

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



GUSTAVO FACCHINI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA SOBRE
O METABOLISMO ENERGÉTICO E FOSFORILAÇÃO DE
PROTEÍNAS SINALIZADORAS NO HIPOTÁLAMO DE
RATOS NEONATOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GUSTAVO FACCHINI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Gustavo Facchini".

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

F118e

Facchini, Gustavo

Efeitos da administração de melatonina sobre metabolismo energético e fosforilação de proteínas sinalizadoras no hipotálamo de ratos neonatos / Gustavo Facchini. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Francesco Langone.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Melatonina. 2. Metabolismo energético. 3. Ratos neonatos. 4. Hipotálamo - Fisiologia. I. Langone, Francesco, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Effects of melatonin administration on energy metabolism and protein phosphorylation in the hypothalamus of neonatal rats.

Palavras-chave em inglês: Melatonin; Energy metabolism; Neonate rats; Hypothalamus - Physiology.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Fábio Rogério, Alba Regina Monteiro Souza Brito.

Data da defesa: 03/07/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

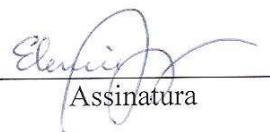
Campinas, 03 de Julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador – In Memoriam)

Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari




Assinatura

Dr. Fábio Rogério



Assinatura

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Assinatura

Profa. Dra. Claudia Herrera Tambelli

Assinatura

Ao Professor Francesco Langone,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus pela vida e pela saúde.

Agradeço à minha esposa Larissa por sempre estar ao meu lado durante esse período, pelo seu companheirismo, carinho, amor, pela paciência e, sobretudo por acreditar e apoiar meus sonhos. Te amo.

Agradeço, em especial, ao meu filho Luca, pelo olhar e sorriso de inocência que me confortam todos os dias. Te amo.

Agradeço a meus pais, Maria Elena e Wagner pelo irrestrito apoio, presença, carinho e dedicação durante todas as etapas de minha vida. Serão sempre o exemplo que seguirei.

Agradeço ao professor Francesco Langone pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e por sua sempre constante e essencial orientação em meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço aos Professores Carlso Amilcar Parada, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari e Alba Regina Monteiro Souza Brito pelo conforto e apoio nos momentos de tristeza.

Agradeço aos professores Antônio Carlos Boschero, Everardo Magalhães Carneiro, Helena C. de Oliveira e Carla Roberta de Oliveira Carvalho pelas participações na elaboração e execução deste projeto.

Agradeço aos colegas de laboratório Alexandre, André, César, Fábio, Carlos, Priscila, Raffaella, Karina, Janice, Maria Claudia, Dionéia, Elaine, Fernando, Fipo, Peterson e Sabrina pela amizade, convivência, companheirismo e apoio ao longo destes dois anos!

Agradeço especialmente ao André por me apresentar o mundo do “Western Blot”.

A minha querida amiga Andressa por toda a ajuda, pela amizade fantástica, por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e sofrimento e por ser um exemplo de superação.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas por minha formação acadêmica e por estabelecer um ambiente de constante estímulo e apoio à pesquisa científica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido através de bolsa de mestrado, o qual foi imprescindível para o desenvolvimento desta dissertação.

*“Viste como levantaram aquele edifício de
grandeza imponente? - Um tijolo, e outro.
Milhares. Mas, um a um. - E sacos de cimento, um
a um. E blocos de pedra, que são bem pouco ante
a mole do conjunto. - E pedaços de ferro. - E
operários trabalhando, dia após dia, as mesmas
horas...*

*Viste como levantaram aquele edifício de grandeza
imponente?... À força de pequenas coisas!”*

São Josemaría Escrivá

INDÍCE

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Abreviaturas.....	xi
1- Introdução.....	1
2 - Objetivos.....	13
3 - Resultados.....	14
4 - Discussão.....	20
5 - Conclusões.....	35
7 - Bibliografia.....	36
8 - Anexo.....	57

