTACCCTTCGGTGAG	AGCATGTCTTCGATGTCGGTCA
ACACA	NM_022193.1	GCTTATATTGTGGATGGCTT	TTCTACTGTCCCTTCTGGTTC
PPARG	NM_013124.3	TGACTTGGCCATATTTATAGCTGTCA	CGATGGGCTTCACGTTCAG
NR1H3	NM_031627.2	CAATGATGCTGAATTTGCTCT	CACTTGCTCTGAATGGACGCT
FASN	NM_017332.1	TGGTGAAGCCCAGAGGGATC	CACTTCCACACCCATGAGCG

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão de RNAm em tecido adiposo marrom interescapular.

Alvo	Código de acesso	5' – 3' (Forward primer)	5' – 3' (Reverse primer)
RPL37A	NM_001205318.1	CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG	GCCACTGTTTTCATGCAGGAAC
UCP1	NM_012682.2	GCCAAGACAGAAGGATTGCC	CAGCCGAGATCTTGCTTCCC
CIDEA	NM_001170467.1	TTCCTCGGCTGTCTCAATGT	GCCCGCATAAACCAGGAAC
PPARGC1A	NM_031347.1	CTTCCTCCATGCCTGACG	TGTAGCTGAGCTGAGTGTTGG
PKA	NM_001100922.1	AAGACGATCTGCGCCGC	CTCCCACTTACGGCGGATT
PPARG	NM_013124.3	TGACTTGGCCATATTTATAGCTGTCA	CGATGGGCTTCACGTTCAG
SLC2A4	NM_012751.1	GGAGCTGGTGTGGTCAATACCG	CCACCGTCATCAAGATGGCAC
PRDM16	XM_017593881.1	CCACACAGAAGAGCGTGAGTACAA	TGTGAACACCTTGACGCAGTTT
ZFP516	NM_001191695.1	CACCTTCGGGCACACACAG	CAGTGTGGTCTCTCCCTTGTTTAG

Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados para análise da expressão de RNAm em tecido adiposo branco.

Alvo	Código de acesso	5' – 3' (Forward primer)	5' – 3' (Reverse primer)
RPL37A	NM_001205318.1	CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG	GCCACTGTTTTCATGCAGGAAC
SLC2A4	NM_012751.1	GGAGCTGGTGTGGTCAATACCG	CCACCGTCATCAAGATGGCAC
TNFA	NM_012675.3	CTGTGCCTCAGCCTCTTCTC	ACTGATGAGAGGGAGCCCAT
IL1B	NM_031512.2	AAATGCCTCGTGCTGTCTGA	AGGCCACAGGGATTTTGTCG
IL6	NM_012589.2	AGAGACTTCCAGCCAGTTGC	AGTCTCCTCTCCGGACTTGT
IL10	NM_012854.2	CCTCTGGATACAGCTGCGAC	ATGGCCTTGTAGACACCTTTGT

4.5.7 Western blotting

Para análise de conteúdo proteico do tecido hepático realizou-se a extração de proteínas com o tampão de lise preparado com RIPA Buffer (Merck - Millipore, Massachusetts, EUA) diluído 10 x, inibidores de protease EDTA-free e PMSF (Roche, Mannheim, Alemanha) a 0,1 mol. Para cada 0,1 g de tecido utilizou-se 500 µL do tampão de lise e o mesmo foi homogeneizado em Polytron® (PT 1200 E). Seguiu-se, então, a centrifugação do homogenato a 12.000 rpm, durante 20 minutos, a 4ºC e o sobrenadante foi utilizado como fração proteica da amostra e foi quantificado utilizando-se o reagente Pierce (Merck - Millipore, Massachusetts, EUA) com amostras diluídas em 25 x e análise de curva de diluição de albumina. Após pipetagem das amostras e do reagente, incubou-se durante 30 minutos a 37ºC e a leitura se deu a 562 nm em leitor de microplacas (SynergyH1/ Biotec, Winooski, VT, EUA).

As amostras foram mantidas sob concentração de 30 µg e tratadas com tampão de Laemmli 4x (Bio-Rad®, Phyladelphia, PA, EUA), acrescido de DTT a 200 mM e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida cuja concentração foi dependente do tamanho da proteína de interesse. A transferência das proteínas separadas no gel foi realizada para uma membrana de nitrocelulose por meio de um aparelho semi-dry (Bio-Rad®, Phyladelphia, PA, EUA) por 7 minutos a 100 V; no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Após tranferências as membranas foram submetidas a três lavagens de 15 minutos com solução basal (Tris 10 mM, NaCl 150 mM) com Tween® (Merck - Millipore, Massachusetts, EUA) a 0,01%. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi reduzida pela sua incubação em solução bloqueadora de BSA 3% (Merck - Millipore, Massachusetts, EUA) em temperatura ambiente durante 1hora e 30 minutos sob agitação.

Estas membranas foram, então, incubadas com o anticorpo primário específico com concentração de 1:1.000, a 4ºC durante a noite e em seguida de 3 lavagens de 15 minutos com solução basal (Tris 10 mM, NaCl 150 mM) com Tween® a 0,01%. A incubação com anticorpo secundário específico, a uma concentração de 1:10.000, ocorreu sob temperatura ambiente, durante 1 hora e 30 minutos, sob agitação e proteção à luz. A intensidade das bandas nas membranas foi determinada por meio do scanner Odyssey (LiCor, Lincoln, NE, EUA) nos comprimentos de onda 700 nm e 800 nm e quantificada por ImageJ, normalizada por uma proteína constitutiva.

4.6 Análise de resultados

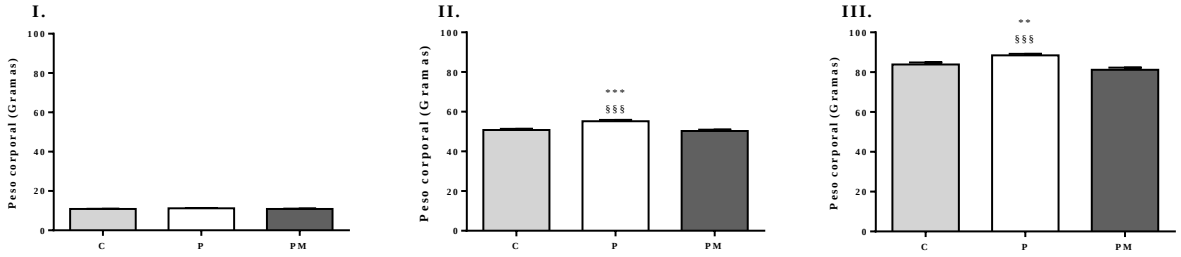
Os resultados foram apresentados como média ± EPM. Para comparação das médias entre os grupos, das curvas glicêmicas geradas a partir do GTT, foi calculada a área sob a curva à partir do ponto 0 e, para a curva glicêmica gerada a partir do ITT, foi calculado logaritmo neperiano [Y=Ln(Y)] dos dados e, posteriormente realizada a regressão linear dos valores obtidos. Para ambos os testes, bem como para os valores de expressão gênica, correlações antropométricas e parâmetros sorológicos as análises foram analisadas por meio do teste ANOVA de uma via seguida de *Student-Newman-Keuls* ou ANOVA de duas vias seguida de *Bonferroni* utilizando o software Graph Pad Prism, versão 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando o valor de *P* fosse menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Média de peso corporal antes do tratamento alimentar

Inicialmente a média de peso corporal da prole (**Figura 12**) foi realizada no 4º dia após o nascimento (**I.**), no desmame (**II.**) e no início da introdução alimentar (7 dias após o desmame) (**III.**). Pode-se observar que no 4º dia após o nascimento não houve diferença significante entre os grupos. Entretanto, no desmame, filhotes de PINX (P) foram mais pesados em relação aos de CTL (C) e aos de PINX-MEL (PM) ($P < 0{,}001$): a reposição de melatonina às mães preveniu esse aumento, uma vez que o peso corporal de seus filhotes machos se igualou ao de filhotes C. Na introdução alimentar, a diferença de peso corporal de filhotes P, se manteve como observada o desmame e, portanto, maior em relação aos grupos C e PM, mas com maior intensidade quando comparados aos animais PM ($P < 0{,}01$).

Figura 12- Média de peso corporal antes do tratamento alimentar.

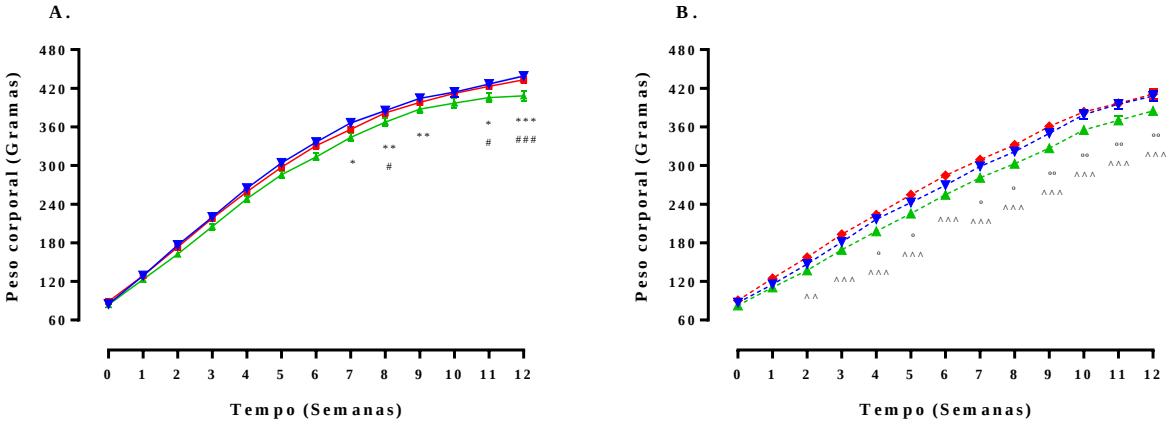


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student-Newman-Keuls*. **I.** Peso no 4º dia após o nascimento, n= 174 a 225 animais. **II.** Peso no desmame, n = 87 a 149 animais. *** $P < 0{,}001$ vs C; §§§ $P < 0{,}001$ vs PM. **III.** Peso inicial à introdução alimentar (7 dias após desmame), n = 96 a 122 animais. ** $P < 0{,}01$ vs C; §§§ $P < 0{,}001$ vs PM.

5.2 Evolução de peso corporal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar

Abaixo (**Figura 13**) está representada a evolução média de ganho de peso corporal, por grupo e ao longo das 12 semanas de tratamento em que os filhotes (C, P e PM) foram alimentados com ração normolipídica (**A.**) ou com ração hiperlipídica (**B.**). É possível observar que a partir da sétima semana de tratamento, animais PMN começam a ganhar menos peso ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) em relação aos demais grupos (CN e PN). Quando desafiados pela dieta hiperlipídica, esse padrão também ocorre e se manifesta de maneira mais precoce, à partir da segunda semana de tratamento ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$).

Figura 13- Evolução de peso corporal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar.

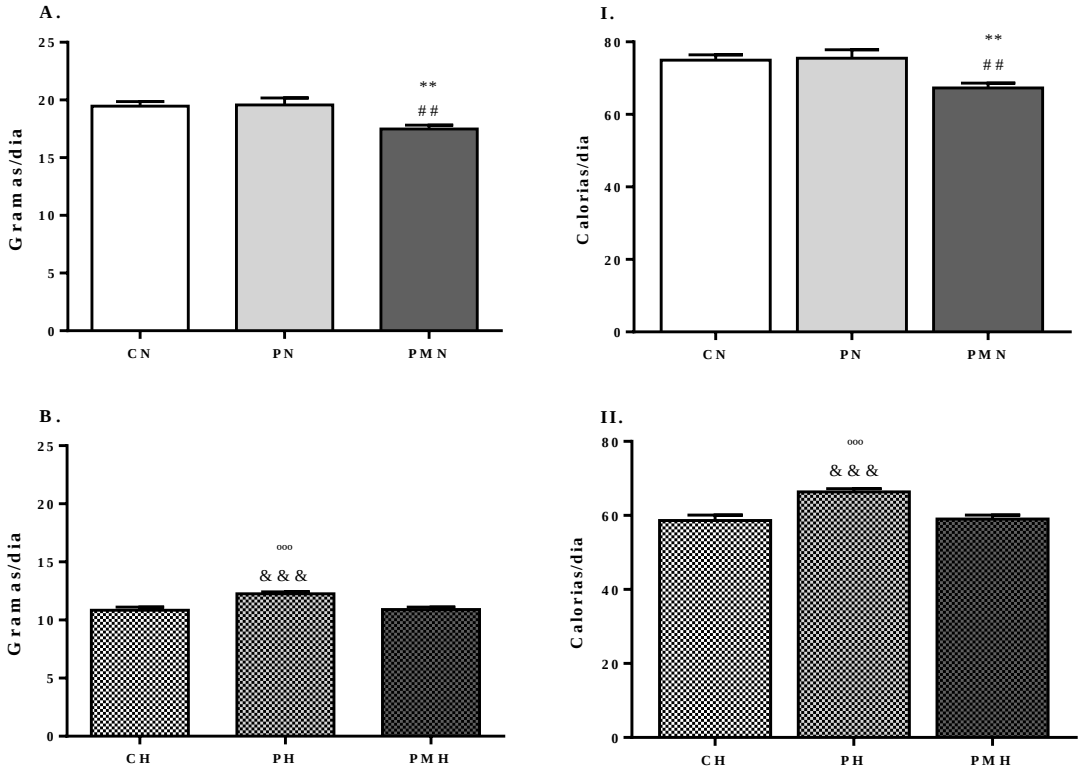


As análises foram realizadas com os filhotes machos de mães controles (C) representada pela cor azul, pinealectomizadas (P) representada pela cor vermelha e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) representada pela cor verde, alimentados com ração controle/normolipídica (**A.**) e hiperlipídica (**B**.). Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n = 35 a 56 animais.* $P < 0,05$ vs CN; ** $P < 0,01$ vs CN; *** $P < 0,001$ vs CN; # $P < 0,05$ vs PN; ### $P < 0,001$ vs PN; º $P < 0,05$ vs CH; º º $P < 0,01$ vs CH; º º º $P < 0,001$ vs CH; ^ ^ $P < 0,01$ vs PH; ^ ^ ^ $P < 0,001$ vs PH.

5.3 Média de consumo alimentar diário ao final de 4 semanas de tratamento alimentar

Conforme a figura abaixo (**Figura 14**), após 4 semanas de tratamento, dos filhotes alimentados com ração normolipídica, o grupo PMN apresentou menor consumo, tanto em gramas (**A.**) quanto em calorias (**I.**), em relação aos demais grupos (CN e PN) ($P < 0,01$). No desafio hiperlipídico, o grupo PH apresentou maior consumo, tanto em gramas (**B.**) quanto em calorias (**II.**), em relação ao grupo CH ($P < 0,001$) e o grupo PMH apresentou menor consumo em relação ao grupo PH equiparando-se ao CH ($P < 0,001$ para PH vs CH e PH vs PMH).

Figura 14- Média de consumo alimentar diário ao final de 4 semanas de tratamento alimentar.

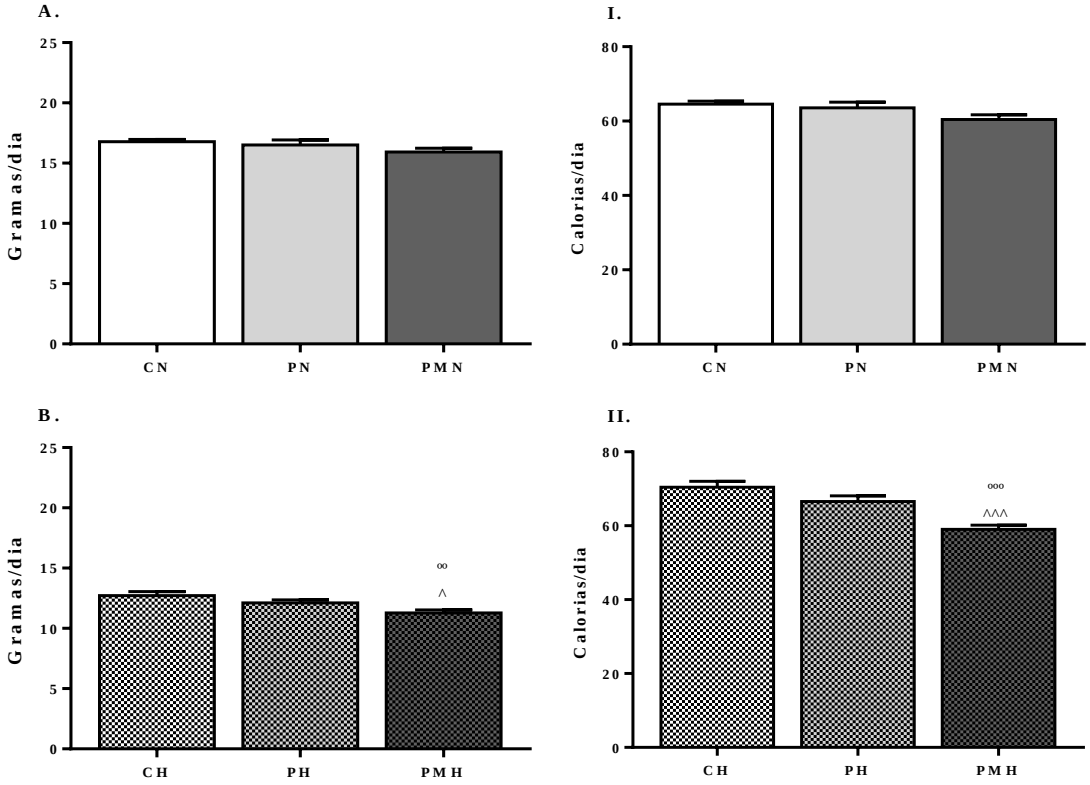


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **I.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **II.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls.* **A.** Consumo em gramas e **I.** Consumo em calorias, de animais alimentados com ração normolipídica, após 4 semanas de tratamento alimentar, n= 41 a 62 animais. ** $P < 0,01$ vs CN; ## $P < 0,01$ vs PN. **B.** Consumo em gramas e **II.** Consumo em calorias, de animais alimentados com ração hiperlipídica, após 4 semanas de tratamento alimentar, n = 40 a 58 animais. ooo $P < 0,001$ vs CH; &&& $P < 0,001$ vs PMH.

5.4 Média de consumo alimentar diário ao final de 12 semanas de tratamento alimentar

Conforme a figura abaixo (**Figura 15**), ao final de 12 semanas de tratamento, os três grupos de filhotes submetidos à dieta controle não apresentaram diferença de ingestão alimentar diária (**A.**) e calórica (**I.**) entre si. No entanto, dos grupos de filhotes alimentados com ração hiperlipídica, animais do grupo PMH apresentaram menor consumo alimentar, em gramas (**B.**) ($P < 0{,}01$ vs CH e $P < 0{,}05$ vs PH) e em calorias (**II.**) ($P < 0{,}001$ vs CH e PH).

Figura 15- Média de consumo alimentar diário ao final de 12 semanas de tratamento alimentar.

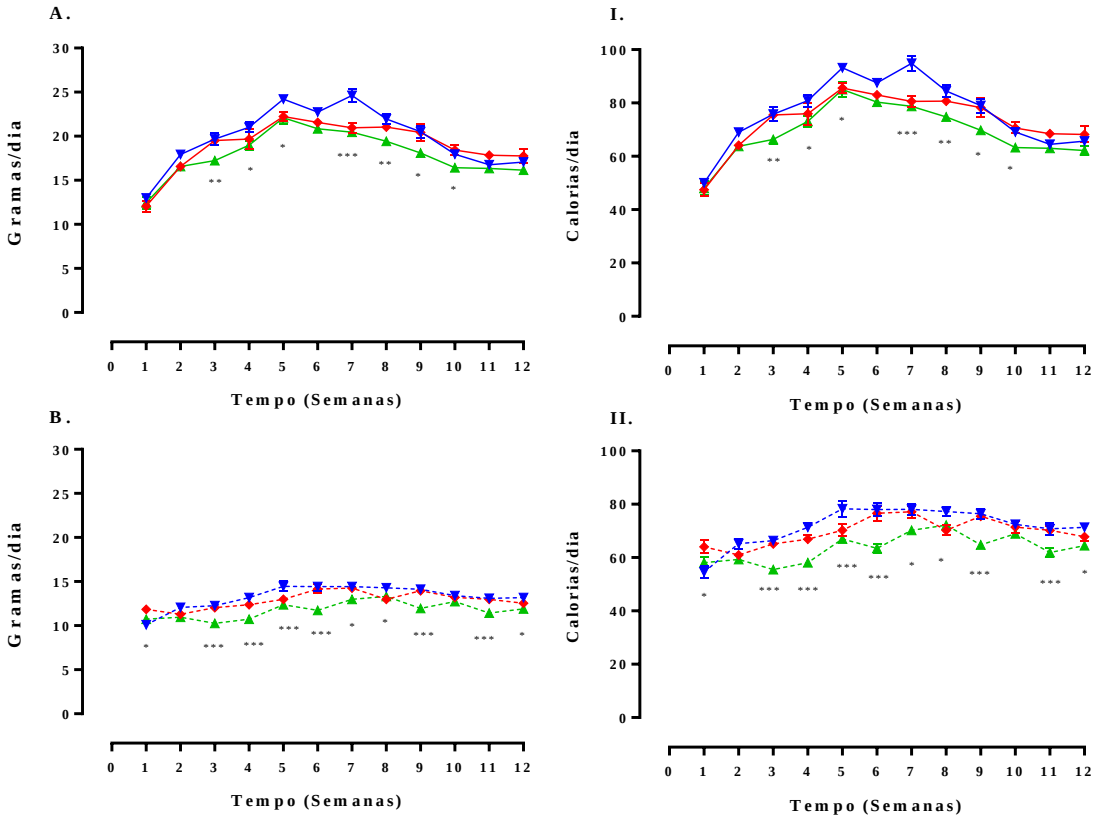


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) alimentados com ração controle/normolipídica (**A**. e **I.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **II.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls.* **A.** Consumo em gramas e **I.** Consumo em calorias, de animais alimentados com ração normolipídica, após 12 semanas de tratamento alimentar, n= 46 a 54 animais. **B.** Consumo em gramas e **II.** Consumo em calorias, de animais alimentados com ração hiperlipídica, após 12 semanas de tratamento alimentar, n = 40 a 60 animais. ^{oo} $P < 0{,}01$ vs CH; ^ $P < 0{,}05$ vs PH; ^{ooo} $P < 0{,}001$ vs CH; ^^^ $P < 0{,}001$ vs PH.

5.5 Evolução de consumo alimentar semanal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar

Nos gráficos a seguir (**Figura 16**) é possível observar a média de consumo alimentar em gramas, dos animais alimentados com ração normolipídica (**A.**) e hiperlipídica (**B.**), bem como o consumo em calorias referente aos mesmos grupos experimentais (**I.** e **II.** respectivamente). De modo geral e independente do tratamento alimentar, o grupo PM (PMN e PMH) apresentou menor consumo em relação aos animais C e P ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$).

Figura 16- Evolução de consumo alimentar semanal ao longo das 12 semanas de tratamento alimentar.



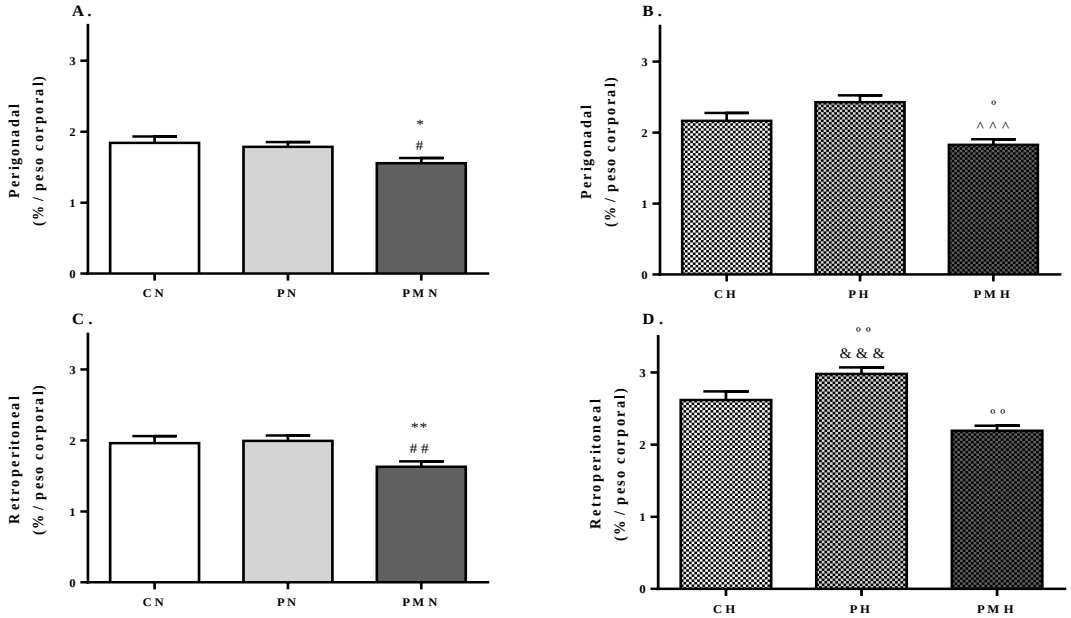
As análises foram realizadas com os filhotes machos de mães controles (C) representada pela cor azul, pinealectomizadas (P) representada pela cor vermelha e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) representada pela cor verde, alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **I.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **II.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni*, n = 11 a 31 animais. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. CN vs PN e PMN; PN vs PMN; CH vs PH e PMH; PH vs PMH.