RESUMO

A melatonina (MLT) é um neurohormônio presente em humanos e outros vertebrados, sendo a glândula pineal principal fonte produtora. Além de sua conhecida ação cronobiológica, a MLT tem papel regulador sobre o metabolismo energético e sobre a massa corporal de mamíferos. A presença de receptores para MLT nos núcleos hipotalâmicos dorso-medial, supraquiasmático, paraventricular do hipotálamo desde a fase embrionária, corrobora a mediação da MLT no controle neural do metabolismo. Dentro deste contexto o presente trabalho avaliou os efeitos da administração de MLT sobre a evolução ponderal e os níveis plasmáticos de glicose, triglicérides, colesterol, ácido graxo livre e insulina. Também foram investigados os efeitos da MLT sobre a fosforilação da AKT e ERK1/2 no hipotálamo de ratos neonatos. Neste estudo foram utilizados ratos neonatos com dois dias de vida (P2) que receberam doses diárias de MLT (1, 10, 50 e 100 mg/kg, s.c.; n=10) e/ou luzindole, antagonista não seletivo da MLT (1 mg/kg, s.c.; n=10). Os animais foram tratados por seis dias e sacrificados 24 horas após a última dose (P8). Três grupos adicionais foram utilizados, dois deles receberam apenas os veículos de diluição da melatonina (n=10) ou luzindole (n=10). O terceiro foi formado por animais não tratados (n=10). Imediatamente após o sacrifício foi coletado sangue para as dosagens plasmáticas, sendo realizada também a dissecação do hipotálamo. Os hipotálamos foram processados para análise por Western Blot (WB) das formas fosforiladas e não fosforiladas das proteínas AKT e ERK1/2. A evolução ponderal dos animais tratados com veículo de diluição foi semelhante ao dos animais sem tratamento. Contrariamente, todos os grupos tratados com MLT e com MLT+LZD apresentaram redução da evolução ponderal ao longo do tempo. A análise da fosforilação de proteínas no hipotálamo mostrou que todos os grupos tratados com MLT exibiram aumento da fosforilação da AKT. Por sua vez, a administração conjunta de MLT e LZD fez com que o valor de pAKT se assemelhasse os grupos controles. Os animais que receberam 10 mg/kg de MLT apresentaram aumento significativo da pERK1/2 quando comparado aos grupos controles. Entretanto, a administração de MLT+LZD tornou os valores de pERK1/2 similares aos valores dos animais controles. As dosagens plasmáticas mostraram que a MLT não alterou valores de colesterol, mas modificou as concentrações de glicose, triglicérides, ácido graxo livre e insulina. Por outro lado, os grupos tratados com o veículo de diluição do LZD apresentaram aumento dos valores de colesterol e diminuição de triglicérides e ácido graxo livre. Nossos dados mostram pela primeira vez que doses farmacológicas de melatonina produzem alterações metabólicas em ratos neonatos e que tais efeitos podem ser consequência de sua ação periférica e central.

ABSTRACT

Melatonin (MLT) is a neurohormone present in human and other vertebrates, the pineal gland being its main source. In addition to its known chronobiological action, MLT has a regulatory role on energy metabolism and body mass of mammals. The presence of receptors for MLT in dorso-medial, supraquiasmaic and paraventricular hypothalamic nuclei since embryonic stage, speaks in favor of MLT as a mediator of neural control of metabolism. In this study we used newborn rats with two days of life (P2) who received daily doses of MLT (1, 10, 50 and 100 mg/kg, sc, n = 10) and / or luzindol (LZD; non-selective antagonist of MLT, 1 mg/kg, sc, n = 10). Animals were treated for six days and sacrificed 24 hours after the last dose (P8). Two additional groups received only the vehicle of dilution of melatonin (n = 10) or luzindol (n = 10). Another group was composed of animals not treated pharmacologically (n = 10). Body weight was recorded daily. At the end of treatment rats were killed by decapitation and blood was collected for plasma glucose (GLI), total cholesterol (COL), free triglycerides (TG), free fatty acid (FFA) and insulin (INS) determination. The hypothalamus was also dissected and processed for analysis by Western Blot (WB) of phosphorylated AKT and ERK1/2. The body weight of animals treated with vehicle was similar to that of untreated animals. Conversely, all groups treated with MLT and MLT + LZD showed reduced body weight over time. Analysis of protein phosphorylation in the hypothalamus showed that all groups treated with MLT had increased AKT phosphorylation. Rats that received MLT and LZD had pAKT levels similar to control rats. Animals that received 10 mg / kg of MLT showed significant increase in pERK1/2 compared to control groups. However, rats that received MLT + LZD had pERK1/2 levels similar to control rats. MLT did not alter plasmatic COL, but modified the GLI, TG, AGL and INS plasmatic levels. Moreover, groups treated with vehicle for dilution of LZD showed increase in COL and decrease of TG and FFA. Our data show for the first time that pharmacological doses of melatonin produces metabolic changes in newborn rats and that this effect may be a consequence of its peripheral and central actions.

ABREVIATURAS

AGL - Ácidos graxos livres

AKT - Proteína quinase B (PKB)

AMP - Monofosfato de adenosina

AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA - Análise de variância

ATP - Trifosfato de adenosina

Bad - Antagonista da Bcl2

BSA - Albumina de soro bovina

CoA - coenzima A

COL - Colesterol Livre

DM - núcleo dorso-medial

DMSO -Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ERK1/2 - Proteína quinase reguladora de sinais extracelulares, isoformas 1 e 2