5.6 Análises em tecidos adiposos

5.6.1 Conteúdo de tecidos adiposos brancos relativo ao peso corporal

Conforme demonstrado a seguir (**Figura 17**) os grupos PMN e PMH apresentaram menor conteúdo de tecidos adiposos brancos relativo ao peso corporal total, quando comparados ao conteúdo dos demais grupos em região perigonadal (**A.** e **B.**) ($P < 0,05$ para PMN vs CN e PN; $P < 0,05$ para PMH vs CH e $P < 0,001$ para PMH vs PH) e retroperitoneal (**C.** e **D.**) ($P < 0,01$ para PMN vs CN e PN; $P < 0,01$ para PMH vs CH). No desafio hiperlipídico o grupo PH apresentou maior conteúdo de tecido retroperitoneal relativo ao peso corporal quando comparado aos grupos CH ($P < 0,01$) e PMH ($P < 0,001$).

Figura 17- Conteúdo de tecidos adiposos brancos relativo ao peso corporal.

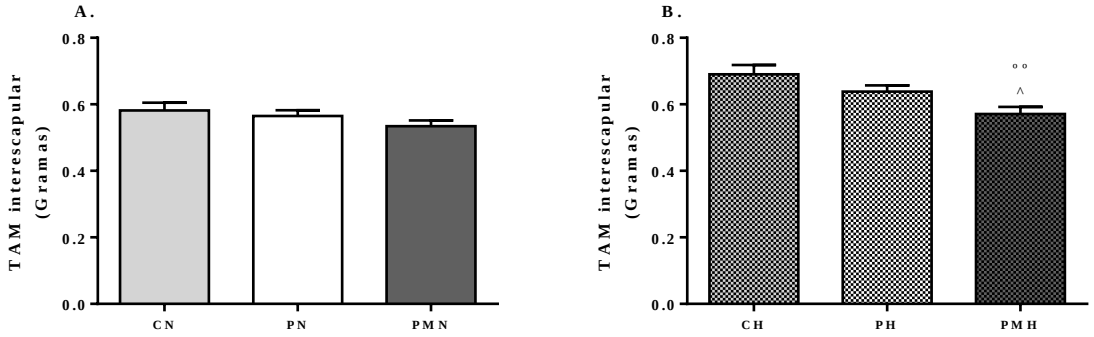


Média de peso total de tecido adiposo branco perigonadal e retroperitoneal relativo ao peso corporal da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar. As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)**. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 31 a 56 animais. * $P < 0,05$ vs CN; ** $P < 0,01$ vs CN; # $P < 0,05$ vs PN; ## $P < 0,01$ vs PN; º $P < 0,05$ vs CH; º º $P < 0,01$ vs CH; ^^^ $P < 0,001$ vs PH.

5.6.2 Conteúdo de tecidos adiposos marrom interescapular relativo ao peso corporal

A seguir a **Figura 18** demonstra que o grupo PM apresentou menor conteúdo de tecido adiposo marrom interescapular, relativo ao peso corporal total quando submetido ao desafio hiperlipídico (**B.**) ($P < 0,05$ vs PH; $P < 0,01$ vs CH).

Figura 18- Conteúdo de tecido adiposo marrom interescapular relativo ao peso corporal.



Média de peso total de tecido adiposo marrom interescapular relativo ao peso corporal da prole após 12 semanas de tratamento alimentar. As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 36 a 53 animais. º º $P < 0,05$ vs CH; ^ vs PH.

5.7 Correlações antropométricas

A seguir (**Tabela 4**) estão descritas algumas correlações com parâmetros antropométricos durante o tratamento alimentar. É possível notar que, o grupo PMN apresentou maior comprimento naso-anal após 12 semanas de tratamento alimentar, quando comparado ao grupo PN ($P < 0,01$).

Na análise do índice de Lee, é possível identificar que, após 4 semanas de tratamento alimentar, animais PN apresentaram aumento desse parâmetro em relação ao grupo PMN ($P < 0,05$) e, quando submetidos ao desafio hiperlipídico filhotes de mães PINX mostram aumento tanto em relação ao grupo PMH ($P < 0,05$) quanto em relação ao grupo CH ($P < 0,01$). Após 12 semanas de tratamento alimentar, diferenças significantes no índice de Lee foram detectadas apenas nos grupos desafiados pela ração hiperlipídica, mas nascidos de mães PINX-MEL ($P < 0,001$ PMH vs CH e PH).

Tabela 4- Correlações antropométricas.

	Parâmetros	**A. Tratamento normolipídico**			**B. Tratamento hiperlipídico**		
		CN	**PN**	**PMN**	**CH**	**PH**	**PMH**
4 semanas de tratamento alimentar	**Comprimento naso-anal (cm)**	7,93±0,2296 n=7	8,42±0,08333 n=6	8,00±0,09535 n=11	7,88±0,1333 n=15	7,93±0,07143 n=7	7,69±0,07739 n=16
	Índice de Lee (g/cm)	76,70±1,291 n=7	79,16±0,7585§§ n=6	73,85±0,9653 n=11	74,05±0,7040 n=10	78,24±1,027ºº& n=7	75,41±0,6918º^ n=15
12 semanas de tratamento alimentar	**Comprimento naso-anal (cm)**	10,17±0,1054 n=6	9,93±0,07143 n=7	10,30±0,1106# n=10	10,00±0,0000 n=8	10,07±0,1304 n=7	10,33±0,1667 n=6
	Índice de Lee (g/cm)	74,15±0,9920 n=6	73,48±0,8080 n=7	72,08±0,5236 n=10	73,86±0,7040 n=7	71,91±1,027º n=6	66,61±0,6918ººº^^^ n=6

As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) alimentados com ração controle/normolipídica (**A.**) ou com ração hiperlipídica (**B.**) após 4 e 12 semanas de tratamento alimentar.Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls.* # $P < 0,05$ vs PN; §§ $P < 0,01$ vs PNM; º $P < 0,05$ vs CH; ºº $P < 0,01$ CH; ººº $P < 0,001$vs CH; ^ $P < 0,05$ vs PH; ^^^ $P < 0,001$ PH; & $P < 0,05$ vs PMH.

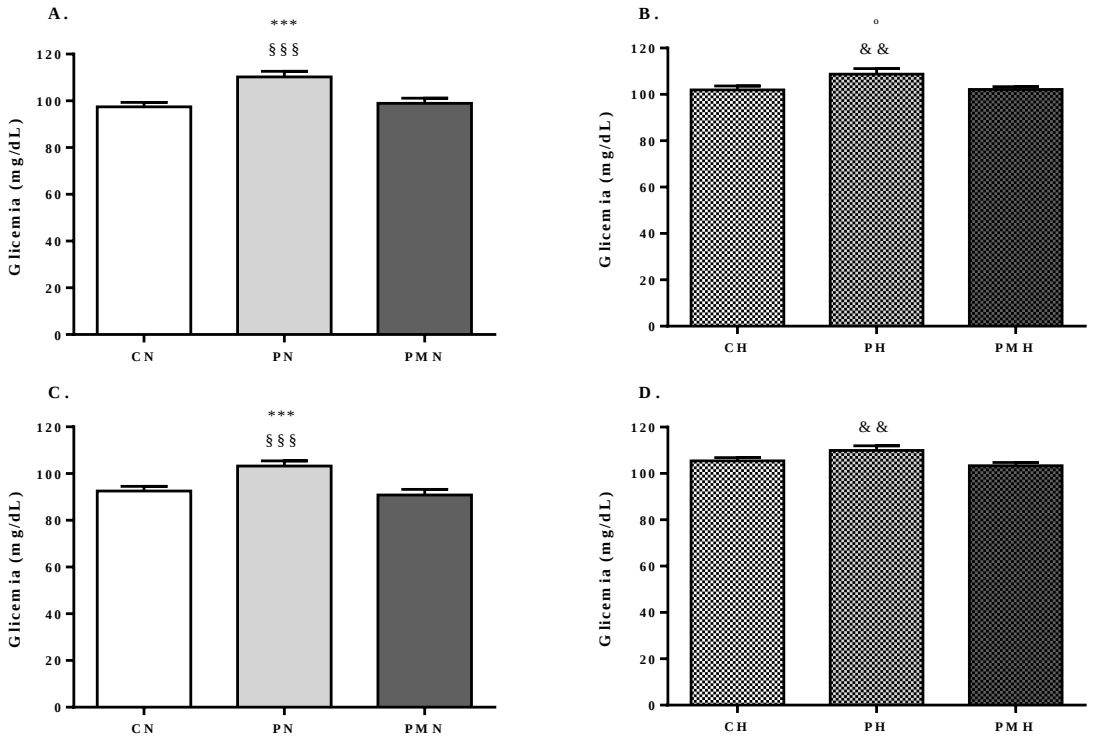
5.8 Homeostase glicêmica

5.8.1 Glicemia após privação alimentar no ZT 10

Independentemente do tipo de ração consumida e do tempo analisado, animais P apresentaram maior glicemia após privação alimentar de 10 horas, em ZT 10. A seguir (**Figura 19**) podemos observar as seguintes evidências estatísticas: após 4 semanas de tratamento alimentar animais PN (**A.**) apresentaram maior glicemia em relação aos animais dos grupos CN e PMN ($P < 0{,}001$) e, ainda nesse tempo de tratamento e sob desafio hiperlipídico (**B.**) o grupo P manteve essa característica ($P < 0{,}05$ vs CH e $P < 0{,}01$ vs PMH).

Após 12 semanas de tratamento alimentar, animais submetidos a ração normolipídica (**C.**) apresentaram o mesmo perfil glicêmico descrito no tratamento normolipídico ($P < 0{,}001$ para PN vs CN e PMN) e o grupo PH (**D.**) manteve sua diferença significante em relação aos animais PMH ($P < 0{,}01$).

Figura 19- Glicemia após privação alimentar em ZT 10.

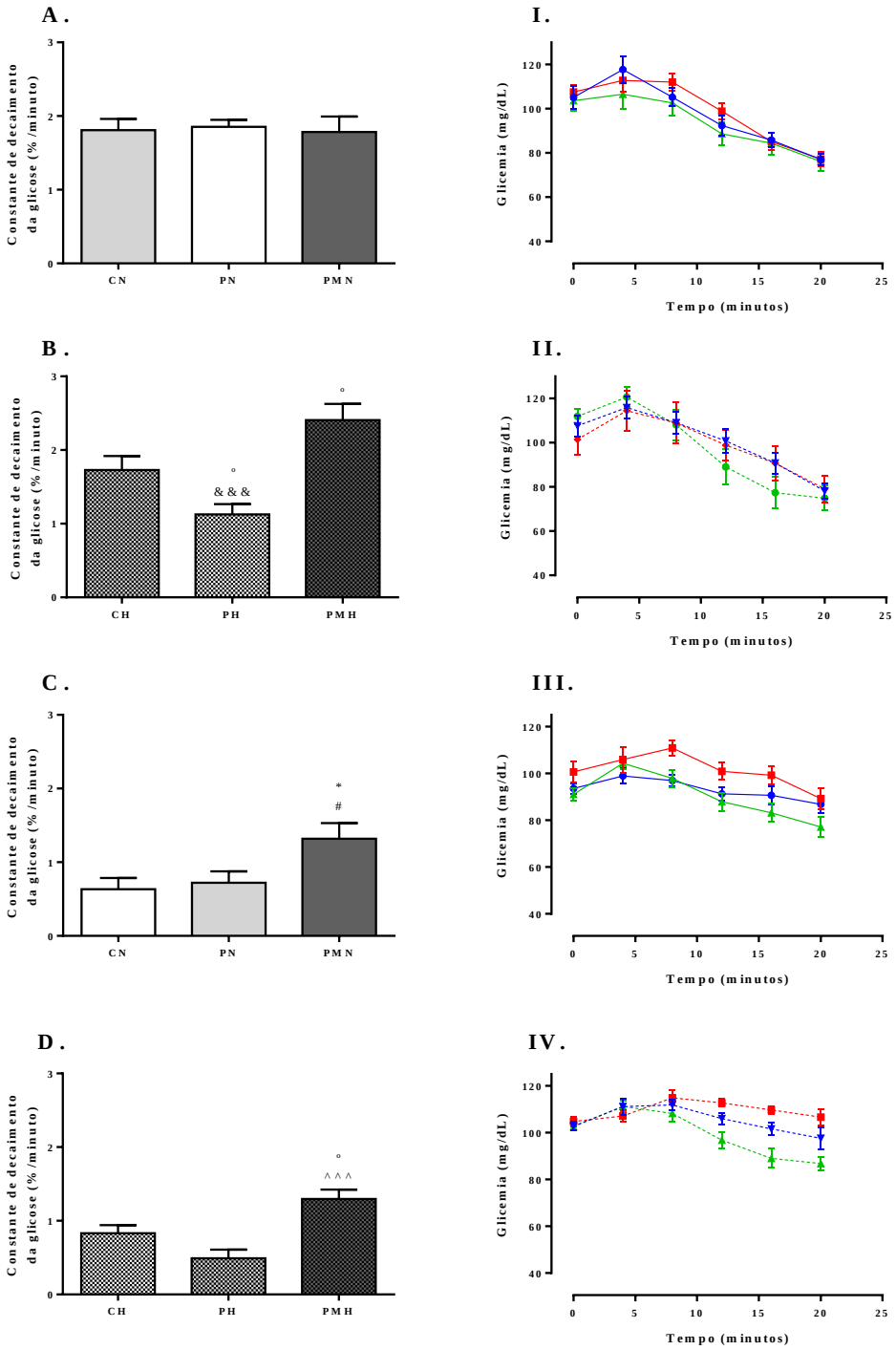


As análises foram realizadas no ZT 10 com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.**), por 4 e 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 11 a 23 animais. *** $P < 0{,}001$ vs CN; §§§ $P < 0{,}001$ vs PMN; º $P < 0{,}05$ vs CH; && $P < 0{,}01$ vs PMH.

5.8.2 Sensibilidade à insulina

A sensibilidade à insulina foi avaliada por meio do teste de tolerância à insulina, após 4 e 12 semanas de tratamento alimentar, no ZT 10. É possível observar a seguir (**Figura 20**) que, de modo geral, animais PM mantiveram maior sensibilidade à insulina ao longo do tempo e independente do tipo de ração consumida. Após 4 semanas de tratamento, não houve diferença significante deste parâmetro em nenhum dos grupos alimentados com ração normolipídica (**A.** e **I.**), entretanto, sob desafio hiperlipídico, o grupo P apresentou menor sensibilidade em relação aos grupos CH ($P < 0,05$) e PMH ($P < 0,001$) (**B.** e **II.**). Após 12 semanas de tratamento, o grupo PM (tratamento normolipídico em **C.** e **III.**; tratamento hiperlipídico em **D.** e **IV.**) manteve o perfil de maior sensibilidade à insulina em relação aos demais grupos, sob mesmo tratamento alimentar (PMN vs CN, $P < 0,05$; PMN vs PN, $P < 0,05$; PMH vs CH, $P < 0,05$; PMH vs PH, $P < 0,001$).

Figura 20- Constante de decaimento de glicose.

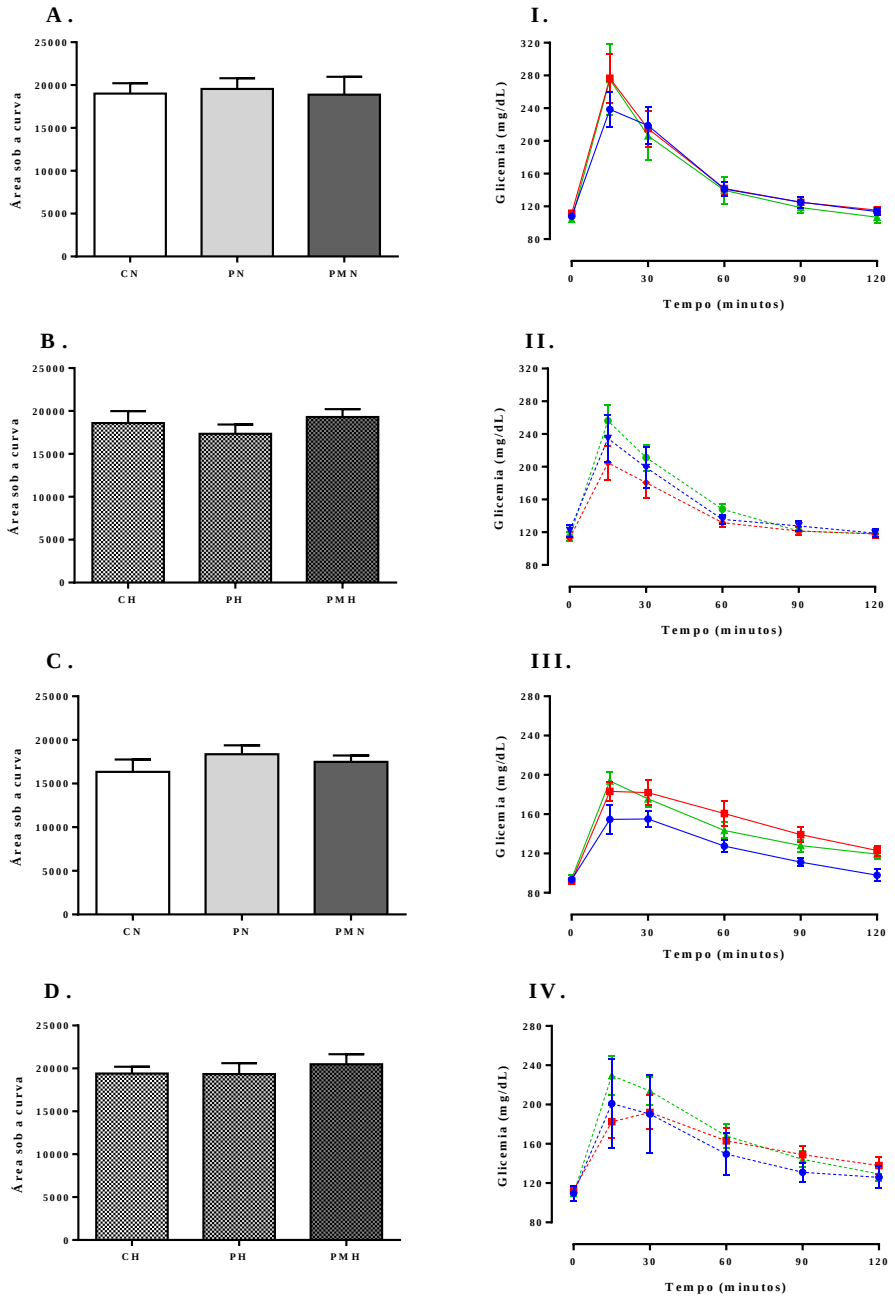


As análises foram realizadas no ZT 10 com filhotes machos de mães controles (C) representados pela cor azul, pinealectomizadas (P) representados pela cor vermelha e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) representados pela cor verde alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.**), após 4 (**A.** e **B.**) e 12 (**C**. e **D.**) semanas de tratamento alimentar. Na figura estão ilustradas as curvas de glicemia referentes às constantes de decaimento (**I.** para **A.**; **II.** para **B.**; **III.** para **C**. e **IV.** para **D.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student-Newman-Keuls* e n= 8 a 16 animais. * $P < 0,05$ vs CN; # $P < 0,05$ vs PN; º $P < 0,05$ vs CH; º º $P < 0,01$ vs CH; ^^^ $P < 0,001$ vs PH; &&& $P < 0,001$ vs PMH.

5.8.3 Tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose também foi realizado, em ZT 10, com intuito de avaliar a homeostase glicêmica. Conforme demonstrado abaixo (**Figura 21**) não houve diferença significante entre os grupos nos períodos de tratamento avaliados.

Figura 21- Tolerância à glicose.



As análises foram realizadas no ZT 10 com filhotes machos de mães controles (C) representados pela cor azul, pinealectomizadas (P) representados pela cor vermelha e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) representados pela cor verde alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.**), após 4 (**A.** e **B.**) e 12 (**C**. e **D.**) semanas de tratamento alimentar. Na figura estão ilustradas as curvas de glicemia referentes aos gráficos de área sob a curva (**I.** para **A.**; **II.** para **B.**; **III.** para **C**. e **IV.** para **D.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student-Newman-Keuls* e n= 9 a 17 animais.

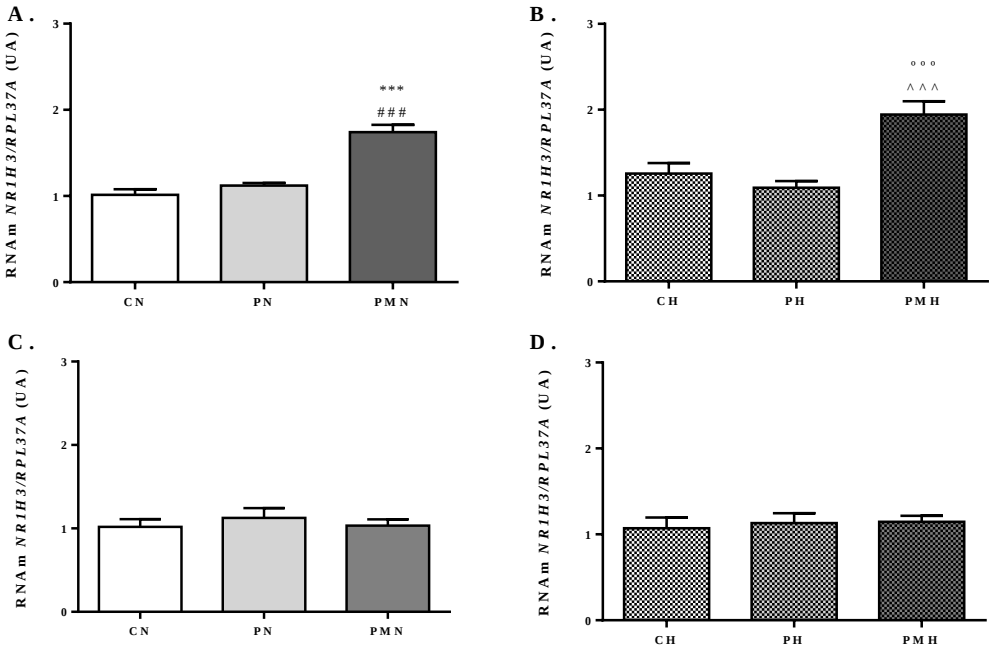
5.9 Análises de expressão gênica em tecido hepático

A seguir serão demonstrados os gráficos de expressão gênica hepática no meio do período de repouso (ZT 6, quando há predomínio da gliconeogênese e glicogenólise) e no meio do período de atividade (ZT 18, quando há predomínio da glicólise e glicogênese).

5.9.1 Expressão de RNAm para o gene NR1H3

A figura a seguir (**Figura 22**) ilustra a expressão de *NR1H3* em tecido hepático no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *NR1H3* codifica o fator transcricional LXR, que interage com regiões promotoras de genes lipogênicos, modulando-as. Conforme demonstrado, no ZT 6, independentemente do tipo de tratamento alimentar, esse mRNA esteve positivamente regulado nos filhotes PM quando comparados aos filhotes C e P ($P < 0,001$). Entretanto, no ZT 18 não foi possível observar diferença significante entre os grupos, em nenhum dos tratamentos alimentares.

Figura 22- Expressão de RNAm para o gene *NR1H3* em tecido hepático.

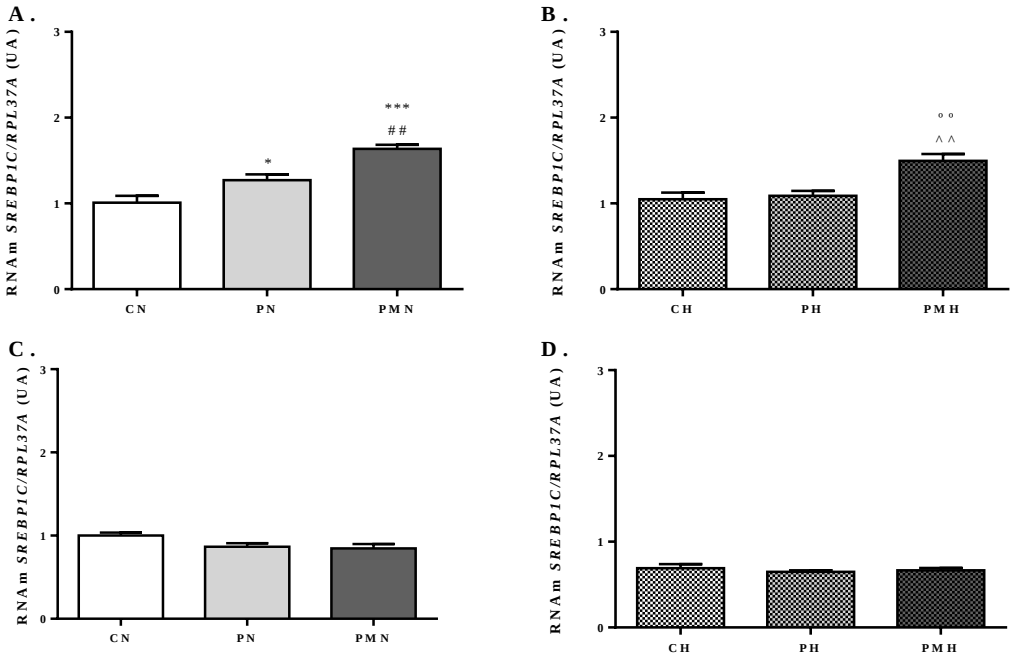


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM) alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.**), por 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 5 a 8 animais. *** $P < 0,001$ vs CN; ### $P < 0,001$ vs PN; º º º $P < 0,001$ vs CH; &&& $P < 0,001$ vs PMH.