Família AGC - Proteínas kinases que controlam o crescimento celular

Gi/Go - Subunidades inibitórias da proteína G

GLI - Glicose

Glut4 - Transportador de glicose 4

Grb2 - Proteína ligadora de receptores para fatores de crescimento

I κ B - Proteína kinase inibitória κ B

INS - Insulina

IP3 - 1,4,5 Inositol trisfosfato

IR - Receptor de insulina

IRS-1 - Substrato do receptor de insulina-1

K_{ATP} - Canal de potássio dependente de ATP

LZD - Luzindole

MEK - Quinase regulada por metiletilcetona-mitogénio

MLT - Melatonina

MT1 - Receptor de Melatonina 1

MT2 - Receptor de Melatonina 2
MT3 - Receptor de Melatonina 3
NF- κ B - Fator nuclear κ B
NMDA - Receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico (glutamato)/Aspartato
PB - Tampão Fosfato
PBS - Tampão Fosfato Salina
PI3K - Fosfoinositol-3 quinase
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PTB - Sítio de ligação de fosfotirosinas
PV - Núcleo paraventricular
Raf - Serina-treonina proteinoquinase
Ras - Transdutor de sinal extracelular
SC - Núcleo Supraquiasmático
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
SH2 - Domínio 2 homólogo a Src
SHC - Proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo SH2
SNC - Sistema Nervoso Central
SOD1 - Superóxido dismutase, isoforma 1
Sos - Fator de ativador da Ras
Src - Oncogene originalmente definido como produto do sarcoma do vírus Rous
TG - Triglicérides livres

1 - INTRODUÇÃO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina; MLT) é considerada um neurohormônio produzido em humanos e em outros animais vertebrados. A glândula pineal é sua principal fonte produtora, mas também pode ser sintetizada por outros tecidos tais como a retina, intestino e leucócitos mononucleares (Huelter et al., 1992; Huether, 1993; Finocchiaro e Glikin, 1998; Reiter, 1998). Sua concentração plasmática pode variar entre 10 e 400 pM, sendo mais alta no período noturno; sua meia vida na circulação humana é de aproximadamente 10 minutos e em ratos 17 minutos (Klein, 1974; Gibbs FP & Vriend J, 1981). O precursor da MLT é o aminoácido triptofano, que é inicialmente transformado em 5-hidroxitriptofano (5HTP), pela ação da triptofano-5-hidroxilase e, subseqüentemente, em serotonina (5-HT) pela 5-HTP-descarboxilase. Após acetilação da serotonina, pela N-acetiltransferase com subseqüente metilação da N-acetilserotonina pela hidroxiindol-O-metiltransferase (HIOMT), forma-se a N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina (Klein, 1974). Uma vez formada, ela se difunde para os capilares sangüíneos e para o líquido cefalorraquidiano e, por ser lipofílica, é capaz de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (Martín et al., 2006; Pandi-Perumal et al., 2006). A metabolização é realizada primariamente pelo fígado, onde é convertida em 6-hidroximelatonina e formil-N-acetil-5-metoxiquinureramine. No plexo coróide, e na própria pineal, a melatonina sofre a ação da indolamina 2,3 dioxigenase sendo transformada em L-kinuranina (Vanecek, 1998).

Em ratos a síntese de MLT pela pineal se inicia ao redor dos 10 dias de idade, de tal forma que nos animais neonatos esse hormônio é fornecido através do aleitamento materno (Weinberg, 1981). Situação semelhante parece ocorrer em humanos, os quais apresentam

níveis sanguíneos de melatonina muito baixos durante os três primeiros meses de vida. Acredita-se que o suprimento desta através do aleitamento materno seja importante na interação do recém-nascido com a mãe e também com o ambiente extra-uterino (Muneoka et al., 2000).

Classicamente, este hormônio é conhecido por sua ação reguladora dos ritmos circadianos do organismo, sincronizando-os com o ciclo externo de dia/noite, e por seu efeito inibitório sobre a maturação gonadal (Cassone et al., 1993; Fraschini et al., 1995). Tais ações são mediadas pela interação da melatonina com receptores específicos, denominados MT1 e MT2, localizados na membrana celular e associados às subunidades inibitória da proteína Gi/Go (Witt-Enderby et al., 2003; Dubocovich e Markowska, 2005). A ativação destes receptores promove redução dos níveis de AMP cíclico através da inibição da enzima adenilil ciclase. A estrutura molecular destes receptores é conhecida e os mesmos já foram clonados. Na última década foram obtidas evidências de que a melatonina poderia ligar-se a moléculas intracelulares para exercer outras ações importantes, dentre estas, encontram-se a isoforma da enzima quinona redutase 2, denominada como sítio de ligação citoplasmático MT3.

Dentre as ações da melatonina mais recentemente descobertas destacam-se aquelas derivadas da sua atividade antioxidante (Reiter et al., 2000; Hardeland et al., 2006; Pandi-Perumal et al., 2006). Considera-se que, pelo fato de ser altamente lipofílica, a melatonina possa exercer tal atividade de maneira irrestrita ao nível intracelular, ou seja, tanto no núcleo quanto no citosol (Costa et al., 1995; Finnochiario e Glikin, 1998). Além disso, existem evidências de que a melatonina possa atuar diretamente como antioxidante ao interagir com radicais livres inativando-os ou, de forma indireta, ao modulando a atividade

e/ou expressão de moléculas produtoras de espécies reativas ou de integrantes do sistema antioxidante celular (Reiter et al., 2000; Mayo et al., 2002; Rodriguez et al., 2004; Rogério et al., 2005).