5.9.2 Expressão de RNAm para o gene SREBP1C

Na figura a seguir (**Figura 23**) demonstra-se a expressão do gene *SREBP1C* em tecido hepático no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. *SREBP1C* pode ser regulado pelo fator transcricional *NR1H3* e ativar enzimas-chave da lipogênese e, portanto, estimular síntese de lipídeos. É possível observar, no ZT 6, aumento significante na expressão do RNAm no grupo PN em relação ao grupo CN ($P < 0,05$) e nos grupos PMN ($P < 0,001$ vs CN e $P < 0,01$ vs PN) e PMH ($P < 0,01$ vs CH e PH). Entretanto, no ZT 18 não foi possível detectar diferença significante entre os grupos, em nenhum dos tratamentos alimentares.

Figura 23- Expressão de RNAm para o gene *SREBP1C* em tecido hepático.

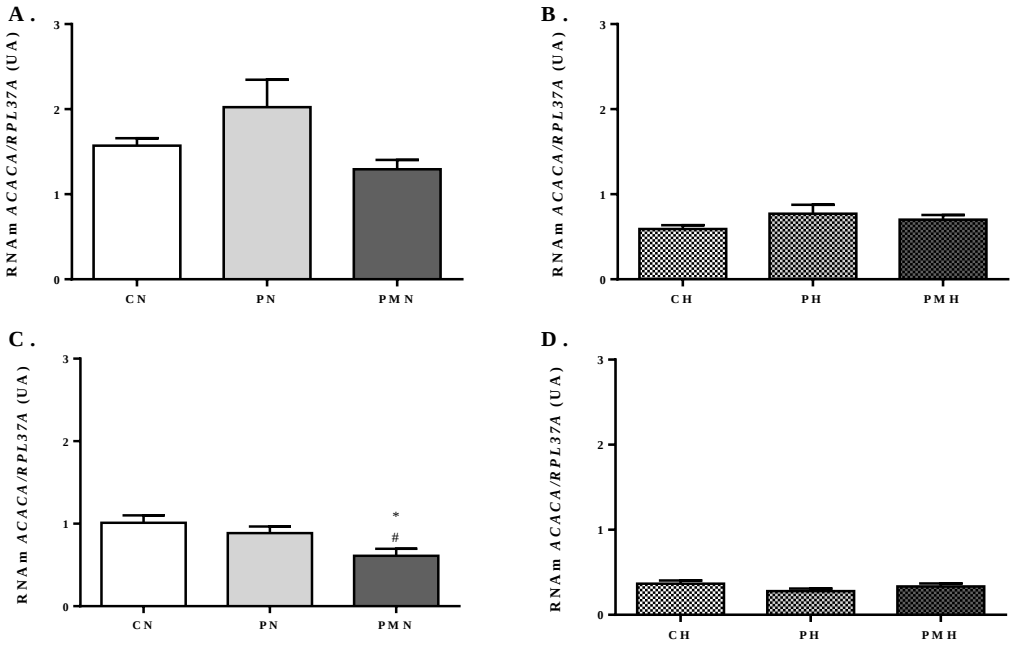


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** por 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 6 animais. * $P < 0,05$ vs CN; *** $P < 0,001$ vs CN; ## $P < 0,01$ vs PN; º º $P < 0,01$ vs CH; ^^ $P < 0,01$ vs PH.

5.9.3 Expressão de RNAm para o gene ACACA

A figura a seguir (**Figura 24**) ilustra a expressão do gene *ACACA* em tecido hepático no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *ACACA* codifica a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), que pode ser ativada por SREBPs e é considerada uma das enzimas-chave da lipogênese. No ZT 6, não foi possível observar diferença significante entre os grupos, nos diferentes tratamentos alimentares utilizados. No ZT 18, animais PMN apresentaram menor expressão do RNAm quando comparada à expressão em animais CN e PN ($P < 0,05$).

Figura 24- Expressão de RNAm para o gene *ACACA* em tecido hepático.

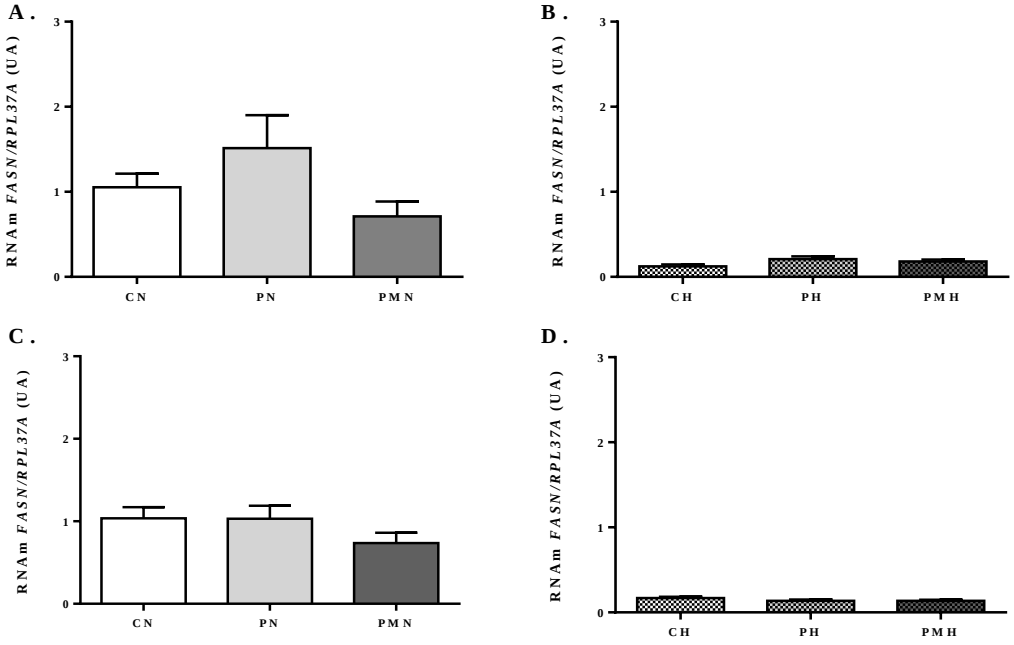


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 8 animais. * $P < 0,05$ vs CN; # $P < 0,05$ vs PN.

5.9.4 Expressão de RNAm para o gene FASN

Conforme demonstrado a seguir (**Figura 25**) não foi possível observar diferença significante na expressão de RNAm para *FASN* em tecido hepático, tanto no ZT 6 (**A.** e **B.**) quanto no ZT 18 (**C.** e **D.**), após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *FASN* codifica a enzima ácido graxo sintase (FAS) também considerada enzima-chave da lipogênese e que pode ser ativada por SREBPs.

Figura 25- Expressão de RNAm para o gene *FASN* em tecido hepático.

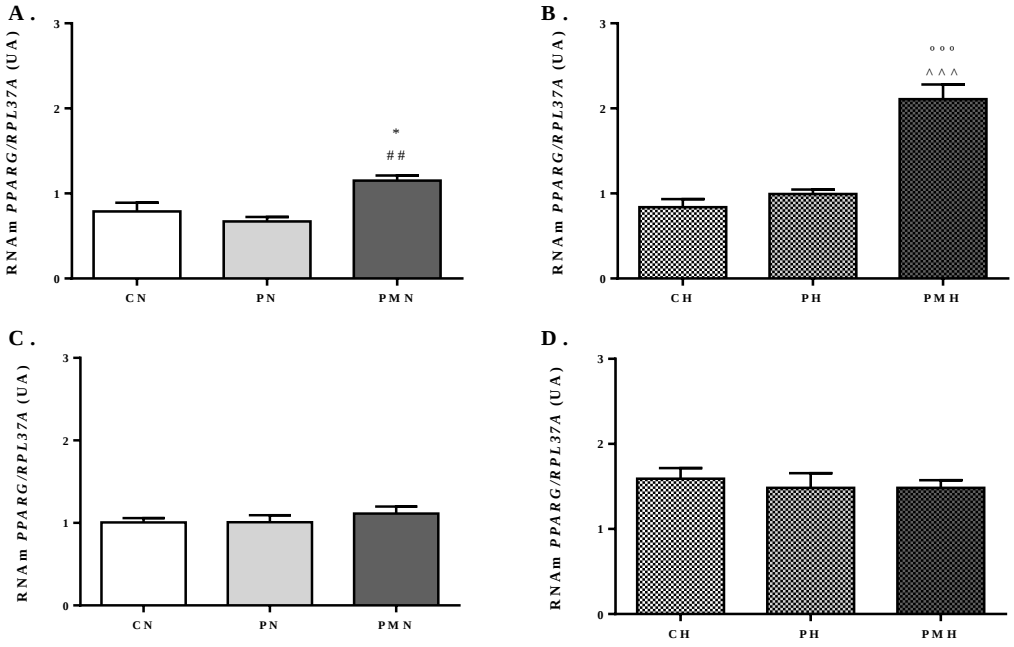


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 5 a 8 animais.

5.9.5 Expressão de RNAm para o gene PPARG

Na figura a seguir (**Figura 26**) é possível notar a expressão de *PPARG* em tecido hepático no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *PPARG* é capaz de modular a expressão de genes associados ao metabolismo lipídica e de lipoproteínas. No ZT 6, independentemente do tipo de ração consumida, filhotes PM apresentaram maior expressão do RNAm para *PPARG* quando comparados aos filhotes C e P (no tratamento normolipídico $P < 0,05$ para PMN vs CN e $P < 0,01$ para PMN vs PN e no tratamento hiperlipídico $P < 0,001$ para PMH vs CH e PH).

Figura 26- Expressão de RNAm para o gene *PPARG* em tecido hepático.

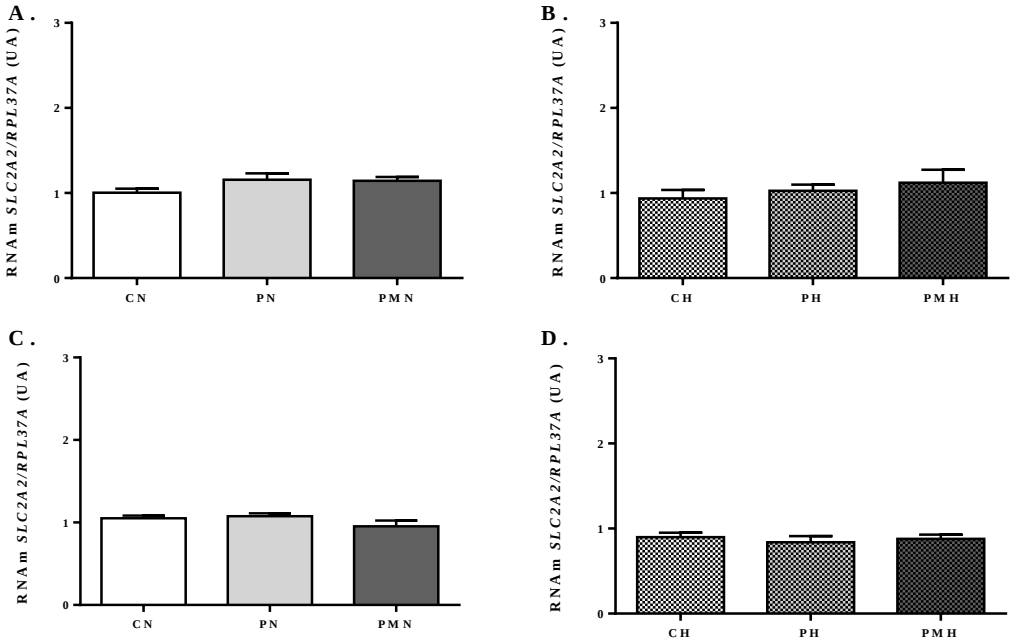


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 7 animais. * $P < 0,05$ vs CN; ## $P < 0,01$ vs PN; ° ° ° $P < 0,001$ vs CH; ^^^ $P < 0,001$ vs PH.

5.9.6 Expressão de RNAm para o gene SLC2A2

A figura a seguir (**Figura 27**) ilustra a expressão do gene *SLC2A2* em tecido hepático no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *SLC2A2*, codifica a proteína transportadora de glicose GLUT2, que permite o fluxo de glicose de acordo com a via metabólica em atividade: para vias de síntese, há influxo celular e para vias oxidativas, predomina-se o efluxo celular. Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos em nenhum dos tratamentos alimentares.

Figura 27- Expressão de RNAm para o gene *SLC2A2* em tecido hepático.

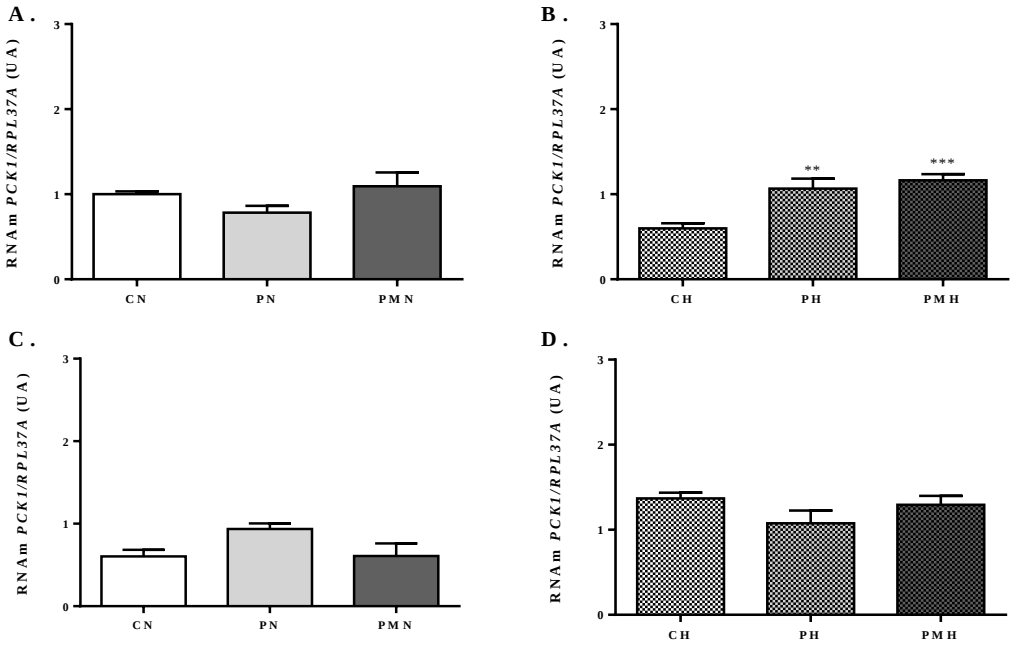


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 8 animais.

5.9.7 Expressão de RNAm para o gene PCK1

A figura a seguir (**Figura 28**) ilustra a expressão do gene *PCK1* em tecido hepático no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *PCK1* codifica a enzima-chave da gliconeogênese hepática, PEPCK. Conforme demonstrado, no ZT 6, foi possível observar, maior expressão de RNAm do gene nos grupos PH e PMH quando comparados à expressão observada no grupo CH ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente). Não houve diferença significante de expressão, no ZT 18, entre os grupos nos diferentes tipos de tratamento alimentar.

Figura 28- Expressão de RNAm para o gene *PCK1* em tecido hepático.



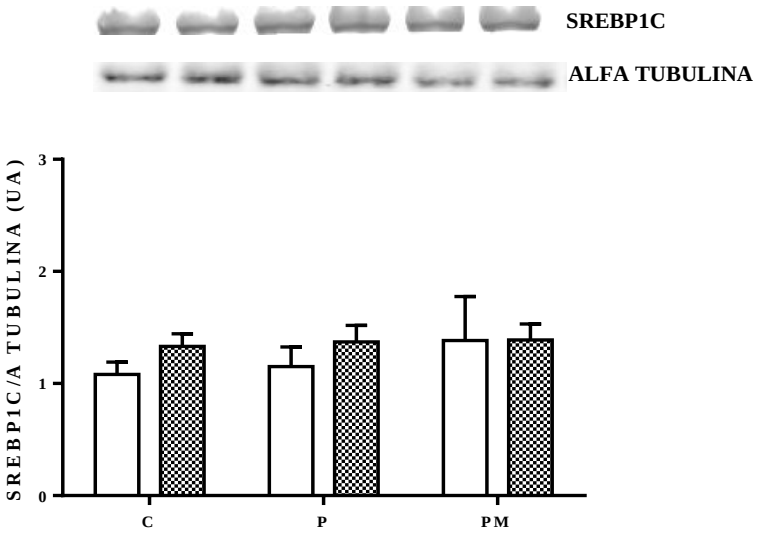
As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 7 animais. ** $P < 0,01$ vs CN; *** $P < 0,01$ vs CN.

5.10 Análises de conteúdo proteico em tecido hepático

5.10.1 Conteúdo proteico de SREBP1C

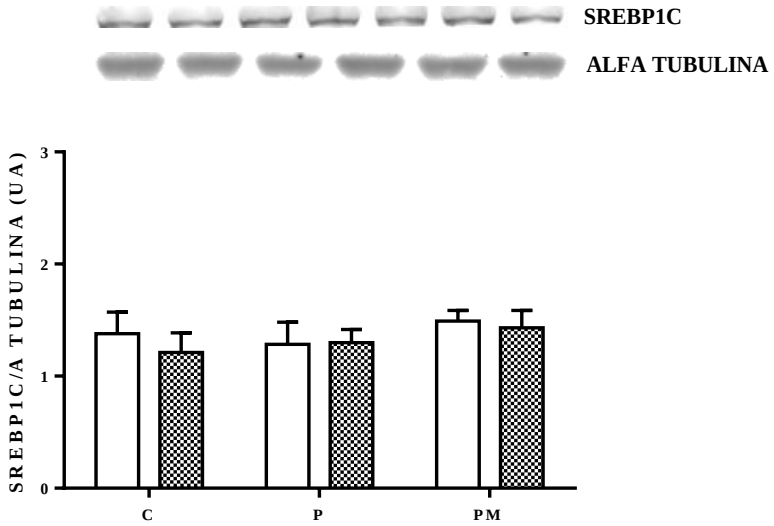
A seguir ilustra-se o conteúdo proteico de SREBP1C em tecido hepático no ZT 6 (**Figura 29**) e no ZT 18 (**Figura 30**). Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos em nenhuma das condições experimentais avaliadas.

Figura 29- Conteúdo proteico de SREBP1C em tecido hepático no ZT 6.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

Figura 30- Conteúdo proteico de SREBP1C em tecido hepático no ZT 18.

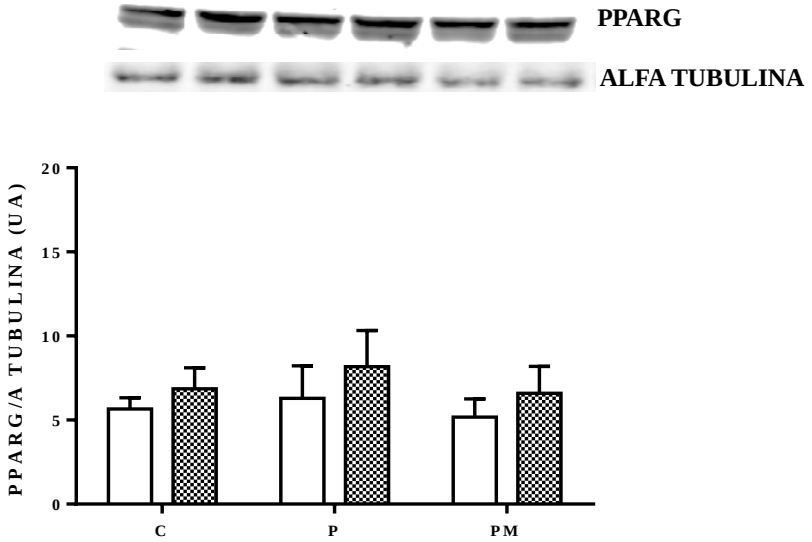


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

5.10.2 Conteúdo proteico de PPARG

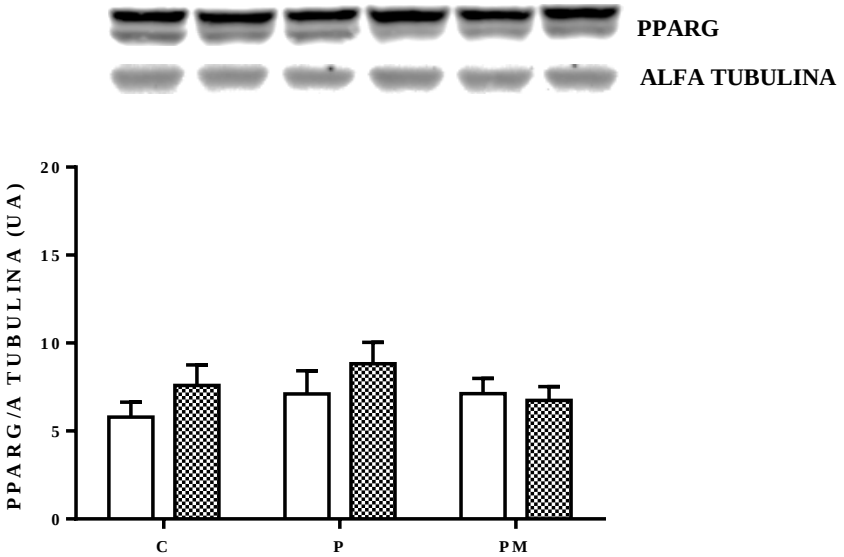
A seguir ilustra-se o conteúdo proteico de PPARG em tecido hepático no ZT 6 (**Figura 31**) e no ZT 18 (**Figura 32**). Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos em nenhuma das condições experimentais avaliadas.

Figura 31- Conteúdo proteico de PPARG em tecido hepático no ZT 6.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

Figura 32- Conteúdo proteico de PPARG em tecido hepático no ZT 18.

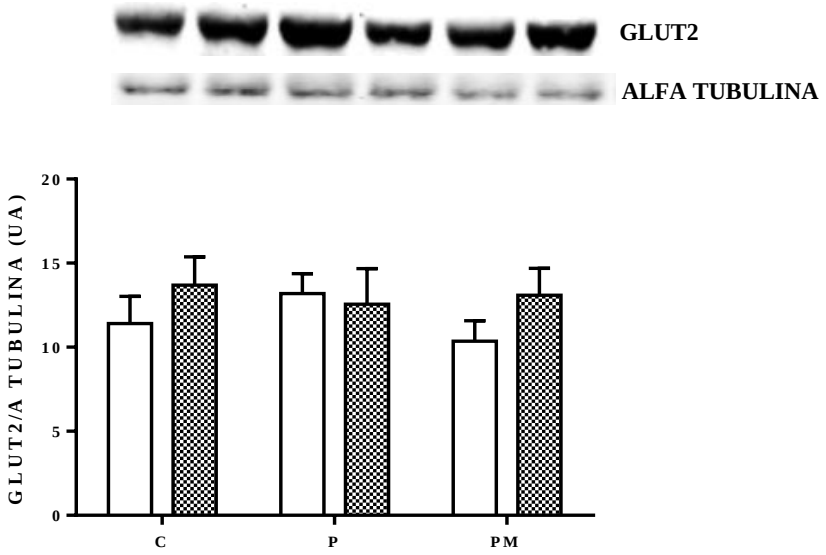


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

5.10.3 Conteúdo proteico de GLUT2

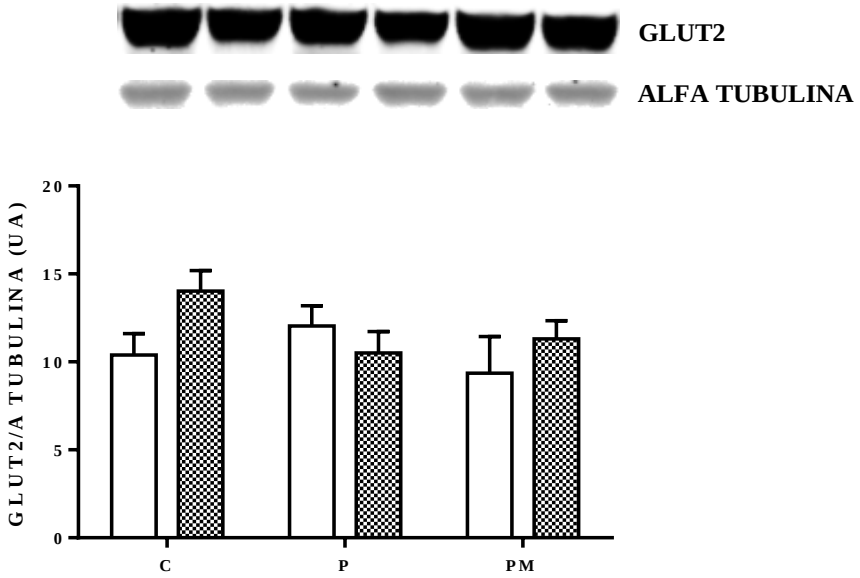
A seguir ilustra-se o conteúdo proteico de GLUT2 em tecido hepático no ZT 6 (**Figura 33**) e no ZT 18 (**Figura 34**). Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos em nenhuma das condições experimentais avaliadas.