A capacidade antioxidante da melatonina tem estimulado a investigação do seu possível emprego farmacológico no tratamento de doenças neurodegenerativas, bem como agente neuroprotetor após lesões vasculares e traumáticas no sistema nervoso central e periférico (Rogério et al., 2002; Pei e Cheung, 2004; Lee et al., 2005; Mayo et al., 2005; Weishaupt et al., 2006). Contudo, é interessante notar que os efeitos antioxidantes e neuroprotetores da melatonina são observados, na maioria dos casos, quando administrada em concentrações expressivamente superiores às fisiológicas (10-400 pM), ou seja, entre 1 μ M e 100 mM (Barrenetxe et al., 2004; Rogério et al., 2005).

Seguindo esta linha de investigação, verificamos em nosso laboratório que o tratamento de ratos neonatos (P2) com melatonina, nas doses de 1, 5 e 10 μ g/g/dia (s.c.), protegeu a população de neurônios motores axotomizados pela secção do nervo ciático (Rogério et al., 2002). Observamos também que este efeito pode ser devido à ação antioxidante indireta da melatonina ao estimular a expressão da superóxido dismutase CuZn (SOD1) (Rogério et al., 2005, 2006). Em paralelo a estas observações constatamos também que a administração de altas doses de melatonina (50 e 100 μ g/g/dia) reduziu o ganho de peso dos animais durante a fase de tratamento, isto é, da idade P2 a P7; além disso, este efeito foi significativamente mais intenso nos animais que receberam 100 μ g/g/dia, ocorrendo morte de 80% dos animais após 4 dias de tratamento (Rogério et al., 2002).

Recentemente, além de confirmarmos esses resultados verificamos que a melatonina administrada a ratos neonatos durante 7 dias (P2-P8), nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/g/dia}$, modificou significativamente o perfil das concentrações de glicose, triglicérides e ácidos graxos ao longo do tempo de tratamento. Por outro lado, não houve alteração significativa na concentração plasmática de colesterol quando comparada à dos animais controle (Facchini et al., 2006). É relevante referir que tais efeitos parecem não estar relacionados com alterações no consumo de dieta, pois todos os animais apresentavam o estômago preenchido por alimento durante todo período de sobrevivência (dado não publicado).

A literatura reporta que a melatonina tem papel regulador sobre o metabolismo energético e sobre a massa corporal de mamíferos (Delagrangue e Jockers, 2003). Tal ação é particularmente evidenciada nos animais que hibernam, cujo metabolismo é afetado de maneira intensa pelas mudanças sazonais (Bartness et al., 2002). Contudo, uma crescente quantidade de dados tem reforçado a hipótese de que a melatonina também exerce relevante papel na homeostase energética de animais não hibernantes (Vanecek, 1998). Embora não se conheçam os mecanismos envolvidos nessa regulação, diversas evidências sugerem que tais mecanismos dependam da interação da melatonina com seus receptores de membrana distribuídos no sistema nervoso central (SNC) e em tecidos periféricos (Vanecek, 1998; Drew et al., 2001).

A presença de receptores da melatonina no SNC, especialmente no hipotálamo, fala a favor de mediação da melatonina no controle neural do metabolismo (Drew et al. 2001). É interessante notar que esses receptores estão presentes no SNC desde a fase embrionária (Weaver et al. 1989). No hipotálamo encontram-se núcleos diretamente comprometidos no controle da ingestão alimentar e do balanço energético (Elmqvist et al. 1999; Kalra et al.

1999, Williams et al., 2001). Dentre estes, o núcleo dorso-medial e supraquiasmático possuem neurônios que expressam receptores para melatonina (Weaver et al. 1989; Vanecek, 1998; Drew et al., 2001). Além disso, neurônios do núcleo dorso-medial e do núcleo supraquiasmático, classicamente reconhecidos como alvos da melatonina projetam para o núcleo paraventricular, que é o maior centro integrador da regulação do metabolismo energético no hipotálamo (Weaver et al. 1989; Kalra et al. 1999; Morgan e Mercer, 2001). Paralelamente, existem evidências de que o núcleo supraquiasmático poderia influenciar indiretamente a atividade de tecidos periféricos através da via simpática (Song e Bartness, 2001). Segundo esta hipótese, o núcleo supraquiasmático participaria na regulação da lipólise no tecido adiposo branco e da termogênese no tecido adiposo marrom, além de estimular a liberação de adrenalina pela medula da adrenal. Ainda dentro deste contexto, interessante estudo de Anhe et al. (2004) mostrou que a melatonina é capaz de induzir a rápida ativação do receptor de insulina no hipotálamo de ratos através de sua interação com o receptor MT2. Anhe et al. (2004) também observaram que a melatonina foi capaz de induzir a ativação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) no hipotálamo de ratos, fenômeno este confirmado recentemente por Ha et al. (2006). Embora não se conheça o mecanismo pelo qual este receptor dispara a fosforilação da tirosina do receptor de insulina (IR), já que não possui atividade tirosina quinase intrínseca, este achado é uma evidência importante do entrelaçamento da ação da melatonina com a ação da insulina no SNC direcionada para o controle do metabolismo energético.