Figura 33- Conteúdo proteico de GLUT2 em tecido hepático no ZT 6.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

Figura 34- Conteúdo proteico de GLUT2 em tecido hepático no ZT 18.

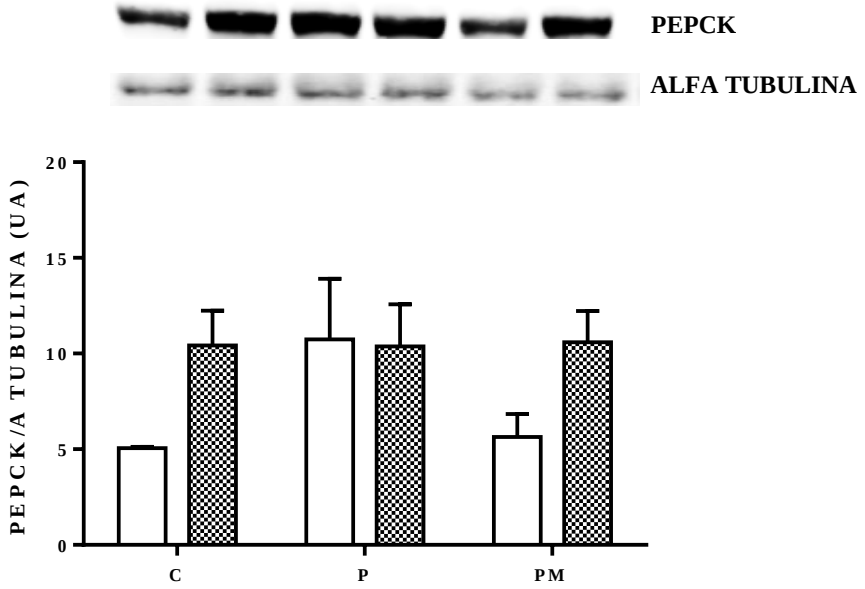


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

5.10.4 Conteúdo proteico de PEPCK

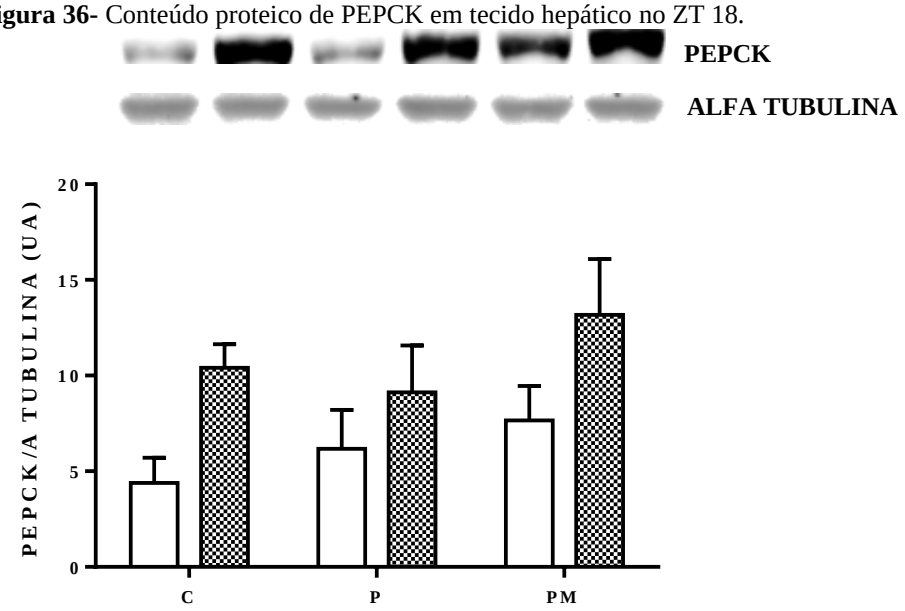
A seguir ilustra-se o conteúdo proteico de PEPCK em tecido hepático no ZT 6 (**Figura 35**) e no ZT 18 (**Figura 36**). Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos em nenhuma das condições experimentais avaliadas.

Figura 35- Conteúdo proteico de PEPCK em tecido hepático no ZT 6.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 3 a 4 animais.

Figura 36- Conteúdo proteico de PEPCK em tecido hepático no ZT 18.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de duas vias/ *Bonferroni* e n= 4 animais.

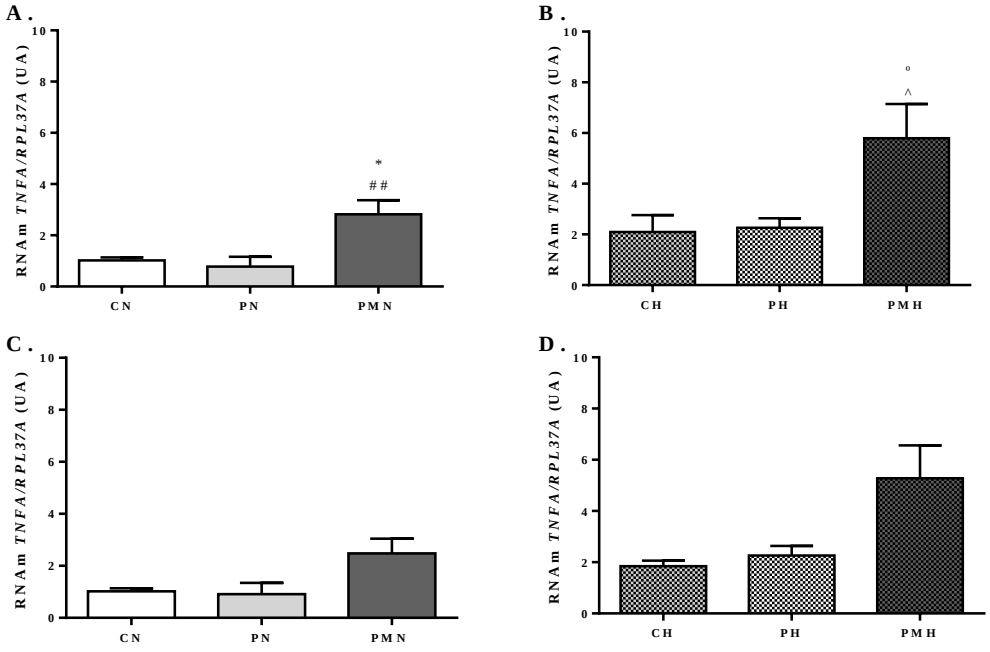
5.11 Análises de expressão gênica em tecido adiposo branco perigonadal

Nos tópicos a seguir serão descritos os resultados de expressão gênica obtidos em tecido adiposo perigonadal relacionados ao perfil inflamatório (*TNFA*, *IL1B* e *IL6*) e ao metabolismo glicídico (*SLC2A4*).

5.11.1 Expressão de RNAm para o gene TNFA

A figura a seguir (**Figura 37**) ilustra a expressão do gene *TNFA* em tecido adiposo perigonadal no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. Conforme demonstrado, no ZT 6 os filhotes PM, independentemente do tratamento alimentar apresentaram maior expressão de RNAm para *TNFA* quando comparados aos filhotes C e P submetidos ao mesmo tratamento alimentar (no tratamento normolipídico $P < 0,05$ para PMN vs CN e $P < 0,01$ para PMN vs PN; e no tratamento hiperlipídico $P < 0,05$ para PMH vs CH e PH). Não houve diferença significante nos resultados obtidos em ZT 18.

Figura 37- Expressão de RNAm para o gene *TNFA* em tecido adiposo perigonadal.

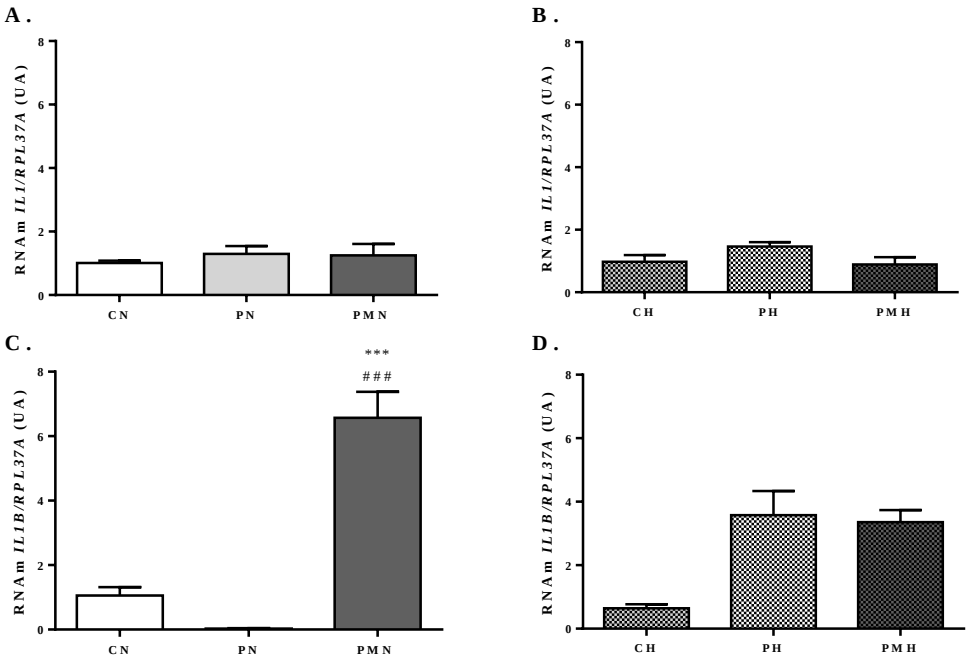


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 8 animais. * $P < 0,05$ vs CN; ## $P < 0,01$ vs PN; º $P < 0,05$ vs CH.

5.11.2 Expressão de RNAm para o gene IL1B

A figura a seguir (**Figura 38**) ilustra a expressão do gene *IL1B* em tecido adiposo perigonadal no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos no ZT 6, entretanto, houve aumento significante de expressão nos animais PMN no ZT 18, quando comparado aos animais CN e PN ($P < 0{,}001$).

Figura 38- Expressão de RNAm para o gene *IL1B* em tecido adiposo perigonadal.

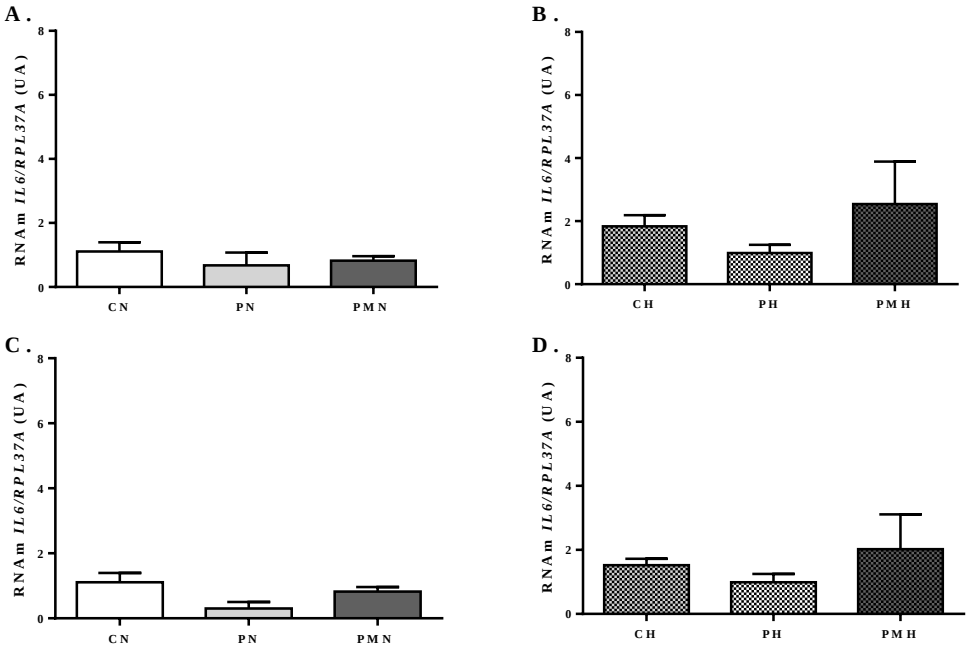


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 3 a 5 animais. *** $P < 0{,}001$ vs CN; ### $P < 0{,}001$ vs PN.

5.11.3 Expressão de RNAm para o gene IL6

A figura a seguir (**Figura 39**) ilustra a expressão do gene *IL6* em tecido adiposo perigonadal no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. Conforme demonstrado, não foi possível observar diferença significante entre os grupos em nenhum dos ZTs avaliados e tratamentos alimentares utilizados.

Figura 39- Expressão de RNAm para o gene *IL6* em tecido adiposo perigonadal.

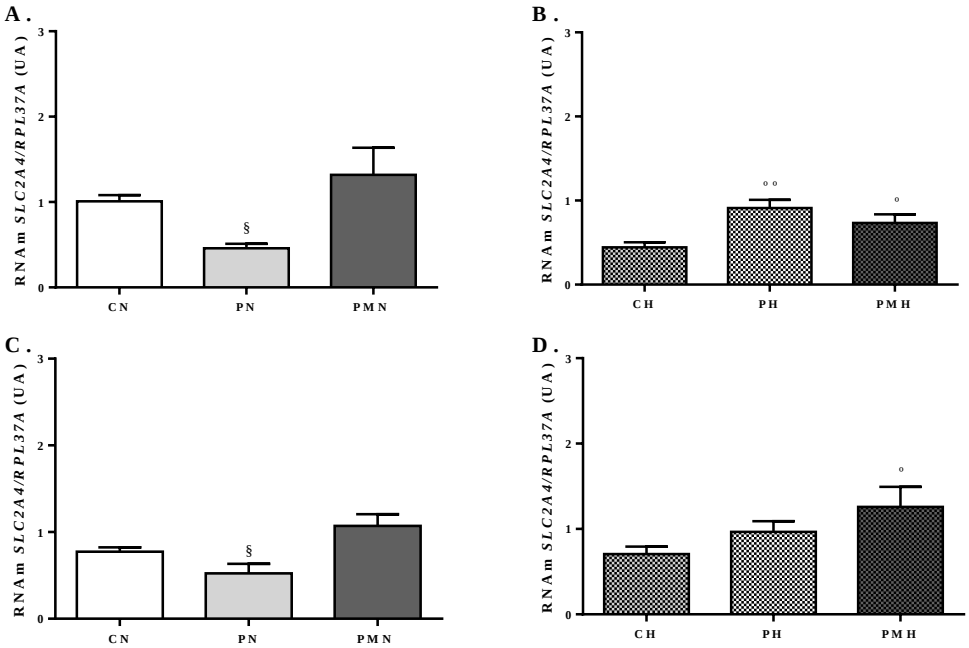


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 3 a 5 animais.

5.11.4 Expressão de RNAm para o gene SLC2A4

A figura a seguir (**Figura 40**) ilustra a expressão do gene em tecido adiposo perigonadal no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O grupo PN apresentou redução significante da expressão do RNAm quando comparado ao grupo PMN, nos ZTs 6 e 18 ($P < 0,05$). Sob desafio hiperlipídico, o grupo PH em ZT 6 ($P < 0,01$) e o grupo PMH ($P < 0,05$), tanto em ZT 6 quanto em ZT 18, apresentou maior expressão quando comparado ao grupo CH.

Figura 40- Expressão de RNAm para o gene *SLC2A4* em tecido adiposo perigonadal.



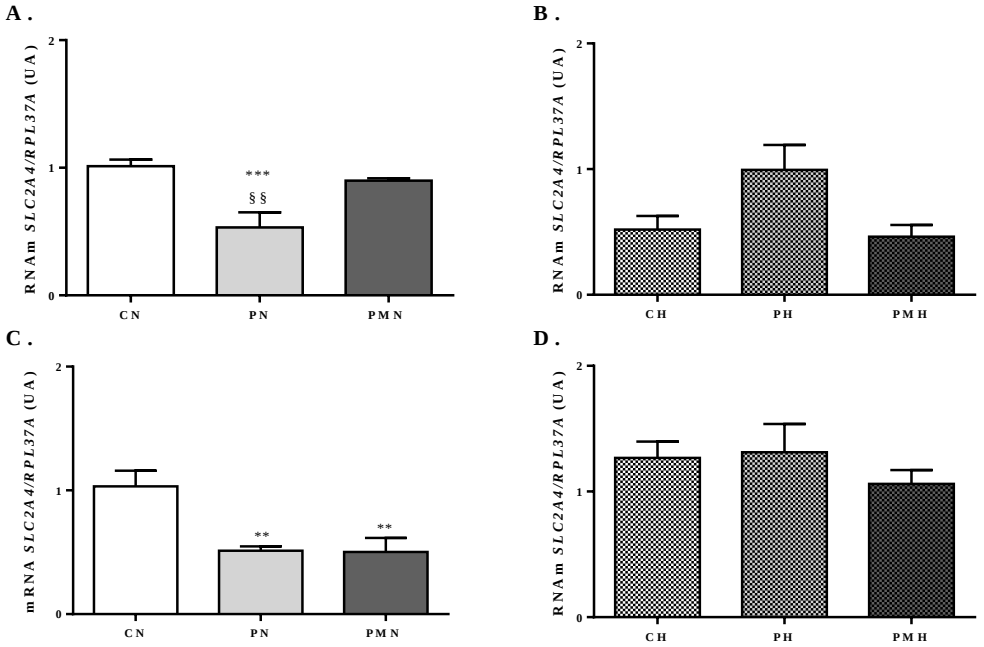
As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 7 animais. § $P < 0,05$ vs PMN; º $P < 0,05$ vs CN; ºº $P < 0,01$ vs CN.

5.12 Análises de expressão gênica em tecido adiposo marrom interescapular

5.12.1 Expressão de RNAm para o gene SLC2A4

A figura a seguir (**Figura 41**) ilustra a expressão do gene *SLC2A4* em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *SLC2A4*, codifica a proteína transportadora de glicose GLUT4, que realiza a captação de glicose do tecido e, portanto, participa da homeostase glicêmica, à partir da ativação de uma via de sinalização intracelular desencadeada pela insulina. No ZT 6, houve redução significante de expressão no grupo PN quando comparado aos demais grupos sob o mesmo tratamento alimentar ($P < 0{,}001$ vs CN e $P < 0{,}01$ vs PN). No ZT 18, além da redução mantida no grupo PN, animais PMN também apresentaram menor expressão quando comparados ao grupo CN ($P < 0{,}01$).

Figura 41- Expressão de RNAm para o gene *SLC2A4* em tecido adiposo marrom interescapular.

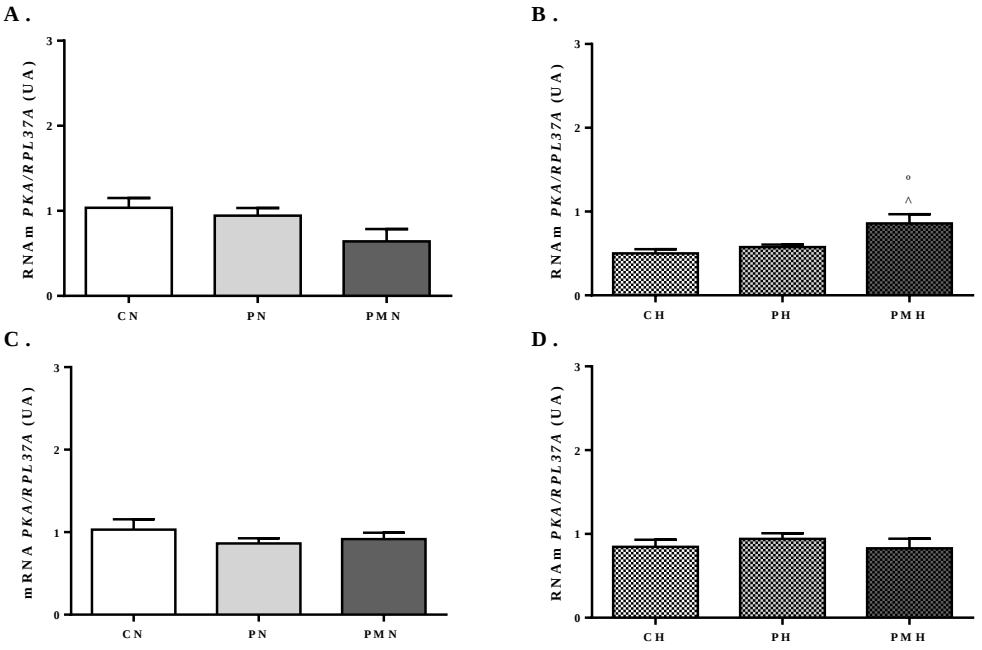


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 5 a 7 animais. ** $P < 0{,}01$ vs CN; *** $P < 0{,}001$ vs CN; §§ $P < 0{,}01$ vs PMN.

5.12.2 Expressão de RNAm para o gene PKA

Na figura a seguir (**Figura 42**) demonstra-se a expressão do gene *PKA* em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. A PKA é uma quinase que torna-se ativa, no adipócito marrom, à partir da interação de NA em receptor ß3 adrenérgico e é responsável pela modulação da enzima lipase hormônio sensível que, por sua vez, induz lipólise e liberação de ácidos graxos à partir de triacilgliceróis. Nota-se maior expressão de RNAm no grupo PMH em ZT 6, quando comparado aos demais grupos submetidos ao mesmo tratamento alimentar ($P < 0,05$ vs CH e PH). Não houve diferença significante no ZT 18, entre os grupos experimentais.

Figura 42- Expressão de RNAm para o gene *PKA* em tecido adiposo marrom interescapular.

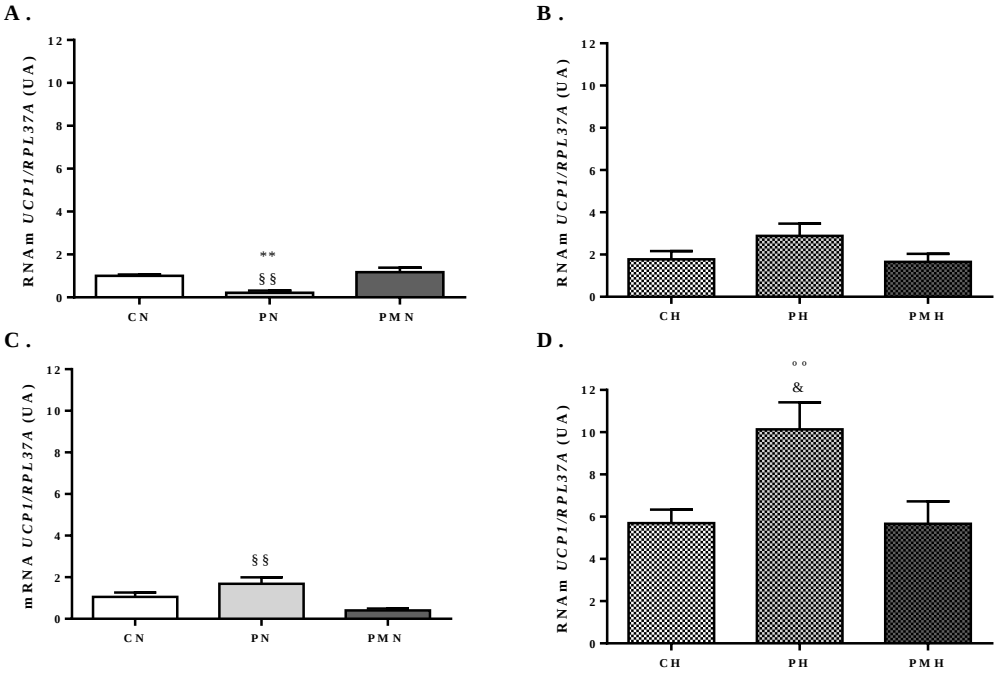


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 7 animais. º $P < 0,05$ vs CH; ^ $P < 0,05$ vs PH.

5.12.3 Expressão de RNAm para o gene UCP1

A figura a seguir (**Figura 43**) ilustra a expressão do gene *UCP1* em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene *UCP1*, codifica uma proteína desacopladora que proporciona, em adipócitos marrons, a capacidade do tecido em utilizar o fluxo de elétrons intermembranas mitocondriais para produção de calor. Conforme demonstrado, no ZT 6 houve redução significante na expressão do RNAm no grupo PN em relação aos grupos CN e PMN ($P < 0,01$), o que contrariamente foi observado em ZT 18, quando filhotes PN apresentaram maior expressão do RNAm em relação ao grupo PM ($P < 0,01$). Ainda no ZT 18, o desafio hiperlipídico em filhotes P exacerbou esse aumento observado no tratamento normolipídico e essa diferença foi significante tanto em relação ao grupo CH ($P < 0,01$) quanto em relação ao grupo PMH ($P < 0,05$).

Figura 43- Expressão de RNAm para o gene *UCP1* em tecido adiposo marrom interescapular.

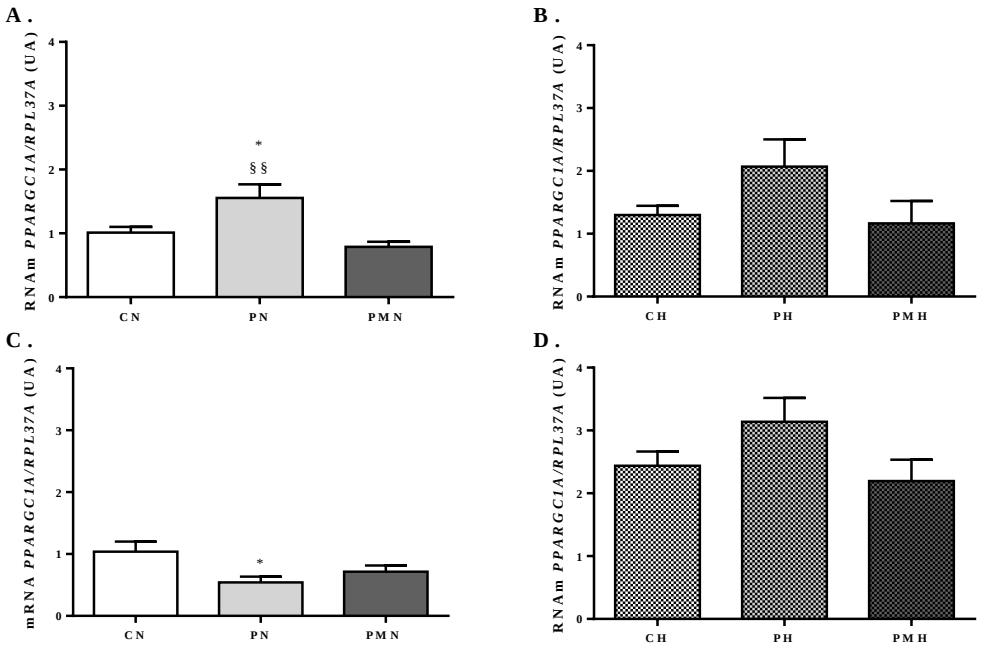


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 3 a 5 animais. ** $P < 0,01$ vs CN; §§ $P < 0,01$ vs PMN; ^{oo} $P < 0,01$ vs CH; & $P < 0,05$ vs PMH.

5.12.4 Expressão de RNAm para o gene PPARGC1A

A figura a seguir (**Figura 44**) ilustra a expressão do gene *PPARGC1A* em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. A presença de ácidos graxos livres, à partir lipólise ativada por PKA, é capaz de ativar o fator transcricional PGC1A, codificado pelo gene *PPARGC1A*, capaz de aumentar a atividade de genes termogênicos e de modular a diferenciação de adipócitos marrons. Conforme demonstrado, foi possível observar aumento significante na expressão do RNAm no grupo PN em ZT 6, quando comparado aos grupos CN ($P < 0,05$) e PMN ($P < 0,01$). Contrariamente, no ZT 18, a expressão do RNAm foi negativamente regulada quando comparada à de filhotes CN ($P < 0,05$).

Figura 44- Expressão de RNAm para o gene *PPARGC1A* em tecido adiposo marrom interescapular.

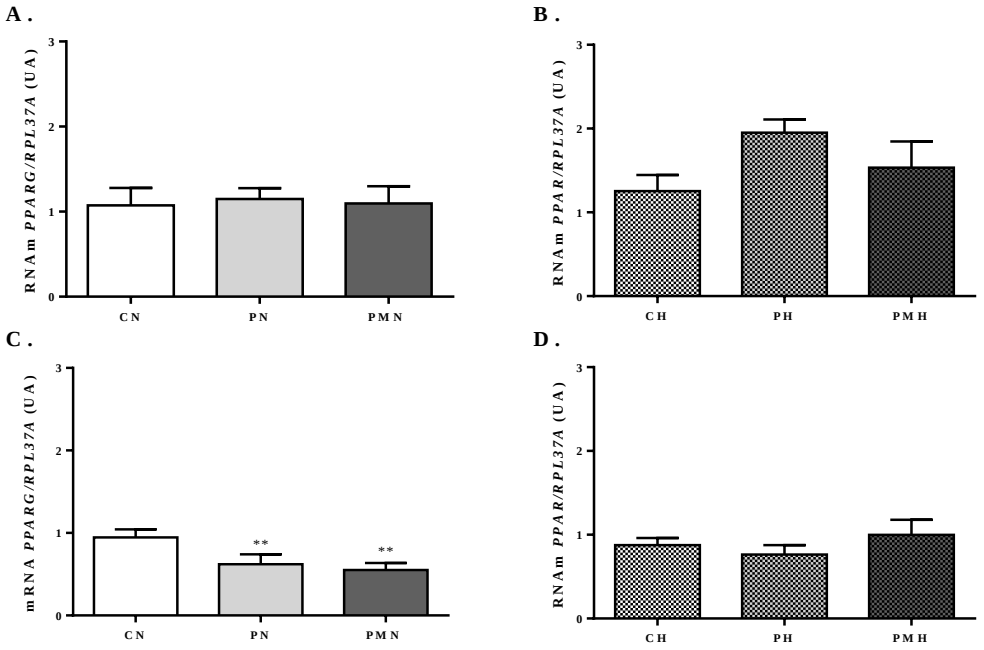


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 3 a 7 animais. * $P < 0,05$ vs CN; §§ $P < 0,01$ vs PMN.

5.12.5 Expressão de RNAm para o gene PPARG

A figura a seguir (**Figura 45**) ilustra a expressão do gene em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. *PPARG* é um gene termogênico que pode estar mais ativo na presença de ácidos graxos livres oriundos da lipólise induzida por PKA. No ZT 6, não foi possível observar diferença significante entre os grupos, em nenhum dos tratamentos alimentares. No ZT 18, animais PN e PMN apresentaram menor expressão do RNAm quando comparados aos filhotes CN ($P < 0,05$).

Figura 45- Expressão de RNAm para o gene *PPARG* em tecido adiposo marrom interescapular.

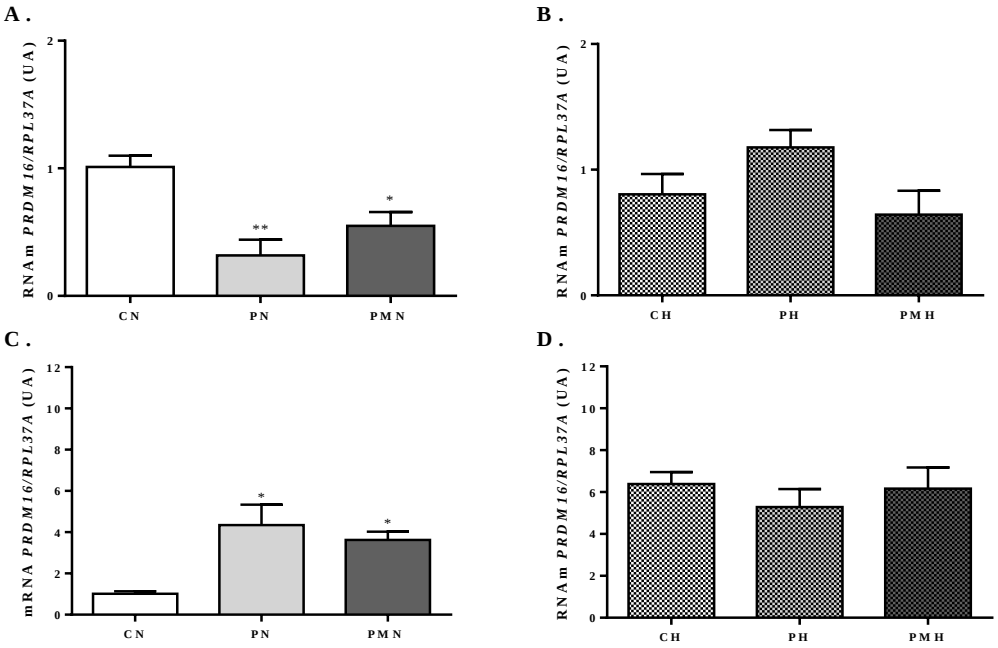


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 8 animais. ** $P < 0,01$ vs CN;

5.12.6 Expressão de RNAm para o gene PRDM16

Na figura a seguir (**Figura 46**) demonstra-se a expressão do gene *PRDM16* em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene termogênico *PRDM16* é capaz de modular a diferenciação de adipócitos marrons. No ZT 6, filhotes PN ($P < 0,01$) e PMN ($P < 0,05$) apresentaram menor expressão do RNAm em relação ao grupo CN. Contrariamente, em ZT 18, houve maior expressão do RNAm nos filhotes PN e PMN quando comparados ao grupo CN ($P < 0,05$). Não houve diferença significante na expressão em animais desafiados pela ração hiperlipídica, em nenhum dos ZTs investigados.

Figura 46- Expressão de RNAm para o gene *PRDM16* em tecido adiposo marrom interescapular.

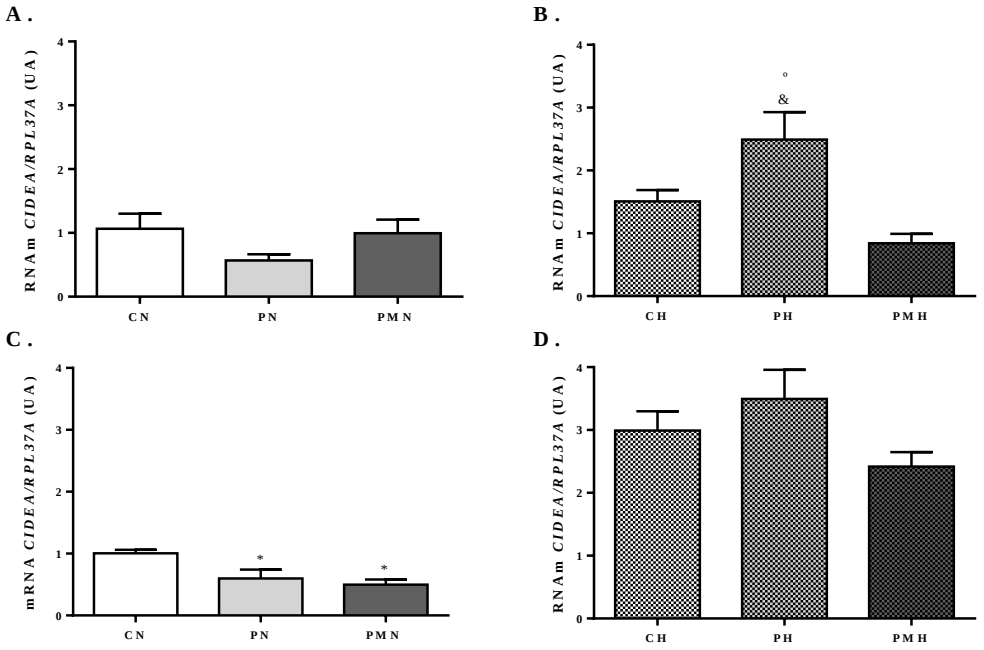


As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 3 a 6 animais. * $P < 0,05$ vs CN; ** $P < 0,01$ vs CN.

5.12.7 Expressão de RNAm para o gene CIDEA

A figura a seguir (**Figura 47**) ilustra a expressão do gene *CIDEA* em tecido adiposo marrom interescapular no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) após 12 semanas de tratamento alimentar. O gene termogênico *CIDEA* participa da regulação de *UCP1* e do metabolismo lipídico em adipócitos marrons. Conforme demonstrado abaixo, em ZT 6, animais P apresentaram maior expressão de RNAm quando desafiados pela ração hiperlipídica e comparados aos filhotes CH e PMH ($P < 0,05$). No ZT 18, animais PN e PMN apresentaram menor expressão do RNAm em relação aos animais CN ($P < 0,05$).

Figura 47- Expressão de RNAm para o gene *CIDEA* em tecido adiposo marrom interescapular.



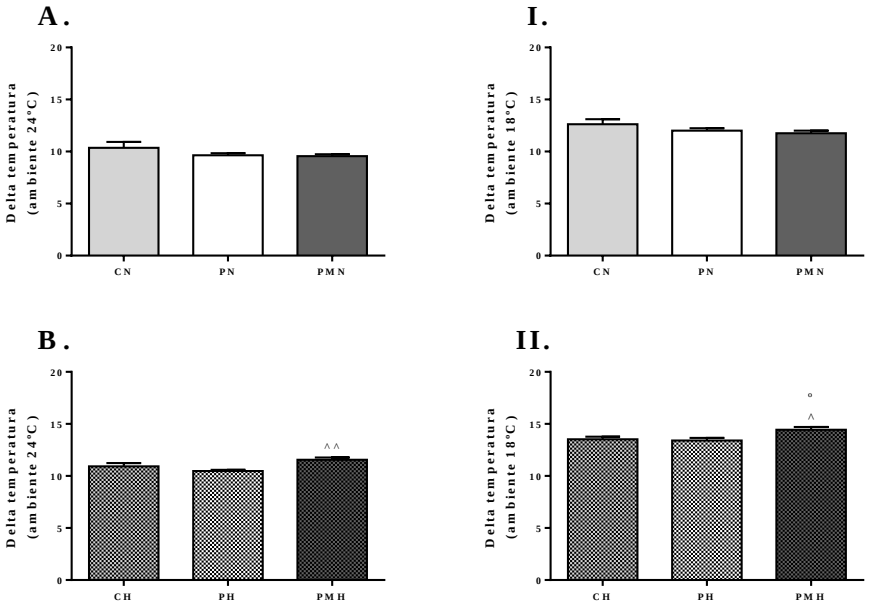
As análises foram realizadas no ZT 6 (**A.** e **B.**) e no ZT 18 (**C.** e **D.**) com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (**A.** e **C.**) ou com ração hiperlipídica (**B.** e **D.)** durante 12 semanas. Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 3 a 6 animais. * $P < 0,05$ vs CN; º $P < 0,05$ vs CH; & $P < 0,05$ vs PMH.

5.13 Análises de termorregulação

5.13.1 Delta temperatura entre tecido adiposo marrom interescapular e ambiente

A figura a seguir (**Figura 48**) ilustra o delta entre a temperatura do tecido adiposo marrom interescapular e a temperatura do ambiente sob condição basal (24ºC, **A.** e **B.**) e condição subneutra (18ºC, **I.** e **II.**), após 12 semanas de tratamento alimentar, no ciclo escuro. É possível notar que animais PM submetidos ao desafio ambiental hiperlipídico apresentaram maior delta, independentemente da exposição ao frio (a 24ºC $P < 0,01$ para PMH vs PH; a 18ºC $P < 0,05$ para PMH vs CH e PH).

Figura 48- Delta temperatura entre o tecido adiposo marrom interescapular e a temperatura ambiente.

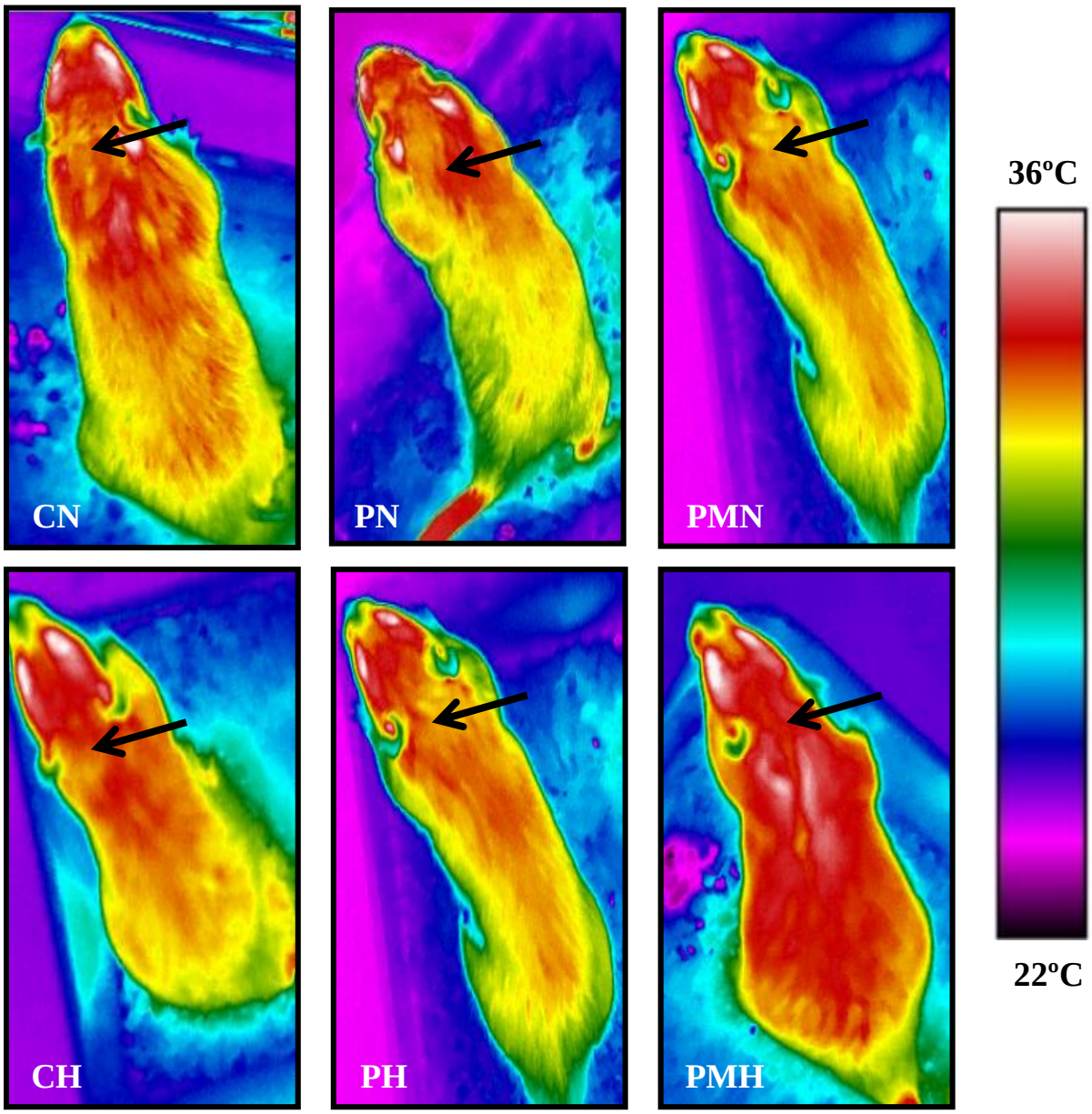


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas submetidas a condição basal (24ºC- **A.** e **B.**) e condição de frio (18ºC- **I.** e **II.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 4 a 10 animais. º $P < 0,05$ vs CH; ^ $P < 0,05$ vs PH; ^^ $P < 0,01$ vs PH.

5.13.1.1 Imagem representativa da termografia da região dorsal

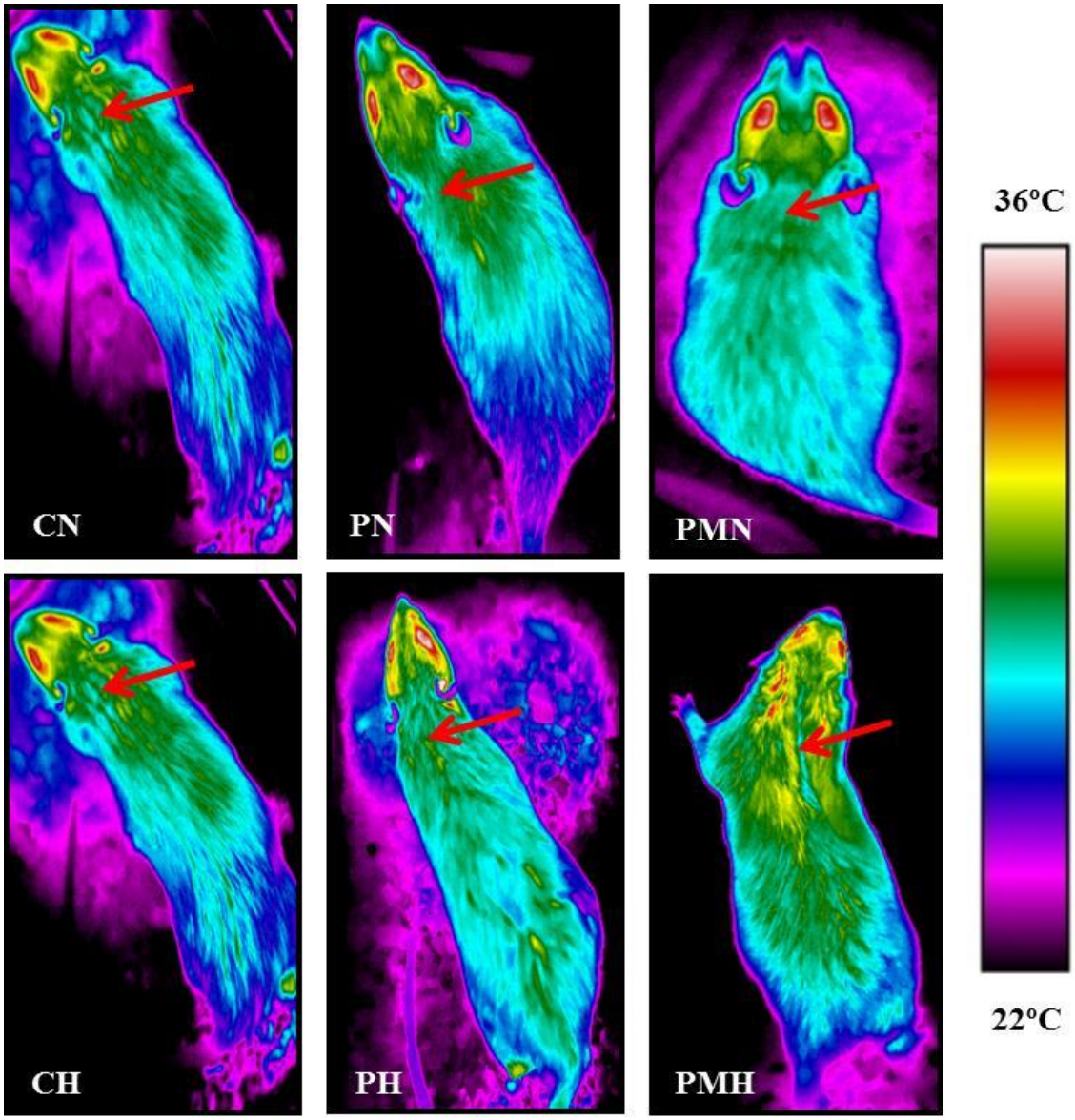
A seguir representa-se a imagem termográfica da região dorsal dos animais por grupo, a 24ºC (**Figura 49**) e a 18ºC, que caracteriza o desafio de frio (**Figura 50**). A região dorsal representa depósito de adipócitos marrons e as imagens corroboram com os gráficos de delta temperatura, descritos na **Figura 48**.

Figura 49- Imagem representativa da termografia da região dorsal da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar sob condição basal.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (CN, PN e PMN) ou com ração hiperlipídica (CH, PH e PMH**)** durante 12 semanas submetidos a condição basal (24ºC). As setas aproximam a região referente ao TAM interescapular desses animais.

Figura 50- Imagem representativa da termografia da região dorsal da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar em ambiente subneutro.

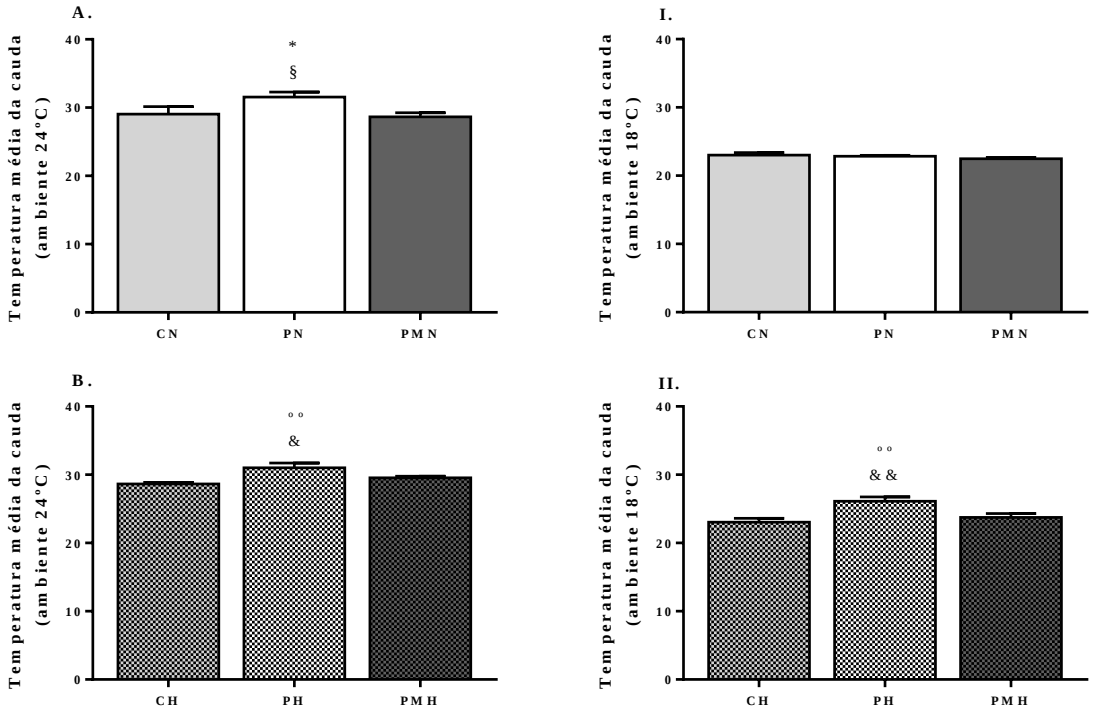


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (CN, PN e PMN) ou com ração hiperlipídica (CH, PH e PMH**)** durante 12 semanas submetidos a condição de frio (18ºC). As setas aproximam a região referente ao TAM interescapular desses animais.