O IR fosforilado induz o recrutamento de proteínas que contêm domínios SH2 e PTB, como o IRS-1 e a SHC, que por sua vez recrutam proteínas efetoras (van der Heide et al., 2006). A ativação do IRS-1 pode representar uma convergência das vias estimuladas

pela insulina e pela melatonina, portanto, uma provável ligação entre ambos os hormônios no controle do peso corporal e no metabolismo de carboidratos (Anhê et al., 2004). As proteínas alvo da SHC são a Grb2 e Sos, as quais recrutam a Ras na membrana plasmática, levando à ativação seqüencial de Raf, MEK e ERK1/2. Uma rota alternativa para a ativação da ERK1/2 ocorre pelo recrutamento da Grb2 pela IRS-1, aumentando a complexidade do sistema (Anhê et al., 2004; van der Heide et al., 2006).

Dentre as proteínas efetoras do IRS-1, está a fosfoinositol-3 quinase (PI3K), a qual ativa a quinase de serina/treonina AKT, recrutando-a para a membrana plasmática. Uma vez ativada, esta proteína desliga-se da membrana plasmática e transloca-se para o citosol e núcleo, onde fosforila resíduos de serina ou treonina em proteínas-alvo (van der Heide et al., 2006).

Estudos demonstram que a AKT também pode fosforilar a Raf, inativando-a através de um processo que provavelmente depende da via insulina-PI3K. Acredita-se que a insulina utiliza esta interligação entre a AKT e a Raf como mecanismo adicional para promover a sobrevivência neuronal (van der Heide et al., 2006). A AKT, um membro da família AGC, é estruturalmente relacionada às proteínas quinase A (PKA) e C (PKC), possuindo três isoformas amplamente expressas: AKT1, AKT2 e AKT3. Uma vez ativada, a AKT protege contra estímulos apoptóticos ao fosforilar proteínas da maquinaria apoptótica, como a Bad, a caspase 9, a quinase I κ B, reguladora do NF- κ B e a ERK1/2; e evita a apoptose neuronal ao impedir a atividade transcricional da p53 (van der Heide et al., 2006).

Outro substrato ativado pela PI3K é a PKC, da qual foram identificadas 12 isoformas em mamíferos (Sampson et al., 2006). Uma vez ativadas, elas podem se

translocar para o núcleo e participar da regulação transcricional (Ross et al., 1998). A atividade da PI3K, estimulada por insulina, pode ativar também algumas isoformas da PKC que participam na retroalimentação negativa no IRS-1. É interessante notar que através de sua interação com o receptor MT2, a melatonina é capaz de regular o ritmo basal da atividade da PKC de neurônios do núcleo supraquiasmático *in vitro* e *in vivo* (Rivera-Bermúdez et al., 2003).

Anhê et al. (2004) demonstraram que a melatonina induz as associações entre IRS-1/PI3K e IRS-1/SHP-2 e a fosforilação *in vivo* da Akt e da ERK1/2 no hipotálamo de ratos. A ERK1/2 está envolvida com a morte celular por excitotoxicidade mediada pelo receptor NMDA, tendo sua atividade contrabalanceada por fosfatases específicas, que podem ser induzidas por glucocorticóides, óxido nítrico e insulina (van der Heide et al, 2006). Uma vez que a via PI3K é ativada para induzir sobrevivência, há um grande contraste com o potencial papel da insulina na regulação da morte celular mediada pela ERK1/2. No entanto, pode haver certas exceções, pois tem sido relatado que a insulina potencializa a morte celular dependente do receptor NMDA, ao invés de evitá-la. Este processo torna-se ainda mais complicado porque as vias PI3K e ERK1/2 podem interagir, embora isto não pareça ocorrer em todos os tipos celulares, podendo depender do estado de diferenciação celular (van der Heide e cols., 2006).

Contudo, há um substancial conjunto de evidências a favor da existência de receptores de melatonina nos tecidos periféricos, especialmente naqueles envolvidos na homeostase energética (Drew et al. 2001; Delagrange e Jockers, 2003). A expressão de receptores para melatonina foi observada em diversos tipos celulares relevantes dentro

deste contexto, tais como células β do pâncreas, hepatócitos e adipócitos (Poon et al., 2001).

Em células β pancreáticas de ratos neonatos e em células INS-1 de isulinona de rato foi detectada a presença de um subtipo do receptor MT1 associado a uma proteína Gi (Kemp et al., 2002). Interessantemente, concentrações fisiológicas de melatonina foram capazes de reduzir o aumento de AMPc e a secreção de insulina por células INS-1 de isulinoma de rato quando estimuladas por glucagon e por forskolina (Kemp et al., 2002; Peschke et al., 2002). Efeito semelhante foi observado por Picinato et al. (2002) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos adultos normais. Estes autores observaram que a melatonina inibiu a secreção de insulina estimulada por glicose e diminuiu o conteúdo de PKA nas ilhotas sem modificar o metabolismo da glicose nesse tecido.

Poon et al. (2001) detectaram um subtipo do receptor MT2 em hepatócitos isolados de camundongos adultos e mostraram que administração intraperitoneal de melatonina nesses animais, nas doses de 4 a 40 $\mu\text{g/g}$ de peso, aumentou a glicemia de maneira dose dependente. Esta alcançou o valor máximo 1 hora após o tratamento e retornou aos valores basais após 2 horas. Estes autores sugeriram que tal efeito se deveu a uma ação direta da melatonina sobre os hepatócitos e que a elevação da glicemia, por sua vez, deve afetar a interação melatonina-receptor.

Heldmaier e Hoffmann (1974) mostraram, pela primeira vez, que a administração de melatonina estimulou o crescimento da gordura marrom em hamster, independentemente do ciclo claro-escuro no qual foram mantidos. A partir de então, vários trabalhos obtiveram evidências de uma ação direta da melatonina sobre os adipócitos (Delagrange e Jockers, 2003). Receptores de melatonina foram detectados em adipócitos de gordura branca e

marrom, de humanos e roedores (Le Gouic et al., 1997; Brydon et al. (2001). Uma importante evidência da participação destes receptores sobre a fisiologia dos adipócitos e no metabolismo energético foi a descoberta de que a melatonina diminuiu a transcrição geral do genoma mitocondrial, e particularmente do gene do citocromo C, em adipócitos de gordura marrom de hamster (Prunet et al. 2001). Neste mesmo sentido, Brydon et al., (2001) verificaram também que a melatonina inibiu a expressão do mRNA para o transportador de glicose Glut4 em adipócitos da linhagem PAZ6 de gordura marrom humana. Além disso, o tratamento prolongado destas células reduziu a expressão do Glut4 e a captação da glicose. Considerando o importante papel do Glut4 de células musculares e adipócitos no transporte de glicose dependente de insulina (Abel et al., 2001), tem sido sugerido que a melatonina participaria na homeostase da glicose através da sua ação sobre tecido adiposo (de Lima et al., 2001; Prunet et al., 2001). Contudo, os dados reportados na literatura sobre tal ação são controversos. Lima et al. (1998) mostram que ratos pinealectomizados, apresentaram alteração no ritmo circadiano de secreção da insulina, menor tolerância à glicose e redução da expressão de Glut4 em adipócitos de gordura branca epididimal quando comparados com ratos controle. Por outro lado, Bizot-Espiard et al. (1998) verificaram que a administração aguda do antagonista da melatonina S-20304, ou a pinealectomia em ratos não alterou a glicemia basal e a concentração plasmática de insulina, bem como a produção de glicose pelo fígado e seu consumo pelos tecidos.

Outros experimentos *in vivo* realizados para investigar o papel da melatonina no metabolismo energético mostraram que quando fornecida na água (4 µg/mL) consumida por ratos de meia-idade (10 meses) durante 12 meses é capaz de reduzir o acúmulo de gordura visceral que ocorre com a idade (Rasmussen et al., 1999, Wolden-Hanson et al.,

2000). Por sua vez, Prunet-Maracassus et al. (2003) verificaram que a melatonina administrada por gavagem (30 mg/kg) durante 3 semanas reduziu o ganho de peso em ratos adultos jovens que receberam dieta rica em lipídeos, sem alterar a ingestão. Estes mesmos autores observaram também que esses animais tiveram redução no volume de tecido adiposo marrom interescapular e das concentrações plasmáticas de glicose, triglicérides e leptina. Ainda, a complexa ação da melatonina no metabolismo foi evidenciada também por Fabis et al. (2002) ao verificarem que a administração aguda de melatonina (1 mg/kg; s.c.) em ratos adultos elevou a secreção de insulina e as concentrações plasmáticas de glicose, ácidos graxos livres, triglicérides e colesterol.

É interessante notar que a grande maioria dos estudos *in vivo* sobre o papel da melatonina no metabolismo energético foi realizada com animais adultos ou adultos jovens. Além disso, com exceção dos dados obtidos em nosso laboratório (Rogério et al., 2002; Facchini et al., 2006) e daqueles publicados por Jahnke et al. (1999) sobre a toxicidade da melatonina em ratas prenhas, não existem outros dados na literatura sobre os efeitos de altas doses de melatonina especialmente em animais neonatos.

Por sua vez, Jahnke et al. (1999) reportaram não terem observado efeitos tóxicos nos embriões e fetos quando doses de 50, 100 ou 200 mg/kg de melatonina foram administradas por gavagem entre o 6^o e o 19^o dia de gestação. Toxicidade moderada foi verificada nas ratas que receberam doses de 200 mg/kg, as quais exibiram uma transiente redução na ingesta alimentar e no ganho de peso corporal. Embora na avaliação toxicológica tenham sido considerados parâmetros importantes, tais como as concentrações de hormônios gestacionais, a histologia das glândulas mamárias e a ocorrência de

malformações nos filhotes, não foram investigadas possíveis alterações metabólicas ou comportamentais.