5.13.2 Temperatura média da cauda

A figura a seguir (**Figura 51**) ilustra a temperatura média da cauda sob condição basal (24ºC, **A.** e **B.**) e condição subneutra (18ºC, **I.** e **II.**), ao final de 12 semanas de tratamento alimentar, no ciclo escuro. Pode-se observar que em condição basal a temperatura média da cauda dos filhotes P, independentemente do tratamento alimentar, é maior em relação aos demais grupos ($P < 0,05$ vs CN e PMN; $P < 0,01$ vs CH e $P < 0,05$ vs PMH). Quando desafiados pelo frio, em adição ao desafio hiperlipídico, o grupo PH também apresentou maior temperatura média da cauda em relação aos demais animais submetidos à mesmas condições ambientais ($P < 0,01$ vs CH e PMH).

Figura 51- Temperatura média da cauda da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar.

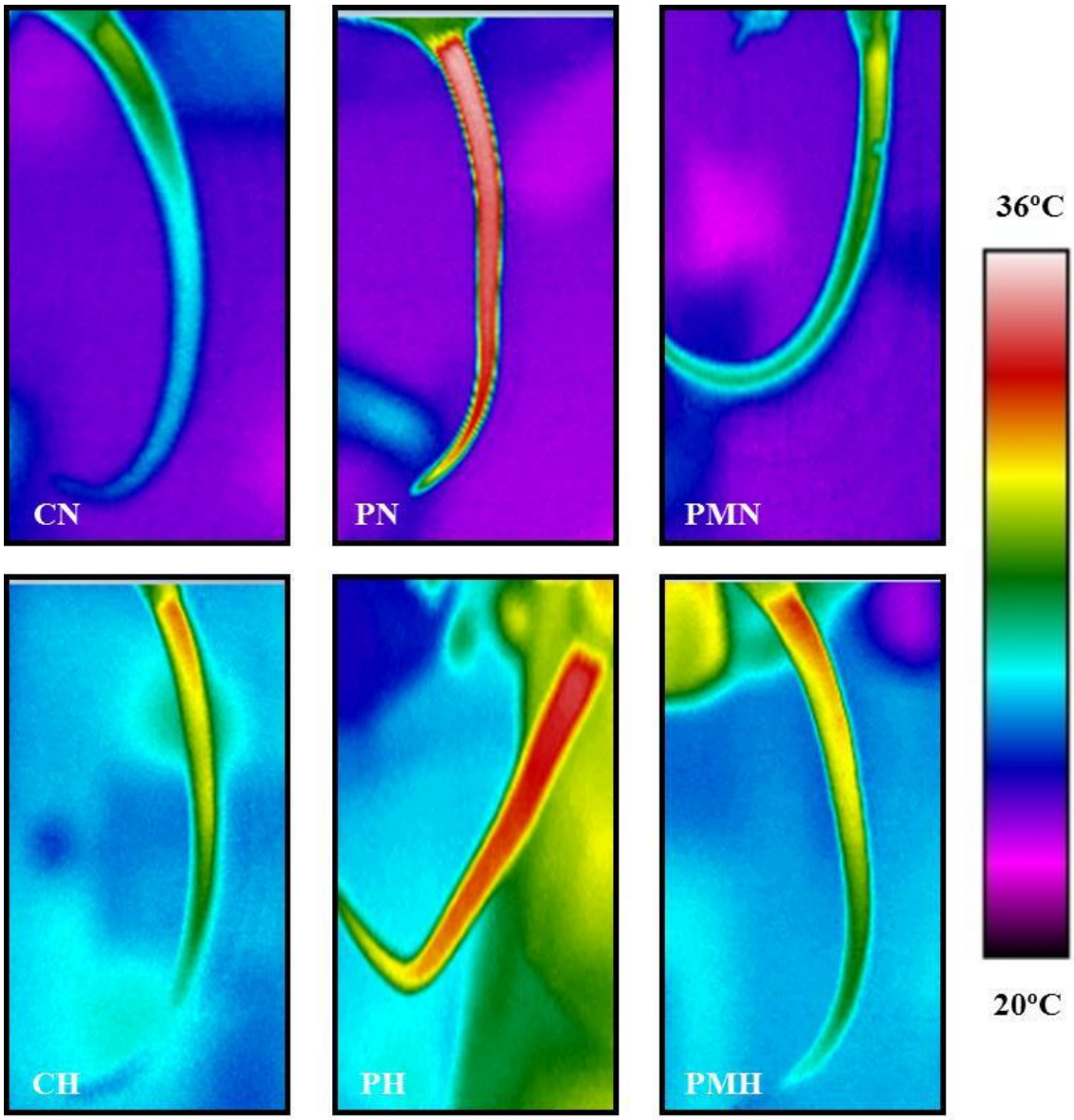


As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (barra lisa) ou com ração hiperlipídica (barra quadriculada**)** durante 12 semanas submetidas a condição basal (24ºC- **A.** e **B.**) e condição de frio (18ºC- **I.** e **II.**). Valores são médias ± EPM, ANOVA de uma via/ *Student Newman Kewls* e n= 5 a 11 animais. * $P < 0,05$ vs CN; § $P < 0,05$ vs PMN; ºº $P < 0,01$ vs CH; & $P < 0,05$ vs PMH; && $P < 0,01$ vs PMH.

5.13.2.1 Imagem representativa da termografia da cauda

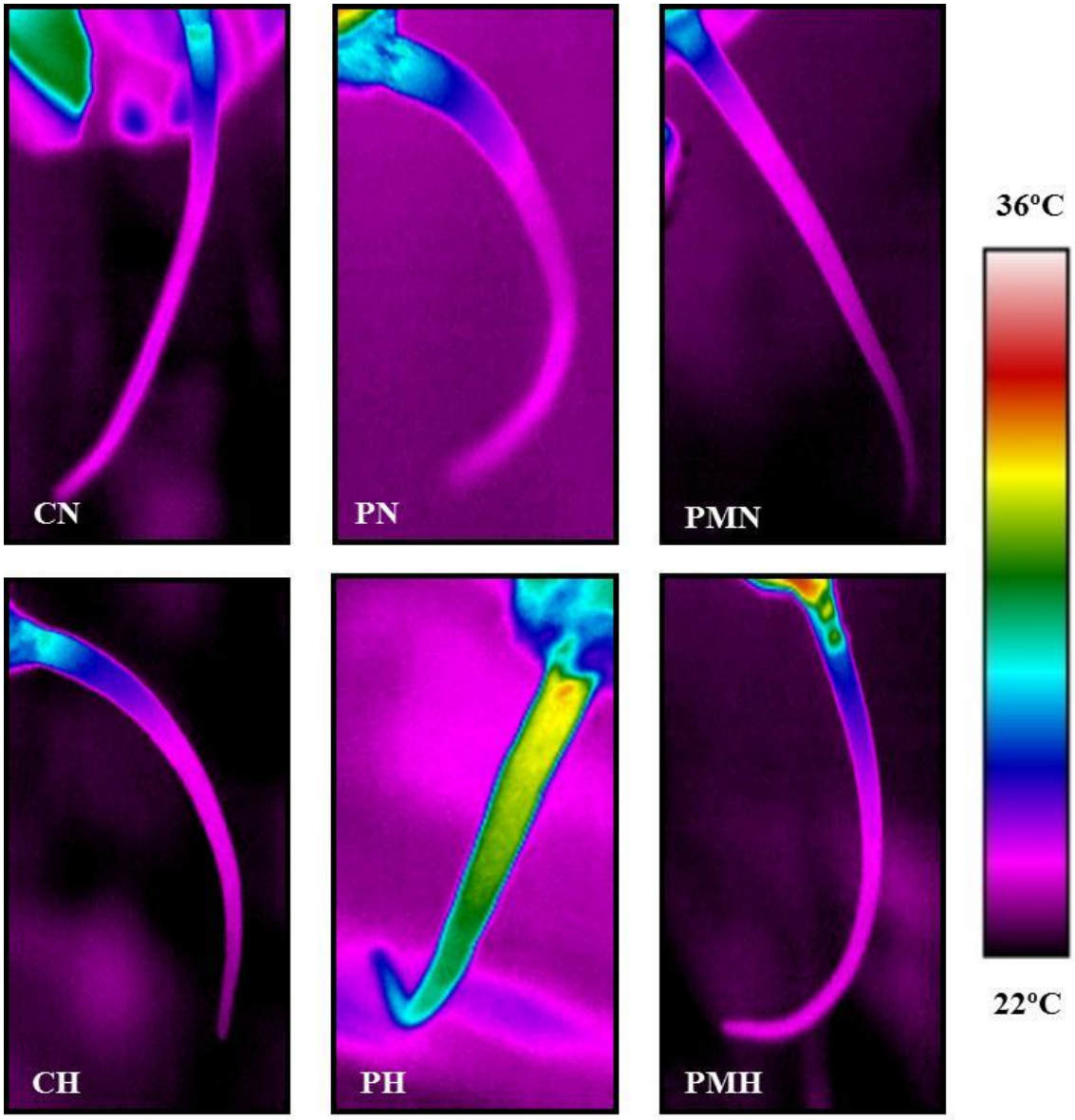
A seguir representa-se a imagem termográfica da cauda dos animais por grupo, a 24ºC (**Figura 52**) e a 18ºC, que caracteriza o desafio de frio (**Figura 53**). A região da cauda é considerada importante janela térmica do animal e as imagens corroboram com os gráficos descritos na **Figura 51**.

Figura 52- Imagem representativa da termografia da cauda da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar sob condição basal.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (CN, PN e PMN) ou com ração hiperlipídica (CH, PH e PMH**)** durante 12 semanas submetidos a condição basal (24ºC).

Figura 53- Imagem representativa da termografia da cauda da prole ao final de 12 semanas de tratamento alimentar em ambiente subneutro.



As análises foram realizadas com filhotes machos de mães controles (C), pinealectomizadas (P) e pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina (PM), alimentados com ração controle/normolipídica (CN, PN e PMN) ou com ração hiperlipídica (CH, PH e PMH**)** durante 12 semanas submetidos a condição subneutra (18ºC).

6. DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho foi caracterizar a influência da ausência de melatonina materna em tecidos metabolicamente ativos e o impacto funcional dessas características no perfil metabólico dos descendentes quando submetidos a diferentes desafios ambientais. Para uma análise mais minuciosa certamente seria importante considerar maior fracionamento nos pontos de coleta de tecidos e, então, análise circadiana dos parâmetros, entretanto, como o trabalho também investiga aspectos transgeracionais o número de grupos experimentais e o tempo de tratamento inviabilizaria o desenvolvimento adequado do projeto, em tempo hábil para escrita da tese e fechamento de conclusões. Neste sentido, o desenho experimental proposto considerou um momento em que, fisiologicamente, a melatonina estaria presente na circulação sanguínea e desenvolveria funções imediatas (ZT 18) e um momento em que, fisiologicamente, a melatonina já estaria ausente na circulação sanguínea (ZT 6), porém, os aspectos observados poderiam ter sido influenciados pela sua presença na noite anterior, o que caracteriza sua ação distal.

Muitos trabalhos já elucidaram o papel direto da melatonina na ritimicidade circadiana endógena, o que é de fundamental importância para o controle das funções do organismo, bem como para a manutenção do estado de saúde (ALONSO-VALE et al., 2008; ARCHER et al., 2014; CIPOLLA-NETO et al., 2014; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; REITER et al., 2011; STEHLE et al., 2011). A perda de ritimicidade é denominada cronorruptura e está fortemente associada ao desenvolvimento de diversas síndromes, inclusive relacionadas ao perfil metabólico, tais como a resistência à ação da insulina e outros desajustes endócrinos, além do aumento no depósito de TAB e possíveis anormalidades associadas a esses eventos (BORGES-SILVA et al., 2005; GOSH et al., 2007; LIMA et al., 2017; NISHIDA et al., 2003; PICINATO et al., 2008; SERAPHIM et al., 1997; ZANQUETTA et al., 2003).

A melatonina, por meio de efeitos transgeracionais, possui importância no desenvolvimento e programação fetal, inclusive no desenvolvimento metabólico (AMARAL et al., 2019; CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018) e, em função disso, algumas questões foram consideradas para o desenvolvimento do presente trabalho: a ausência de melatonina materna durante a gestação e lactação pode alterar as adaptações metabólicas nos filhotes submetidos a diferentes desafios ambientais (dieta e frio)? Desafios ambientais podem modular características moleculares e funcionais nos descendentes de ratas pinealectomizadas? O momento/horário experimental pode alterar os valores obtidos nas análises dos parâmetros propostos?

A primeira análise considerada foi a do peso corporal dos descendentes, realizada no 4º dia após o nascimento, quando não houve diferença significante entre os tratamentos maternos. Este dado corrobora às demais evidências de nosso grupo que sugerem relação da ausência da melatonina materna na alteração de peso corporal da prole de PINX à partir do 14º dia após o nascimento (MOTTA-TEIXEIRA et al., 2018). Em um segundo momento de acompanhamento do peso corporal, no desmame (21º dia de vida), filhotes de PINX (P) apresentaram-se significantemente mais pesados, quando comparados aos filhotes de CTL (C) e, a reposição materna de melatonina foi capaz de reverter este ganho, o que demonstra sua importante influência durante gestação e lactação no controle do ganho de peso corporal de seus descendentes. No período de introdução alimentar, este padrão de peso corporal observado no desmame foi mantido e, a ausência de melatonina materna, parece ter intensificado esta diferença, tanto em relação aos descendentes C quanto aos de fêmeas PINX+MEL (PM). É importante ressaltar que, o início do tratamento alimentar foi marcado pelo consumo da ração padrão do biotério durante uma semana (conforme especificado nos métodos), ou seja, todos os descendentes receberam a mesma ração, com a mesma composição nutricional e a mesma característica física. Nesse sentido, esses resultados demonstram o fundamental efeito da ausência da melatonina materna na perda de homeostase do peso corporal, frente ao natural período de introdução alimentar que, para estes animais (filhotes de PINX) tornou-se um relevante e criterioso desafio ambiental (**Figura 12**).

Em uma análise global de ganho de peso corporal, ao longo do período completo de tratamento alimentar (12 semanas) (**Figura 13**), observou-se que, independentemente do tipo de ração consumida, descendentes PM apresentaram menor ganho de peso corporal em relação aos demais grupos e que, sob tratamento hiperlipídico, esta diferença se exacerbou ao longo das semanas, principalmente, em relação aos filhotes de mães pinealectomizadas sem reposição terapêutica de melatonina. Estes resultados reforçam a hipótese de a melatonina materna, proteger a prole do ganho de peso corporal mediante a esse desafio ambiental. Adicionalmente, o fato de animais PM apresentarem menor peso em relação aos animais do grupo C pode indicar que o efeito protetor da melatonina materna é dependente da concentração, uma vez que a reposição utilizada no presente trabalho foi de 1 mg/Kg, o dobro necessário para induzir níveis plasmáticos fisiológicos médios: dados de nosso laboratório indicam que uma reposição de 0,5 mg/Kg peso corporal/dia induz níveis plasmáticos de, aproximadamente, 80 a 100 pg/mL de melatonina, considerados níveis de pico fisiológico. Esse fato poderia ser experimentalmente considerado se existisse um grupo controle também

suplementado com melatonina adicional, o qual poderá ser desenvolvido em experimentos futuros.

Quanto aos parâmetros de comportamento alimentar (consumo alimentar em gramas e em calorias), parâmetros antropométricos (ganho de peso corporal e índice de Lee) e de sensibilidade à insulina (glicemia, ITT e GTT) as análises foram realizadas em dois momentos: ao final de 4 semanas de tratamento alimentar (quando a prole completou 8 semanas de vida) e ao final de 12 semanas de tratamento alimentar (quando a prole completou 16 semanas de vida).

Das análises de consumo alimentar pontuais, ao final de 4 semanas de tratamento (**Figura 14**), filhotes de mães com reposição terapêutica de melatonina e alimentados com ração normolipídica apresentaram menor consumo (em gramas e em calorias) quando comparados aos grupos CN e PN. Nesse mesmo momento, e sob desafio hiperlipídico, filhotes de mães pinealectomizadas sem reposição terapêutica apresentaram maior consumo, em gramas e em calorias, quando comparados aos filhotes dos demais grupos e a reposição de melatonina materna reverteu esse aumento, quando o consumo de PMH se igualou aos de CH. Ao final de 12 semanas de tratamento, a reposição de melatonina materna induziu menor consumo, em gramas e em calorias, quando seus filhotes foram desafiados pela ração hiperlipídica (**Figura 15**). Em uma análise ao longo do tempo (**Figura 16**), foi possível observar que animais PM, independentemente do tipo de ração consumida, apresentaram menor consumo alimentar, em gramas e em calorias, e que, sob influência hiperlipídica, essa redução parece ter se intensificado ao serem comparadas com as significâncias obtidas no tratamento normolipídico. Essas características demonstram o papel da melatonina na função homeostática no balanço energético, mesmo que na presença de um desafio ambiental (CIPOLLA-NETO et al., 2014) que parece ter sido influenciado pela reposição materna ou, ainda, pela sua ausência materna durante a gestação e lactação.

Esse comportamento alimentar, então, se refletiu nos parâmetros antropométricos: conforme já mencionado os grupos PMN e PMH apresentaram menor ganho de peso corporal ao longo das 12 semanas de tratamento. Ao detalhar a dinâmica de ganho de peso corporal dos animais, ao longo das semanas experimentais (**Figura 13**), nota-se que, entre os grupos alimentados com ração normolipídica, filhotes PM apresentaram maior controle nos momentos finais do tratamento (próximo a sétima semana) mas, sob desafio hiperlipídico, esse controle foi identificado desde a segunda semana. Tais eventos demonstram que, a reposição de melatonina materna capacitou seus descendentes, de maneira antecipada, quando submetidos a um desafio ambiental hiperlipídico. Apesar de na literatura existirem evidências

sobre a importância da melatonina no controle de peso corporal por mecanismos não associados ao consumo alimentar (TAN et al., 2011), no presente trabalho, por mais que não tenham sido mensurados sinalizadores bioquímicos específicos relacionados ao comportamento alimentar, observacionalmente, foram identificadas importantes alterações de consumo influenciadas pela reposição materna da melatonina nos períodos de gestação e lactação, o que caracterizou o grupo PM.

Quanto aos demais aspectos antropométricos descritos na **Tabela 4**, animais do grupo P, ao final de 4 semanas de tratamento alimentar, apresentaram maior índice de Lee em relação aos demais grupos, independentemente do tipo de ração consumida. É possível que este aumento, principalmente no tratamento hiperlipídico, tenha sido dependente do peso corporal (**Figura 13**), uma vez que o comprimento se mantém igual entre os grupos. Essa diferença tornou-se evidente apenas sob desafio hiperlipídico no período mais tardio de tratamento, quando o grupo PMH apresentou redução significante desse parâmetro em relação aos demais grupos.

É importante reforçar que, por mais que a influência da ausência ou reposição de melatonina não tenha sido direta no animal analisado, seu impacto no organismo materno, durante a gestação e a lactação, certamente foi suficiente para desencadear alterações transgeracionais: gestação e lactação são considerados períodos de susceptibilidade capazes de influenciar nas características de seus descendentes desde a infância e adolescência até a vida adulta e envelhecimento. Essa questão tem sido amplamente discutida na literatura e engloba conceitos de desenvolvimento e programação fetal e neonatal e influências epigenéticas na origem da saúde e da doença (DOHaD) considerando a importância dos insultos ambientais em períodos de susceptibilidade e o impacto disso, em longo prazo, no desenvolvimento de doenças, principalmente as não comunicáveis (SUZUKI, 2018). Um exemplo importante é o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) que é considerado um relevante problema metabólico, influenciador não somente da saúde materna, mas também da saúde dos descendentes tanto em curto quanto em médio e longo prazo (CHIEFARI et al., 2017; STUDY, 2010).

Há trabalhos que demonstram uma importante correlação entre casos de DMG, aumento de ganho de peso gestacional e flutuações glicêmicas pós-parto na presença de uma variante no gene para MTNR1B em mulheres asiáticas. Essa variante parece ser capaz de interferir na ritimicidade circadiana materna e, consequentemente, no peso corporal gestacional o que impacta nos demais parâmetros mencionados associados ao perfil glicêmico (KWAK et al., 2012; NISA et al., 2018). Em um estudo recente investigou-se, em mães com

ou sem DMG, a influência dessa variante em MT2 nos parâmetros de peso corporal materno e desenvolvimento da obesidade nos descendentes. Cerca de 1000 pares mães e filhos chineses foram incluídos nesse estudo e parâmetros antropométricos foram considerados para avaliar ganho de peso em ambos: nas mães observou-se ganho de peso corporal para idade gestacional e nos descendentes também foram analisados alguns indicadores para caracterização de ganho de peso corporal, tais como o IMC para idade, peso para idade e análise de circunferências corporais. Dentre os resultados obtidos o grupo detectou correlação positiva entre o genótipo materno de MTNR1B (alelo G), ganho de peso gestacional e indicadores antropométricos dos descendentes independente da presença do diabetes gestacional (LIANG et al., 2019). Sendo assim, além dos conhecidos efeitos diretos da melatonina no desenvolvimento e programação fetal (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018) deve-se considerar que a ausência da melatonina materna poderia ter gerado um quadro de resistência à insulina na mãe (AMARAL et al., 2019; LIMA et al., 1998) que se assemelha ao DM2 e, possivelmente, influenciado na expressão metabólica dos filhotes aquando adultos.

Outros trabalhos têm mencionado o impacto da ruptura circadiana materna no desenvolvimento de seus descendentes: a maior exposição à luz durante à noite de mulheres que trabalham em turnos reduzem de maneira significante sua produção fisiológica de melatonina. Esta condição está presente nas sociedades industrializadas onde estima-se que um a cada cinco trabalhadores tenha um perfil de trabalho noturno ou de horas irregulares. Esses trabalhadores podem apresentar diversas anormalidades à saúde, com significante alterações metabólicas decorrentes, por exemplo, do ineficiente controle de peso corporal, funcionamento intestinal, bem como regulação de taxa metabólica. Trabalhos anteriores e em andamento de nosso grupo demonstram que a ausência experimental de melatonina circulante, por meio da pinealectomia, é capaz de induzir um quadro de cronorruptura metabólica que poderia, também, ser considerado na análise dos distúrbios metabólicos apresentados pelos filhotes de ratas pinealectomizadas sem reposição terapêutica de melatonina.

Tendo em vista as demais funções da melatonina brevemente apresentadas nesse trabalho, além da homeostase energética, essa indolamina determina viabilidade reprodutiva, além de ser imprescindível para manutenção de uma gestação adequada e saudável e propiciar um ambiente intrauterino adequado (NEHME et al., 2019a). Um trabalho publicado por nosso grupo demonstrou como o perfil de melatonina no terceiro trimestre de gestação em trabalhadoras noturnas pode impactar nos descendentes. Apesar de algumas limitações encontradas no decorrer das análises, os autores observaram redução na concentração de 6SM em amostras de urina das trabalhadoras noturnas incluídas no estudo, o que demonstra

possível redução de produção de melatonina neste grupo. Além disso, seus neonatos apresentaram menor índice Ápgar (que consiste numa escala de pontuação realizada do 1º ao 5º minuto de vida para avaliar a saúde do neonato) e dificuldade em ser imediatamente amamentado ao seio (NEHME et al., 2019b).

No conjunto de análises realizado para investigação do metabolismo da glicose, ao final de 4 e de 12 semanas de tratamento foi possível observar que a ausência da melatonina materna durante a gestação e lactação (grupos PN e PH), induziu maior taxa de glicemia no ZT 10, após 10 horas de privação alimentar. Por outro lado, a reposição terapêutica de melatonina materna foi capaz de reverter esse efeito e os animais dos grupos PMN e PMH apresentaram glicemia semelhante aos de descendentes das fêmeas CTL, independentemente do desafio alimentar (**Figura 19**).

Quanto à sensibilidade à insulina, por meio do teste de tolerância à insulina (interpretado pela constante de decaimento da glicose), notou-se que filhotes de mães pinealectomizadas, ao final de 4 semanas e sob desafio hiperlipídico, apresentaram menor sensibilidade à insulina quando comparados aos demais grupos nas mesmas condições alimentares (CH e PMH). Esse efeito foi eliminado pela reposição terapêutica de melatonina nas mães pinealectomizadas (animais PMH apresentaram maior sensibilidade tanto em relação ao grupo CH quanto em relação ao grupo PH). Adicionalmente, ao final de 12 semanas de tratamento, animais PM mantiveram esse aumento de sensibilidade à insulina em relação aos demais grupos e em ambas condições alimentares (**Figura 20**).