Muneoka et al. (2000) verificaram que uma única dose 100 µg de melatonina (s.c.) em ratos com idade P5 afetou o desenvolvimento do sistema serotoninérgico em regiões extra-hipotalâmicas, particularmente no estriado e hipocampo. Segundo esses autores, os animais que receberam melatonina na idade P5 apresentaram significativa elevação do conteúdo do ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA) no hipocampo na idade de 3 semanas e da serotonina (5-HT) no estriado nas idades de 10 e 42 semanas. Até onde pudemos averiguar, não foram publicados estudos posteriores, de natureza morfológica, bioquímica ou comportamental que corroborem os dados de Muneoka et al. (2000).

Dentro deste contexto, as observações realizadas nos últimos anos em nosso laboratório suscitaram questões, que consideramos relevantes, sobre os efeitos da administração de melatonina durante o período pós-natal. Ou seja, além do necessário aprofundamento na investigação dos mecanismos pelos quais a melatonina em altas doses afeta o metabolismo energético e crescimento corporal, consideramos importante procurar responder, por exemplo, se esses efeitos seriam reversíveis uma vez cessada sua administração. E ainda, quais seriam as conseqüências desse tratamento sobre o comportamento, uma vez que a administração é realizada durante o período crítico de estabelecimento, morfológico e funcional, de diversos sistemas neurais desses animais?

2 - OBJETIVOS

Geral

- Contribuir com o melhor conhecimento das ações fisiológicas, farmacológicas e toxicológicas da melatonina, especialmente no organismo em desenvolvimento.

Específicos

- Avaliar os efeitos da melatonina sobre a evolução ponderal e os níveis plasmáticos de glicose, triglicérides, colesterol, ácido graxo livre e secreção de insulina,
- Analisar os efeitos produzidos pela melatonina sobre a fosforilação da AKT e ERK1/2 no hipotálamo de ratos neonatos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais, grupos experimentais e tratamento

Ratas Wistar com filhotes de 1 dia de vida (P1) foram adquiridas do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) e alojadas em estante ventilada para ratos (Alesco, Mod. 9902.001) sob condições controladas de umidade (50%), temperatura (21°C) e luz, com 12 horas de claro/escuro. O ciclo de luz foi invertido em relação ao ambiente externo para que os animais pudessem ser manipulados sempre durante a sua fase de atividade. Desta forma, fase de escuro foi iniciada às 6 horas e a fase de claro às 18 horas. As ratas tiveram livre acesso à água e ração (Nuvital CR1, Colombo, Brasil), composta por 23% de proteína, 4,5% de gordura total, 33% carboidratos e 21% de fibra, num total de 263 Kcal/100 g, conforme análise do ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil). Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA) e aprovadas pelo comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo 509-1).

Os filhotes foram divididos em grupos de acordo com o tratamento que receberam como mostra a Tabela 1. O tratamento foi iniciado no segundo dia de vida (P2) e continuou por mais cinco dias com doses diárias (s.c.) de melatonina (MLT) e/ou luzindole (LZD; antagonista não seletivo da MLT), ou com os veículos de diluição destas substâncias (MV e LV, respectivamente). Os animais foram sacrificados 24 horas após a última dose, portanto com oito dias de vida (P8). Também foi constituído um grupo de filhotes que não recebeu nenhum tipo de tratamento farmacológico (ST), mas que foram manipulados diariamente e

sacrificados na idade P8 de forma semelhante aos animais dos demais grupos. Após as manipulações diárias os animais retornaram imediatamente à mãe tendo livre acesso a amamentação durante todo o experimento.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos conforme tratamento

DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTOS								
Tratamento	MLT 1mg/kg	MLT 10mg/kg	MLT 50mg/kg	MLT 100mg/kg	MLT 10mg/g + LZD 1mg/kg	Veículo MLT	Veículo LZD	Sem Tratamento
Idade e Período de Tratamento	P2-P7	P2-P7	P2-P7	P2-P7	P2-P7	P2-P7	P2-P7	P2-P7
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10

As doses de MLT (Sigma M-5250) foram preparadas 1 hora antes da sua administração, dissolvendo-se a mesma em solução de 5% etanol absoluto:salina (v:v) (Kim et al., 1998). As doses de 1, 10, 50 e 100 mg/kg de MLT (grupos: M1, M10, M50 e M100, respectivamente) foram determinadas considerando-se os dados da literatura sobre a farmacodinâmica e farmacocinética da MLT em ratos neonatos (Weinberg, 1981) e de observações prévias realizadas no nosso laboratório (Rogério et al., 2002; Facchini et al., 2006).

As doses de LZD (Sigma L-2407) foram também preparadas 1 hora antes sua administração, dissolvendo-se esse composto em solução de DMSO:salina (1:50; v:v), conforme instruções do fabricante. Foi administrada a dose de 1 mg/kg (s.c.) 10 minutos após o tratamento com MLT 10 mg/kg (grupo: M10+L1). Segundo nosso conhecimento, a literatura reporta poucos dados sobre o tratamento de ratos neonatos com LZD. Em virtude

disto, decidimos pelo uso de doses de LZD correspondentes a 10% da dose de melatonina empregada. Esta proporção é a mais comumente utilizada em estudos com ratos adultos (Drago et al., 1999; Micale et al., 2006). O tratamento dos animais foi realizado sempre no mesmo horário, entre 13 e 14 horas.