Deve-se considerar ainda que os filhotes de mães pinealectomizadas (grupos P) tenham sua própria atividade pineal prejudicada, devido à hiperglicemia apresentada. Nosso grupo de pesquisa publicou um trabalho que demonstrou a significante influência da hiperglicemia na produção de melatonina pineal comprovando que, nesta condição (hiperglicemia) há redução na síntese e secreção de melatonina (AMARAL et al., 2014). Tendo em visto a importância da melatonina no metabolismo de carboidratos e homeostase glicêmica, essa condição descrita e possivelmente instalada nos animais dos grupos P do presente trabalho torna-se agravante para promoção de desajustes glicêmicos e metabólicos e pode induzir um ciclo incessante de causa e consequência desde os momentos mais iniciais do desafio alimentar, considerando que durante a gestação e lactação esses animais foram desenvolvidos na ausência de melatonina materna.

Em complementação aos resultados sobre sensibilidade à insulina, analisou-se a tolerância à glicose: não houve diferença significante entre os grupos, em nenhum dos períodos de tratamento (**Figura 21**). Nosso grupo já demonstrou a capacidade de a ausência

experimental de melatonina, por meio da pinealectomia, induzir intolerância à glicose (LIMA et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2011; ZANQUETTA et al., 2003) o que também pode ser manifestado nos descendentes de fêmeas pinealectomizadas (FERREIRA et al., 2012b). Essa última evidência mencionada foi detectada em descendentes que não foram submetidos à desafios alimentares e com 18 semanas de vida, quando apresentaram intolerância à glicose, devido à resistência hepática à insulina, bem como redução na secreção de insulina (FERREIRA et al., 2012b). No presente trabalho, as análises mais tardias foram realizadas com 16 semanas de vida do animal, e é possível que a tolerância à glicose desses animais tenha sido mantida por um quadro de hiperinsulinemia, apesar de não medida, o que poderia indicar que tanto a capacidade pancreática de produção quanto a de secreção de insulina ainda não tenham sido afetadas pela ausência de melatonina materna durante a gestação e lactação, mas que, poderia levar a um esgotamento pancreático em longo prazo (FERREIRA et al., 2012b).

A resistência à insulina hepática também é capaz de favorecer a hiperglicemia, visto que nessa condição a maquinaria celular torna-se mais disponível à glicogenólise e gliconeogênese. Tem-se discutido que o acúmulo de moléculas de diacilglicerol (DAG) provenientes do aumento da lipogênese hepática (doença hepática gordurosa não alcoólica-DHGNA) seja um importante gatilho para seu desenvolvimento, principalmente por induzir aumento de uma quinase atípica, a PKCε que, por sua vez, tende à inibir a fosforilação de IRS2 e AKT2 facilitando a instalação da resistência. Nesse sentido, parece que a resistência hepática à insulina decorre do maior acúmulo lipídico ectopicamente instalado no tecido hepático (PERRY et al., 2014). Tendo em vista esses mecanismos moleculares o presente trabalho se propôs a caracterizar algumas das proteínas-chaves nesses processos de gliconeogênese e de lipogênese. Também considerou-se a coleta de materiais para análise histológica, no entanto, os resultados não foram finalizados até o momento dessa escrita.

O desenvolvimento da resistência à insulina no fígado, músculo ou tecidos adiposos é um importante gatilho para se instalar o DM2, considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das principais doenças não comunicáveis, o que tem expandido as pesquisas sobre possibilidades de prevenção e tratamento, considerando fatores ambientais (alimentação e prática de exercícios físicos) e uso de medicamentos. Além dos fatores mencionados como estratégias de combate e tratamento ao DM2, fatores circadianos têm demonstrado cada vez mais significância na prevenção dessa anormalidade. Tendo em vista que a ritimicidade circadiana seja sincronizada por meio de pistas ambientais que, por sua vez, são transmitidas aos tecidos periféricos à partir de sinais hormonais, tais como a

melatonina e sinais comportamentais, como prática de exercícios físicos e ingestão alimentar, os tecidos metabolicamente ativos (fígado, tecidos adiposos, pâncreas e músculo) são capazes de detectar essa modulação à partir de metabólitos provenientes, por exemplo, da ingestão alimentar.

Alguns estudos demonstram essa correlação por meio do *timing* de melhor sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, que ocorre principalmente no início do período de atividade da espécie (DRĂGOI, 2019; GIBSON; JARRETT, 1972; GUETHER et al., 1996; MORRIS et al., 2015; ROBERTS, 1864; SAAD et al., 2012). Considerando que esses ajustes hepáticos associados ao metabolismo energético sejam dependentes da sinalização de alguns hormônios e demais fatores rítmicos, por exemplo a alimentação, pode-se mencionar que, uma vez que vias lipogênicas estejam presentes, espera-se que a gliconeogênese hepática esteja inibida e, se na fase de atividade, houver maior sensibilidade à ação da insulina, também é possível esperar maior atividade das vias de síntese.

No presente estudo, filhotes de fêmeas pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina, independentemente do tipo de ração consumida, apresentaram maior expressão de RNAm, em ZT 6, da maioria dos genes lipogênicos investigados: *NR1H3* (**Figura 22**), *SREPB1C* (**Figura 23**), *PPARG* (**Figura 26**), mas não foi possível identificar aumento significante na expressão de *ACACA* (**Figura 24**) e *FASN* (**Figura 25**) no momento experimental em questão, o que poderia indicar algum controle na maquinaria celular com intuito de evitar, de fato, a lipogênese e proteger o tecido hepático do acúmulo lipídico ectópico. No entanto, pode-se notar que a dinâmica de expressão do RNAm não foi correspondente aos valores encontrados no conteúdo proteico, o que sugere interações pós-transcricionais que possam influenciar no conteúdo proteico e características funcionais. É possível, também, que o aumento significante na expressão de genes lipogênicos dos grupos PM possa associar-se a ausência de tradução desses RNAs e, portanto, acúmulo do RNAm celular e conteúdo proteico semelhante ao de filhotes de fêmeas CTL (**Figuras 29** a **32**).

A análise dos genes participantes da gliconeogênese, apesar de não demonstrar alterações significantes na expressão de RNAm para *PCK1* (**Figura 28**) de filhotes de mães pinealectomizadas, se realizada uma análise isolada, no ZT 6, entre os grupos alimentados com ração normolipídica, há redução significante de expressão no grupo PN: P = 0,0013 (teste “t”, dados não mostrados) para PN vs CN e P = 0,0004 (teste “t”, dados não mostrados) para PN e PMN. Adicionalmente, o conteúdo proteico descrito para PEPCK, no ZT 6, (**Figura 35**) não se alterou quando se compara os grupos dos filhotes sob os diferentes tratamento alimentares, entretanto, ao considerar análises de ANOVA de uma via entre os

grupos tratados com ração normolipídica (CN, PN e PMN), seguindo o padrão utilizado nas análises de expressão do RNAm, o grupo PN apresentou maior conteúdo proteico de PEPCK quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$, dados não mostrados) sob as mesmas condições experimentais. Essas evidências permitem inferir que, se filhotes de mães com reposição terapêutica de melatonina durante a gestação e lactação possuem a mesma magnitude de conteúdo que os filhotes de mães controles, então, filhotes de mães pinealectomizadas sem reposição terapêutica possuem uma exacerbação da gliconeogênese hepática no período de repouso. Adicionalmente, esse evento poderia ser resultado de uma significante alteração metabólica provocada pela ausência de melatonina materna que, como aliás se observa no próprio animal pinealectomizado (NOGUEIRA et al., 2011). Esse desajuste metabólico, por sua vez, pode ter contribuído para os maiores valores de glicemia encontrados nesses grupos de animais (**Figura 19**), em conjunto à resistência à insulina detectada pelo ITT (**Figura 20**).

Pode-se discutir fatores capazes de influenciar a tradução desses RNAm em proteínas. Uma das possibilidades a ser considerada seria a presença de microRNAs (miRNAs), moléculas estas incapazes de serem codificadas em proteínas e/ou de degradá-las e cuja importância na regulação pós-transcricional vem sendo cada vez mais discutida em literatura devido sua capacidade de inibir este processo (BARTEL, 2004; LU; ROTHENBERG, 2013). Há evidências mais específicas que demostram o impacto de miRNAs no metabolismo de glicose, inclusive na produção e sensibilidade à insulina. A presença de miRNA já foi descrita na sequência de genes da família *SREBP* (em especial *SREBP1C*) e, também, parece modular genes de vias neoglicogênicas, de tal forma que, na presença de insulina, sem considerar uma situação de resistência hepática à insulina, há aumento da expressão de *Srebp1c* e, consequentemente, aumento de miR-33 e inibição de *Pck1* (RAMÍREZ et al., 2013). Outros achados demonstram que alguns miRNAs, por exemplo o miR-23a, podem ser controlados pela melatonina e parecem proteger da instalação de esteatose hepática, independentemente da regulação na expressão de genes lipogênicos (KIM et al., 2015). Camundongos nocautes para miR-155 e alimentados com ração hiperlipídica, ao final de 24 semanas apresentaram alteração de sensibilidade à insulina; aumento na expressão de *Pck1* e *Fasn* mas nenhum impacto na expressão de *Pparg, Acaca, Srebp* e outros genes lipogênicos avaliados. Os autores sugerem que a deleção desse miRNA regula positivamente e diretamente a expressão de *Nr1h3* que, por sua vez, é significantemente associado ao desenvolvimento de DHGNA e, portanto, miR-155 parece apresentar efeito protetor ao acúmulo de lipídios em tecido hepático (MILLER et al., 2013).

Esses achados mencionados não obtidos à partir de um desenho experimental semelhante ao proposto no presente estudo, tampouco, foram conduzidos com preocupação na ritmicidade biológica e demais cuidados associados, entretanto, esses podem nortear futuras investigações a respeito de mecanismos moleculares envolvidos e facilitar a compreensão das correlações e interações presentes. No presente trabalho, é possível que tenha existido uma influência transgeracional da melatonina materna, durante a gestação e lactação, na expressão de miRNAs ou que, pelo fato de as análises não terem sido realizadas com maior número de pontos de coleta, caracterizando um experimento circadiano, parte da dinâmica de expressão gênica e de conteúdo proteico não tenha sido identificada.

Em relação aos tecidos adiposos brancos (perigonadal e retroperitoneal) o grupo PM apresentou menor conteúdo relativo ao peso corporal, em ambos os territórios, quando comparado aos demais grupos submetidos às mesmas condições alimentares, e o grupo P, quando submetido ao tratamento hiperlipídico, apresentou aumento significante de depósito na região retroperitoneal, o que demonstra importante ação da melatonina materna nesse controle (**Figura 17**). Dados não publicados de nosso grupo, realizados em animais envelhecidos e suplementados com melatonina, demonstram importante função anti-lipogênica da melatonina, principalmente, no coxim retroperitoneal (MENDES, 2017), o que também foi observado no presente trabalho, por influência da ausência materna de melatonina e em animais mais jovens.

Alguns autores evidenciaram importante efeito da melatonina na inibição da adipogênese (quando pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos maduros) (CARDOSO ALONSO-VALE et al., 2004) bem como na prevenção de seu estoque visceral ao longo do tempo (WOLDEN-HANSON et al., 2000), além de seu efeito anti-obesogênico previamente descrito (CIPOLLA-NETO et al., 2014). No presente trabalho, observou-se que, animais alimentados com ração hiperlipídica, apresentaram maior depósito adiposo nos coxins perigonadal e retroperitoneal avaliados, o que foi significantemente exacerbado pela ausência de melatonina materna, principalmente na região retroperitoneal, e revertido pela sua reposição terapêutica durante gestação e lactação. Destaca-se que, ao final de 12 semanas de consumo hiperlipídico, animais PM mantiveram sua sensibilidade à insulina demonstrada pelo ITT e o controle glicêmico.

Em uma análise comparativa entre dados antropométricos, de sensibilidade à insulina e de depósito lipídico, autores (JAMES; BURLEIGH; KRAEGEN, 1985) descreveram que o tecido adiposo branco é capaz de realizar o *clearance* da glicose plasmática em uma fração de, aproximadamente, 10% e que, quanto maior a massa de gordura, a função deste tecido na

captação de glicose passa a ser mais relevante e pode auxiliar em 40% do evento (CARO, 1991). No entanto, se a resistência à insulina também se instalar nesse tecido, a homeostase glicêmica não será realizada com eficiência o que exacerbará o estado de hiperglicemia e poderá prejudicar a produção e secreção de melatonina, iniciando um novo ciclo de desafios ambientais.

Na tentativa de avaliar a influência do tecido adiposo branco na homeostase metabólica dos animais, a expressão de RNAm para alguns genes foi analisada: houve maior expressão de *TNFA* nos animais PMN e PMH em ZT 6 (**Figura 37**), no entanto, ainda no ZT 6, a expressão de *SLC2A4* (**Figura 40**) se manteve aumentada nesses grupos e demostra que o aumento de *TNFA* talvez não sinalize algo prejudicial, do ponto de vista metabólico, mas que esteja presente devido à sua ritimicidade ou maior ativação decorrente à presença de melatonina durante a noite anterior. Além disso não houve diferença significante entre os grupos no que se diz respeito à expressão de *IL1B* (**Figura 38**) e IL6 (**Figura 39**). Evidências na literatura científica demonstram que a melatonina é capaz de modular ou ativar monócitos, bem como aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células através de sua interação com receptores de membrana e, além disso, esse mecanismo parece ser dependente do tempo de maturação celular, visto que, quanto mais jovens, maior o número de receptores, ao passo que, conforme amadurecem esse número reduz de maneira significante (BARJAVEL et al., 1998). Considerando a possibilidade de os filhotes de mães pinealectomizadas apresentarem redução na síntese e secreção de sua própria melatonina, devido às condições metabólicas observadas (AMARAL et al., 2014), é possível que essa sinalização/função esteja ineficiente nos grupos P.

No ZT 18, apenas a expressão de RNAm para *IL1B* (**Figura 38**) no grupo PMN apresentou aumento significante mas as demais citocinas pró-inflamatórias avaliados não sofreram modificações entre os grupos, nos diferentes tipos de tratamento alimentar. Contrariamente ao observado nos filhotes de mães pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina, aqueles cujas mães foram pinealectomizadas e não receberam a reposição, apresentaram expressão do RNAm para *SLC2A4* (**Figura 40**) reduzida após tratamento normolipídico, tanto em ZT 6 quanto em ZT 18. Certamente esses resultados contribuem para a caracterização do metabolismo glicídico demonstrada anteriormente, quando a ausência de melatonina materna durante a gestação e lactação promoveu maior glicemia nos filhotes, independentemente do desafio alimentar.

Por outro lado, assim como observado nas análises do tecido hepático, o aumento de expressão do RNAm no tecido adiposo perigonadal não necessariamente associa-se a um

correspondente aumento no conteúdo proteico, visto que podem existir regulações intermediárias a esses processos. Até o momento, as análises proteicas não foram concluídas nos tecidos adiposos (brancos e marrom interescapular) e, por esse motivo, não é possível concretizar e validar possíveis mecanismos regulatórios envolvidos nos parâmetros demonstrados, mas sim caracterizá-los e mencionar/discutir algumas possibilidades de acordo com as características fisiológicas de ação da melatonina e influência dos insultos ambientais propostos. Também não foi possível concluir as análises em tecido adiposo retroperitoneal para observar em que território a ausência e/ou reposição terapêutica de melatonina materna impacta com maior magnitude, do ponto de vista molecular.

Sobre o tecido adiposo marrom, foi possível observar que a ração hiperlipídica induziu redução de conteúdo do tecido relativo ao peso corporal para o grupo PM (**Figura 18**), entretanto, este fato não necessariamente indica que o mesmo está menos ativo e, neste sentido, dados de termografia podem auxiliar na compreensão e confirmação destas hipóteses.

Conforme já descrito em métodos os animais foram agudamente expostos a um outro desafio ambiental, o frio. Assim, as análises foram realizadas tanto em condição basal (24ºC) quanto em condição subneutra (18ºC), para identificação da capacidade de ativação do tecido. Sob condições basais, o delta entre a temperatura do TAM e a temperatura do ambiente foi maior nos animais PM alimentados com ração hiperlipídica quando comparados aos filhotes de mães pinealectomizadas sem reposição terapêutica sob o mesmo tratamento alimentar (PH) (**Figura 48**), o que pode indicar a significante influência da melatonina materna na sincronização do TAM frente aos desafios ambientais propostos: neste caso, a ração hiperlipídica, conforme demonstrado em outros parâmetros avaliados. Filhotes de mães controle e de mães pinealectomizadas não apresentaram esse mesmo perfil ao desafio alimentar: por mais que tenha sido identificado hipertrofia significante do TAM entre os tipos de tratamento alimentar nos filhotes C (P = 0,0035, teste “t” entre CN e CH, dados não mostrados na figura) e P (P = 0,0049, teste “t” entre PN e PH, dados não mostrados na figura) o mesmo não mostrou-se ativo, tampouco quando desafiados pelo frio (**Figura 48**).

A maior atividade de TAM interescapular nos animais PMH, independentemente do desafio pelo frio, pode ser um fator protetor do aumento de estoque de energia e ganho de peso corporal exacerbado. Esse fato se evidencia ao comparar o peso corporal entre os grupos PMN e PMH. A análise demonstra que animais PM sob desafio hiperlipídico apresentam menor peso corporal em relação aos animais PM sob tratamento normolipídico, na 12ª semana de tratamento (P = 0.0230, teste “t”, dados não mostrados na figura). A capacidade do TAM em auxiliar no gasto energético já foi descrita, em humanos, e parece participar em 15% desse

processo; o consumo excessivo de calorias é um dos principais indutores dessa regulação, porém, a inabilidade de ativação de termogênese pelo TAM, pode desencadear a instalação da obesidade (FELDMANN et al., 2009; ROTHWELL; STOCK, 1981; STOCK, 1989).

Muitos estudos demonstram que essa capacidade termorregulatória pode não ser eficiente se o consumo hiperlipídico for crônico ou, ainda, se o excesso de calorias se mantiver durante um período significante (FELDMANN et al., 2009; FROMME; KLINGENSPOR, 2011; LOCKIE et al., 2013; SEALS; BELL, 2004). No presente trabalho, na reposição terapêutica de melatonina materna, esses eventos não ocorreram, pelo contrário, capacitou os descendentes às adaptações pertinentes aos desafios ambientais, principalmente, no que se diz respeito à redução do consumo alimentar, que se refletiu na redução de ganho de peso e de tecido adiposo branco, melhor sensibilidade à insulina e homeostase glicêmica, enfatizando-se agora a maior capacidade de termorregulação.

A melatonina exerce influência direta na fisiologia do TAM, principalmente em relação ao aumento de sua atividade metabólica. Essa modulação pode ser centralmente regulada por neurônios de NSQ e do PVH, onde há receptores de melatonina MT1 e MT2 (SHIEH et al., 2009; TAN et al., 2011; WU et al., 2006) ou via regulação periférica, por meio de sua ação em MT1 e MT2 de adipócitos marrons (AARSETH; NORDØY; STOKKAN, 2001; MÅRTENSSON; ANDERSSON; BERG, 1996) podendo intensificar o estímulo simpático, induzir o *turnover* de NA e de aumentar a expressão de genes termogênicos (BAMSHAD; SONG; BARTNESS, 2017; BARTNESS; DEMAS; SONG, 2002). Na mitocôndria de adipócitos marrons também parece haver interação da melatonina: sua função antioxidante é capaz de proteger essa organela de danos oxidativos e, consequentemente, otimizar a função termogênica mitocondrial do tecido (LÓPEZ et al., 2009).

Além da ação direta da melatonina na termogênese do TAM, há evidências que demonstram a relação entre a exposição à melatonina, durante o período gestacional, e o desenvolvimento da termogênese da prole. Cordeiros fêmeas foram expostos à luz ambiental durante o período gestacional, com objetivo de reduzir a produção endógena de melatonina materna; seus filhotes foram experimentalmente analisados após exposição à termoneutralidade (24ºC) e ambiente subneutro (4ºC). Os autores identificaram menor temperatura do TAM em ambas às condições ambientais, menor peso deste tecido, maior concentração de NA plasmática, apesar da maior expressão de *UCP1*, *PPARG*, *PPARGC1A* e outros marcadores de atividade do TAM, bem como genes relógio importantes para o ritmo deste território. Estes eventos foram revertidos com a reposição de melatonina durante a gestação nas mães expostas ao claro constante (SERON-FERRE et al., 2014).

Ainda, um trabalho publicado em 2016 (LIANG et al., 2016) avaliou a influência do tratamento materno com ração hiperlipídica na termogênese da prole. Os autores mostraram que o consumo de uma dieta hiperlipídica pela mãe, durante a lactação, reduziu a termogênese pelo TAM, o que foi relacionado às alterações de composição do leite materno e ao desenvolvimento da adiposidade e da síndrome metabólica nestes animais, já que após intervenção com metformina (sensibilizador de insulina), houve melhora na atividade do tecido adiposo marrom.

No presente trabalho, algumas características semelhantes foram identificadas: de modo geral, descendentes de PINX submetidos ao desafio hiperlipídico apresentaram aumento de alguns marcadores termogênicos, bem como de fatores associados a diferenciação celular do TAM. Destaca-se a expressão de *UCP1* (**Figura 43**) que, no ZT 18, foi positivamente regulada nesses grupos, independentemente do tratamento alimentar, entretanto, o tecido não exerce sua funcionalidade de maneira significante sob qualquer um dos desafios propostos (seja a dieta, seja o frio). Além disso, a expressão do RNAm para *SLC2A4* nos grupos PN (**Figura 41**), apresentou significante redução, da mesma forma em que se observou no tecido adiposo branco retroperitoneal e essa expressão parece não ter um ritmo diário, visto que os valores se mantém semelhantes tanto em ZT 6 quanto em ZT 18.

A cauda é uma importante janela térmica do animal, visto que é responsável por controlar sua perda de calor corporal. A melatonina parece induzir maior constrição vascular nessa região, o que promove maior retenção de calor pelo animal. Nas análises de temperatura média da cauda (**Figura 51**) observou-se que, sob condição basal, animais P, independentemente do tipo de ração consumida, apresentaram maior temperatura média da cauda em relação aos animais C e PM, o que indica que a ausência de melatonina materna, durante a gestação e lactação, promoveu possível perda termorregulatória deste território, ou seja, o animal perdeu mais calor e que, a reposição terapêutica de melatonina materna foi capaz de reverter esse efeito. Este perfil se manteve na condição de frio, principalmente sob desafio hiperlipídico: o grupo PH exposto agudamente a condições subneutras apresentou maior temperatura média da cauda tanto em relação aos demais grupos submetidos às mesmas condições ambientais e, mais uma vez, quando se repõe a melatonina nas mães pinealectomizadas, esse efeito desaparece e iguala o perfil de seus filhotes ao dos filhotes de fêmeas controle.

As evidências demonstram que os desafios ambientais foram de importante relevância para modulação molecular e funcional dos parâmetros metabólicos dos descendentes de fêmeas pinealectomizadas. Quando houve reposição terapêutica de melatonina após

pinealectomia, os filhotes consumiram menor quantidade de ração, em gramas e em calorias, apresentaram menor índice de Lee e peso corporal em relação aos demais grupos com o mesmo padrão alimentar, menor glicemia e maior sensibilidade à ação da insulina, também apresentaram menor conteúdo adiposo branco, nos territórios analisados. Evidenciou-se, também, menor conteúdo de TAM interescapular relativo à massa corporal quando alimentados com ração hiperlipídica, porém, maior atividade deste tecido sob esse desafio (hiperlipídico) o que foi mantido quando desafiados pelo por ambiente subneutro frio. É possível que esses animais tenham, inclusive, atingido a capacidade máxima de ativação do TAM e recrutado, por exemplo, o tecido adiposo inguinal (KALINOVICH et al., 2017), onde ocorre o fenômeno de *browning*, que induz características de adipócitos marrons em adipócitos brancos de tecido subcutâneo (tais como o da região inguinal). Este fenômeno já foi observado tanto em animais quanto em humanos (BOSTRÖM et al., 2012) e é capaz de originar células denominadas beges (WU et al., 2012) com morfologia multilocular, ricas em mitocôndrias e que expressam UCP1 e outras proteínas relacionados à termogênese (KAJIMURA; SEALE; SPIEGELMAN, 2010). Há evidências de que tanto o tecido adiposo marrom quanto as células beges possam auxiliar na termogênese sem tremor de maneira sincronizada (PAN et al., 2014; SCHULZ et al., 2013).

Dados de nosso grupo, em preparação para publicação, a partir de estudos realizados com animais envelhecidos, demonstraram intensa comunicação entre os tecidos marrom e inguinal e mostrou que, quando um está reduzidamente ativo, o outro é recrutado (MENDES, 2017). No presente trabalho, animais P não apresentaram ativação eficiente do marrom interescapular frente ao desafio hiperlipídico ou ao desafio agudo pelo frio, bem como mostraram dificuldade em termorregular pela cauda, principalmente, quando alimentados com ração hiperlipídica. Em análise piloto, foi possível identificar modificações significantes de delta entre a temperatura da região inguinal e a temperatura ambiente: sob condição basal, dos animais alimentados com ração normolipídica, o grupo PN apresentou maior delta em relação aos grupos CN e PMN ($P < 0,001$, dados não mostrados) e animais PMN maior delta em relação ao grupo CN ($P < 0,001$, dados não mostrados); o desafio hiperlipídico induziu aumento do delta no grupo PH em relação ao grupo PMH ($P < 0,01$, dados não mostrados) e o grupo PMH apresentou atividade inguinal menor em relação ao grupo CH ($P < 0,05$, dados não mostrados). Sob condições subneutras não foi possível identificar diferença significante entre os grupos nos diferentes tipos de tratamento alimentar. Neste sentido, os filhotes de fêmeas pinealcetomizadas sem reposição terapêutica de melatonina durante gestação e lactação, recrutaram de maneira significante o tecido inguinal em condições basais de

temperatura, independemente do tipo de ração consumida e pode indicar que, não somente durante o envelhecimento, mas também em momentos mais precoces, essa conversa entre TAM interescapular e inguinal pode ocorrer e ser desencadeada por influenciadores desde o período gestacional.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu e contribuirá para elucidar a magnitude da capacidade de os eventos ambientais induzirem modulações metabólicas, moleculares e funcionais. A ausência de melatonina materna, indiretamente, pode ter influenciado na síntese e secreção da melatonina dos próprios descendentes, e ser, então, um importante gatilho para cronorruptura nesses animais, o que contempla um ciclo entre metabolismo e cronorruptura e exacerba a relação entre estes fatores.

O desenho experimental proposto é extremamente inovador, visto que não existem evidências na literatura sob as mesmas circunstâncias, e, portanto, servirá como iniciador para novos projetos; possibilitará o detalhamento de possíveis regulações, bem como a descrição circadiana dos parâmetros propostos; a investigação da expressão de genes relógio e sua correlação com a ausência de melatonina materna durante a gestação e lactação; a ritimicidade dos marcadores dos tecidos metabolicamente ativos, bem como os parâmetros funcionais analisados.

Foi possível concluir que o insulto provocado pela ausência materna de melatonina durante a gestação e lactação ou ainda, sua reposição terapêutica durante esses períodos de elevada susceptibilidade, influenciaram em diferentes magnitudes a maneira na qual parâmetros metabólicos e moleculares se comportaram e se correlacionaram às características funcionais.

A ausência de melatonina materna provocou aumento de ganho de peso corporal dos filhotes enquanto os mesmos foram amamentados e isso se estendeu até 7 dias após o desmame. O fato de os filhotes de mães pinealectomizadas com reposição terapêutica de melatonina apresentarem peso corporal semelhante aos filhotes de fêmeas controles (tanto no desmame quanto após 7 dias do desmame) e menor do que os filhotes de mães sem reposição terapêutica, apontam para o papel da melatonina.a materna na homeostase ponderal dos filhotes nessa fase de vida. Após essa fase, sob livre demanda alimentar, a ausência de melatonina materna parece não provocar alteração no peso corporal ao longo do tratamento (12 semanas), independentemente do tipo de ração consumida.

Considerando o fato de que ratos iniciam sua síntese de melatonina à partir da 4ª semana de vida, a melatonina é um importante regulador ponderal dos filhotes quando a única fonte de melatonina é de fonte materna, transferida por meio do leite (na amamentação), mas que, a partir do momento em que essa produção se torna autônoma e os filhotes são capazes de sintetizar e secretar sua própria melatonina, o controle ponderal é reajustado. Neste sentido é possível que a melatonina materna não influencie na programação ponderal dos

descendentes.

Por outro lado, ao considerar a homeostase glicêmica, a sensibilidade à insulina dos descendentes parece associar-se a uma programação intrauterina e/ou neonatal dependente da melatonina. Apesar de a sensibilidade à insulina ter sido menor nos filhotes de mães pinealectomizadas, a tolerância à glicose não se modificou, provavelmente devido à hiperinsulinemia, apesar de não medida, o que pode indicar que a capacidade pancreática de produção e de secreção de insulina ainda não tenha sido afetada pela ausência de melatonina materna. Ainda, a ineficiente homeostase glicêmica presente nesse animais podem inferir na síntese e secreção de sua própria melatonina pineal.

A ausência materna da melatonina parece não influenciar na expressão de genes lipogênicos e de transportadores de glicose do tipo 2 no tecido hepático e, também, não influenciou a expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo branco perigonadal. Entretanto, foi significante na reduzida expressão do RNAm para transportador de glicose do tipo 4, tanto em tecido adiposo branco perigonadal, quanto em tecido adiposo marrom interescapular, o que pode estar relacionado com a resistência à insulina demonstrada nos filhotes.

No tecido adiposo marrom interescapular, apesar de alguns marcadores termogênicos e de diferenciação celular estarem aumentados nos filhotes de fêmeas pinealectomizadas, o mesmo não se encontra funcionalmente eficiente, conforme observado nas análises de termografia. Além disso, esses animais tendem a perder calor com maior facilidade, visto que não foram capazes de termorregular pela cauda e parecem recrutar o tecido adiposo inguinal na tentativa de compensar a ineficiência do marrom interescapular.

REFERÊNCIAS

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

ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Liver glucose metabolism in humans. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 6, 2016.

ALONSO-VALE, M. I. C. et al. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 45, n. 4, p. 422–429, 2008.

AMARAL, F. G. DO et al. New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 293–300, 2019.

AMARAL, F. G. et al. Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 1, p. 67–79, 2014.

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

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

ARCHER, S. N. et al. Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 6, p. E682–E691, 2014.

ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman & Hall: [s.n.].

ARMSTRONG, S. M. Melatonin and circadian control in mammals. **Experientia**, v. 45, n. 10, p. 932–938, 1989.

BAE, J. et al. Activation of pattern recognition receptors in brown adipocytes induces inflammation and suppresses uncoupling protein 1 expression and mitochondrial respiration. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 306, n. 10, p. C918–C930, 2014.

BAMSHAD, M.; SONG, C. K.; BARTNESS, T. J. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 6, p. R1569–R1578, 2017.

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

BARJAVEL, M. J. et al. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes Differential Expression of the Melatonin Receptor in Human Monocytes This information is current as Marc J . Barjavel , Zahra Mamdouh , Nadjibe Raghbate and Ouahid Permissions Informatio. **The Journal of Immunology**, n. July, p. 1191–1197, 1998.

BARTEL, D. P. MicroRNAs：Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.pdf. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BARTNESS, T. J.; DEMAS, G.; SONG, C. K. Seasonal Changes in Adiposity : the Roles of the. **Exp Biol Med**, v. 227, n. 6, p. 363–376, 2002.

BELLAVÍA, S. L. et al. Pup circadian rhythm entrainment-effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. **Physiology and Behavior**, v. 89, n. 3, p. 342–349, 2006.

BELPIEDE, L. T. **No A expressão do GLUT4 no tecido adipose de camundongos varia de acordo com a sensibilidade à insulina durante o desenvolvimento da obesidade**. [s.l: s.n.].

BIDDINGER, S. B.; KAHN, C. R. FROM MICE TO MEN: Insights into the Insulin Resistance Syndromes. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 123–158, 2006.

BJÖRNHOLM, M.; ZIERATH, J. R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 2, p. 354–357, 2005.

BLASK, D. E. et al. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 11174–11184, 2005.

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

BORGES-SILVA, C. N. et al. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 178–184, 2005.

BOSTRÖM, P. et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012.

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

BRADY, M. J.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Spatial compartmentalization in the regulation of glucose metabolism by insulin. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 10, p. 408–413, 1999.

BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans. **New England Journal of Medicine**, n. 336, p. 186–195, 1997.

BUBENIK, G. A. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. **Biological Signals and recpetors**, v. 10, n. 6, p. 350–366, 2001.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological

Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.

CARDOSO ALONSO-VALE, M. I. et al. Pinealectomy Alters Adipose Tissue Adaptability to Fasting in Rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 53, n. 4, p. 500–506, 2004.

CARO, J. F. Insulin resistance in obese and nonobese man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 0021, n. 972X, p. 691–695, 1991.

CARVALHEIRA, J.; ZECCHIN, H. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, p. 419–425, 2002.

CECON, E.; LIU, L.; JOCKERS, R. Melatonin receptor structures shed new light on melatonin research. **Journal of Pineal Research**, v. 67, n. 4, p. 1–6, 2019.

CHANG, L.; CHIANG, S.-H.; SALTIEL, A. R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. **Molecular Medicine**, v. 10, n. 7–12, p. 65–71, 2004.

CHIEFARI, E. et al. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 40, n. 9, p. 899–909, 2017.

CHUFFA, L. G. DE A. et al. Melatonin promotes uterine and placental health: Potential molecular mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1–21, 2020.

CHUNG, S. T. et al. Measurements of gluconeogenesis and glycogenolysis: A methodological review. **Diabetes**, v. 64, n. 12, p. 3996–4010, 2015.

CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 4, p. 371–381, 2014.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472–479, 2018.

COHADE, C.; MOURTZIKOS, K. A.; WAHL, R. L. “USA-Fat”: prevalence is related to ambient outdoor temperature-evaluation with 18F-FDG PET/CT. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1267–70, 2003.

COMAI, S.; GOBBI, G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: A novel target in psychopharmacology. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 6–21, 2014.

CÔRREA-GIANNELA, M. L.; MACHADO, U. F. SLC2A4 gene: a promising target for pharmacogenomics of insulin resistance. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 8, p. 847–850, 2013.

COSTFORD, S.; GOWING, A.; HARPER, M.-E. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. **Obesity Reviews**, v. 2, n. 4, p. 255–265, 2001.

CYPESS, A. M. et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans A BS TR AC T. **N Engl J Med**, v. 360, p. 1509–1526, 2009.

DEENEY, J. T.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Metabolic control of β-cell function. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 4, p. 267–275, 2000.

DENTIN, R.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. **Biochimie**, v. 87, n. 1 SPEC. ISS., p. 81–86, 2005.

DIAZ, B.; BLAZQUEZ, E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. **Hormone and Metabolic Research**, v. 18, n. 4, p. 225–229, 1986.

DRĂGOI, C. M. Insights Into Chrononutrition: the Innermost Interplay Amongst Nutrition, Metabolism and the Circadian Clock, in the Context of Epigenetic Reprogramming. **Farmacia**, v. 67, n. 4, p. 557–571, 2019.

DRAKE, A. J.; WALKER, B. R.; SECKL, J. R. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. R34–R38, 2005.

DUBOCOVICH, M. L. et al. Nomenclature , Classification , and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. **Pharmocological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 343–380, 2010.

ECKEL-MAHAN, K. L. et al. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: Implications for memory persistence. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 1074–1082, 2008.

EL-DEEN, R. M.; HEEBA, G. H. Comparative effectiveness of amelioration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver in rats. p. 1–12, 2019.

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

FERREIRA, D. S. et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 743–751, 2012a.

FERREIRA, D. S. et al. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012b.

FRASCHINI, F. et al. Correspondence and short communications melatonin and immunity. **Acta Oncologica**, v. 29, n. 6, p. 775, 1990.

FROMME, T.; KLINGENSPOR, M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 1, p. R1–R8, 2011.

GANONG, W. F. **Fisiologia Médica**. 22 ed ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

GAO, M. et al. Concurrent Activation of Liver X Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Exacerbates Hepatic Steatosis in High Fat Diet-Induced Obese Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013.

GERSTNER, J. R. et al. Cycling Behavior and Memory Formation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 41, p. 12824–12830, 2009.

GIBSON, T.; JARRETT, J. Diurnal variation in insulin sensitivity. **The Lancet**, v. 300, n. 7784, p. 947–948, 1972.

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

GOLOZOUBOVA, VALERIA; HOHTOLA, E.; MATTHIAS, A.; JACOBSSON, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. **The FASEB Journal**, v. 15, p. 2048–2050, 2001.

GOMEZ, F. J. V. et al. Monitoring melatonin and its isomer in Vitis vinifera cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 3, p. 349–355, 2012.

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

GOSH, G. et al. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression. Of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. **Journal of Pineal Research**, v. 42, p. 71–82, 2007.

GUERRERO, J. M.; POZO, D. in the Enhanced IL-6 Production by Melatonin in U937 Cells. **Biological Signals and Receptors**, v. 9, p. 197–202, 2000.

GUETHER, B. et al. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 271, n. 2, p. 246–252, 1996.

GUILLEMAIN, G. et al. The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 5, p. 841–847, 2000.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, 2001.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409–2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- (alpha): Direct. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–92, 1993.

HUANG, Z.; LIU, T.; BORJIGIN, J. N-terminal residues regulate proteasomal degradation of AANAT. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 3, p. 290–296, 2010.

IYNEDJIAN, P. B. et al. Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 1966–1973, 1995.

JAMES, D. E. .; BURLEIGH, K. M. .; KRAEGEN, E. W. Time dependence of insulin action in muscle and adiposse tissue in the rat in vivo: An increasing response in adipose tissue with

time. **Diabetes**, v. 34, n. OCTOBER 1985, p. 1049–1054, 1985.

JANSKÝ, L. Non-Shivering Thermogenesis and Its Thermoregulatory Significance. **Biological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 85–132, 1973.

JENNI, O. G. et al. **Blue Blocker Glasses as a Countermeasure for Alerting Effects of Evening Light-Emitting Diode Screen Exposure in Male TeenagersJournal of Adolescent Health**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2014.08.002>

KAHN, C. . The molecular mechanism of insulin action. **Annu. Rev. Med**, v. 36, p. 429–451, 1985.

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

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

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocrine Journal**, v. 53, n. 3, p. 267–293, 2006.

KARASEK, M. Does melatonin play a role in aging processes? **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. SUPPL. 6, p. 105–113, 2007.

KASUGA, M. .; KARLSSON, F. A. .; KAHN, C. R. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 185–187, 1982.

KENNAWAY, D. J.; GOBLE, F. C.; STAMP, G. E. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 1525–1532, 1996.

KIM, S. J. et al. Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 3, p. 462–469, 2015.

KLEIN, D. C. Evidence for the placental transfer of 3 H-acetylmelatonin. **Nature: New Biology**, v. 237, p. 117–118, 1972.

KLEIN, D. C. et al. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 4, p. 365–373, 2002.

KLEIN, D. C.; BERG, G. R.; WELLER, J. Melatonin synthesis: adenosine 3’, 5’-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. **Sciences**, v. 168, p. 979–980, 1970.

KOIVISTO, V. A.; PELKONEN, R.; CANTELL, K. Effect of interferon on glucose tolerance and insulin sensitivy. **Diabetes**, v. 38, n. 5, p. 641–647, 1989.

KONTUREK, S. J. et al. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased Gastrointestinal Tract (GIT). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. 3,

p. 381–405, 2007.

KWAK, S. H. et al. A genome-wide association study of gestational diabetes mellitus in Korean women. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 531–541, 2012.

LAU, C.; ROGERS, J. M. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 72, n. 4, p. 300–312, 2004.

LEAN, M. E. J. et al. Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. **Clinical Science**, v. 71, n. 3, p. 291–297, 1986.

LEJA-SZPAK, A. et al. Melatonin stimulates HSP27 phosphorylation in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. SUPPL. 3, p. 177–188, 2007.

LIANG, X. et al. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–12, 2016.

LIANG, X. et al. Maternal MTNR1B genotype , maternal gestational weight gain , and childhood obesity. **Original Research Communication**, p. 1–9, 2019.

LIMA, F. B.; CURI, R. Moléculas ativas produzidas por órgãos não endócrinos. In: KOOGAN, G. (Ed.). . **AIRES, M. M. Fisiologia**. 3. ed ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 1139–1156.

LIMA, F. B. et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 275, n. 6 38-6, 1998.

LIMA, F. B. et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 275, n. 6, p. E934–E941, 2017.

LOCKIE, S. et al. Brown adipose tissue thermogenesis in the resistance to and reversal of obesity: A potential new mechanism contributing to the metabolic benefits of proglucagon-derived peptides. **Adipocyte**, v. 2, n. 4, p. 196–200, 2013.

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

LU, T. X.; ROTHENBERG, M. E. Diagnostic, functional, and therapeutic roles of microRNA in allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 1, p. 3–13, 2013.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, I.; SAITO, M. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. **Physiology and Behavior**, v. 55, n. 4, p. 621–625, 1994.

MADRIGAL-MATUTE, J.; CUERVO, A. M. Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. **Gastroenterology**, v. 150, n. 2, p. 328–339, 2016.

MAICKEL, R. P. . et al. Antagonism of physostigmine induced hypothermia and neurocrine chenges followuing exposure to different environmental temperatures. v. 15, p. 873–884, 1991.

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

MCDEVITT, R. M. et al. De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 6, p. 737–746, 2001.

MCKINLEY, M. J. et al. Circumventricular organs: Neuroeondocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. **Frontiers Neuroendocrinology**, v. 11, n. 2, p. 91–127, 1990.

MENDES, C. **Melatonina e termorregulação**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

MESSNER, M. et al. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. **Life Sciences**, v. 69, n. 5, p. 543–551, 2001.

MICHAEL, M. D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Molecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 87–97, 2000.

MIGLIORI, M. L. et al. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the nematode Caenorhabditis Elegans. **Journal of Pineal Research**, v. 53, n. 1, p. 38–46, 2012.

MILLER, A. M. et al. MiR-155 Has a Protective Role in the Development of Non-Alcoholic Hepatosteatosis in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

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

MONTILLA, P. L. et al. Protective role of melatonin and retinol palmitate in oxidative stress and hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 2, p. 86–93, 1998.

MORRIS, C. J. et al. Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans. **PNAS**, v. 13, p. E2225–E2234, 2015.

MÖSSENBÖCK, K. et al. Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

MOTTA-TEIXEIRA, L. C. et al. The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. **Hormones and Behavior**, v. 105, n. September, p. 146–156, 2018.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 3, p. 713–725, 1994.

NAGASHIMA, K. . et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Autonomic**

Neuroscience: Basic and Clinical, v. 85, n. 1–3, p. 18–25, 2000.

NEBAIHI, H. M. AL et al. Dietary-induced obesity, hepatic cytochrome P450 and lidocaine metabolism: Comparative effects of high-fat diets in mice and rats and reversibility of effects with normalization of diet. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2019.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 2, p. E444–E452, 2007.

NEHME, P. A. et al. Reduced melatonin synthesis in pregnant night workers: Metabolic implications for offspring. **Medical Hypotheses**, v. 132, n. August, p. 1–5, 2019a.

NEHME, P. A. et al. Melatonin profiles during the third trimester of pregnancy and health status in the offspring among day and night workers: A case series. **Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms**, v. 6, n. March, p. 70–76, 2019b.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l: s.n.].

NELSON, K. A.; WALSH, D.; SHEEHAN, F. A. The cancer anorexia- cachexia syndrome. **Journal of Clinic Oncology**, v. 12, n. 1, p. 213–225, 1994.

NISA, H. et al. The Circadian Rhythm-Related MTNR1B Genotype, Gestational Weight Gain, and Postpartum Glycemic Changes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 6, p. 2284–2290, 2018.

NISHIDA, S. et al. Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. **Journal of Pineal Research**, v. 35, n. 4, p. 251–256, 2003.

NOGUEIRA, T. C. et al. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1253–1263, 2011.

NOV, O. et al. Interleukin-1β Regulates Fat-Liver Crosstalk in Obesity by Auto-Paracrine Modulation of Adipose Tissue Inflammation and Expandability. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

OKATANI, Y. et al. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 3, p. 129–134, 1998.

OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; KANEDA, C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 2, p. 89–96, 2000.

OLSON, A. L. Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. **ISRN Molecular Biology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

PAN, D. et al. MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–12, 2014.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **FEBS Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813–2838, 2006.

PARDRIDGE, W. M.; MIETUS, L. J. Transport of Albumin-bound Melatonin Through the Blood-Brain Barrier. **Journal of Neurochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1761–1763, 1980.

PARK, ET AL. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 33, 2014.

PERRY, R. J. et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 84–91, 2014.

PICINATO, M. C. et al. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 1, p. 88–94, 2008.

PICKUP, J. C. et al. Diabetologia association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. p. 1286–1292, 1997.

RAMÍREZ, C. M. et al. MicroRNA 33 Regulates Glucose Metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 15, p. 2891–2902, 2013.

REA, S.; JAMES, D. E. Moving GLUT4: The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1667–1677, 1997.

REITER, R. J. Melatonin: The chemical expression of darkness. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 79, n. 1–3, 1991.

REITER, R. J. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. **European Journal of Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 412–420, 1996.

REITER, R. J. et al. Melatonin tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 467, p. 379–387, 1999.

REITER, R. J. et al. Melatonin and Tryptophan Derivatives as Free Radical Scavengers and Antioxidants. v. 1991, p. 379–387, 2011.

REITER, R. J. et al. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 293–307, 2014.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: Cloning and classification of subtypes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 3, p. 100–102, 1996.

ROBERTS. Afternoon glucose tolerance testing: a key to the pathogenesis, early diagnosis and prognosis of diabetogenic hyperinsulinism. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 12, n. 5, p. 423–472, 1864.

ROMAN, S. et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. **Translational Research**, v. 165, n. 4, p. 464–479, 2015.

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

2667–2679, 2002.

ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L. Role of leptin in energy homeostasis in humans. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 1, p. T83–T96, 2014.

ROSENFELD, A.; WELLER, A. Behavioral effects of environmental enrichment during gestation in WKY and Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 245–255, 2012.

ROSENWALD, M.; WOLFRUM, C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. **Adipocyte**, v. 3, n. 1, p. 4–9, 2014.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Influence of noradrenaline on blood flow to brown adipose tissue in rats. **European Journal of Physiology**, v. 242, n. 3, p. 237–242, 1981.

SAAD, A. et al. Diurnal Pattern to Insulin Secretion and Insulin Action in Healthy Individuals. **Diabetes**, v. 61, p. 2691–2700, 2012.

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

SCHENKER, S. et al. Antioxidant transport by the human placenta. **Clinical Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 159–167, 1998.

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

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

SEALE, P. Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2369–2375, 2015.

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

SEALS, D. R.; BELL, C. Perspectives in diabetes: chronic sympathethi activation. consequence and cause of age-associated obesity. **Diabetes**, v. 53, n. February, p. 276–284, 2004.

SELL, H.; DESHAIES, Y.; RICHARD, D. The brown adipocyte: Update on its metabolic role. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 11, p. 2098–2104, 2004.

SERAPHIM, P. M. et al. Quantification of GLUT4 transporter in insulin-sensitive tissues from pinealectomized rats. **Pineal Update**, p. 99–106, 1997.

SERON-FERRE, M. et al. Impact of maternal melatonin suppression on amount and functionality of brown adipose tissue (BAT) in the newborn sheep. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. DEC, p. 1–11, 2014.

SHIEH, J. M. et al. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCζ-Akt-GSK3β pathway in hepatic cells. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 4, p. 339–344, 2009.

SMALL, L. et al. Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet : what have high-fat and high-calorie diets revealed ? 2020.

STEHLE, J. H. et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 17–43, 2011.

STENVERS, D. J. Circadian clocks and insulin resistance. **Nature Reviews Endocrinology**, 2018.

STOCK, M. J. Thermogenesis and brown fat: relevance to human obesity. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 282–284, 1989.

STOCK, R. &. A role for dietary induced thermogenesis. **Nature**, 1979.

STUDY, H. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, n. 3, p. 255.e1-255.e7, 2010.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 3, p. 266–269, 2018.

TAN, D. et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 2002.

TAN, D. X. et al. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: Relation to human obesity. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 3, p. 167–188, 2011.

TAPPY, L.; JÉQUIER, E.; SCHNEITER, P. Autoregulation of Glucose Production. **News in Physiological Science**, v. 15, p. 198–2002, 2000.

THORENS, B.; CHARRON, M. J.; LODISH, H. F. Molecular physiology of glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 209–218, 1990.

TOKER, A.; MARMIROLI, S. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. **Advances in Biological Regulation**, v. 55, p. 28–38, 2014.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 99–104, 2005.

TORRES-FARFAN, C. et al. Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4618–4626, 2006.

TOZZO, E.; GNUDI, L.; KAHN, B. B. Amelioration of insulin resistance in streptozotocin diabetic mice by transgenic overexpression of GLUT4 driven by an adipose-specific promoter. **Endocrinology**, v. 138, n. 4, p. 1604–1611, 1997.

TRAN, T. T.; KAHN, C. R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: Role in metabolism and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, n. 4, p. 195–213, 2010.

TRICOIRE, H. et al. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. **Journal of reproduction and fertility-Supplement,** v. 61, p. 311–321, 2003.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1500–1508, 2009.

VERMOUTH, N. T. . et al. Maternal coordination of the daily rhythm of malate dehydrogenase activity in testes from young rats: effect of maternal sympathetic denervation of the pineal gland and administration of melatonin. **Chronobiology Internal**, v. 12, p. 8–18, 1995.

VIRTANEN, ET AL. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1518–1525, 2009.

WANG, Q. et al. Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2015.

WARDZALA, L. J.; CUSHMAN, S. W. .; SALANS, L. B. Mechanism of Insulin Action on Glucose Transport in the Isolated Rat Adipose Cell. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 22, p. 8002–8005, 1978.

WILKINSON, D.; SHEPHERD, E.; EUAN, M. W. Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. n. 3, 2016.

WOLDEN-HANSON, T. et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 487–497, 2000.

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

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

XU, L. et al. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1563–1579, 2015.

YIFU QIU, K. D. N. J. I. O. et al. Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292–1308, 2014.

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

YU, L.; SCHAAD, N. C.; KLEIN, D. C. Calcium Potentiates Cyclic AMP Stimulation of Pineal Arylalkylamine N-Acetyltransferase. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 4, p.

1436–1443, 1993.

YUDKIN, J. S. et al. C-reative protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 972–978, 1999.

ZANQUETTA, M. M. et al. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **Journal of Pineal Research**, v. 35, n. 3, p. 141–148, 2003.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 1994.