3.2 - Registro do peso corporal e dosagens plasmáticas

O peso corporal de todos os animais foi registrado diariamente, utilizando balança digital (Marte - AS500C). A evolução ponderal dos mesmos corresponde ao cociente entre o peso corporal registrado em cada uma das idades consideradas e do peso corporal do animal na idade P2. Após o tempo de tratamento estabelecido para cada lote de animais, os mesmos foram sacrificados por decapitação para coleta do sangue. Este foi recolhido em capilares heparinizados para subsequente dosagem de glicose (GLI) triglicérides livres (TG), colesterol (COL), ácidos graxos livres (AGL) e insulina (INS).

As amostras foram imediatamente submetidas à centrifugação (Eppendorf - 5804R) durante o período de 15 minutos a velocidade de 12.000g e temperatura de 4°C. O plasma de cada animal foi armazenado até o final do experimento à temperatura de -80°C.

A glicemia foi dosada utilizando-se kit de ensaio enzimático colorimétrico (LABORLAB®; São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e adaptando-o para utilização de microamostras em placas de ELISA. Para estes testes foram empregadas alíquotas de 10 µL de plasma e de 200 µL dos reagentes.

A concentração plasmática de COL foi determinada utilizando-se kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Roche/Hitachi®;

Indianapolis, USA). O método baseia-se na hidrólise dos ésteres de colesterol, pela colesterol esterase, formando colesterol que, por sua vez, é oxidado formando colest-4-en-3-one e peróxido de hidrogênio. Em presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e 4-clorofenol formando um produto de cor avermelhada (reação de Trinder). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 492 nm e a concentração plasmática de COL determinada com base em curva padrão.

Os valores plasmáticos de TG foram determinados através de kit de ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Roche/Hitachi®; Indianapolis, USA). A hidrólise do TG pela lipoproteína lipase formando glicerol, que por sua vez é oxidado formando fosfato de dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio é o princípio no qual baseia-se o método. Em presença de peroxidase, o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e 4-clorofenol formando um produto de cor avermelhada (reação de Trinder). As amostras foram lidas em espectrofotômetro em 492 nm e a concentração plasmática de TG determinada com base em curva padrão.

A concentração de AGL plasmáticos foi determinada através de um kit de ensaio enzimático colorimétrico, de acordo com as instruções do fabricante (Wako®; Richmond, USA). Os AGL, em presença de ATP, coenzima A (CoA) e acil-CoA-sintetase formam ésteres tiois CoA (Acil-CoA), que são oxidados pela Acil-CoA oxidase gerando peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, em presença de peroxidase permite a condensação oxidativa do B-hidroxietil anilina com 4-aminoanfipirina produzindo um composto de cor púrpura. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 550 nm e a concentração plasmática de AGL determinada com base em curva padrão.

A concentração plasmática de INS foi determinada por radioimunoensaio adaptado de Scott et al. (1981). Utilizando-se alíquotas de 0,1 mL das amostras de plasma e 0,2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina humana recombinante marcada com I₁₂₅ em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. A concentração de insulina foi determinada com base em uma curva padrão de insulina de rato com concentrações conhecidas (0,025 até 5,0 ng/mL). Após um período de incubação de 48h, todos os tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão ativado, 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70 em tampão fosfato. Os tubos foram agitados e deixados em repouso durante 20 min; a seguir, foram centrifugados por 20 min (2800 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado enquanto a radioatividade do precipitado foi medida em contador de radiação gama.

3.3 - Análise da fosforilação das proteínas AKT e ERK1/2 por Western blot

Imediatamente após decapitação, o cérebro dos animais foi removido da caixa craniana, sob condições resfriadas com gelo picado, para cuidadosa dissecação do hipotálamo. Estes espécimes foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados à temperatura de -80°C. O procedimento de dissecação do hipotálamo foi previamente padronizado, através da análise histológica, a fim de assegurar que a região de interesse tivesse sido adequadamente removida.

Os fragmentos de hipotálamo foram homogeneizadas em tampão de extração (1% SDS, 50 mM PB pH 7,4, 5% β-mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 1% coquetel inibidor de protease, 10mM ortovanadato de sódio, 10 mM fluoreto de sódio, 10 mM pirofosfato de

sódio) em um Sonic Dismembrator (Modelo 500, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, E.U.A.) com dois pulsos de 5 segundos e amplitude de 12%. Alíquotas contendo 25 µg (AKT) e 50 µg (ERK1/2) de proteínas totais foram submetidas à SDS-PAGE. As proteínas contidas no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com tampão de bloqueio (5% leite desnatado em pó, 50 mM PB, pH 7,4, 150 mM NaCl [PBS-tween+leite desnatado]) por 2 horas e subseqüentemente incubada com anticorpo anti-AKT, anti-pAKT, anti-ERK1/2, anti-pERK1/2(Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou anti- α -tubulina (Sigma, EUA) diluído em PBS-tween+3%BSA (1:500) “overnight” a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então lavada por 15min com solução PBS-tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax – Zymed Laboratories) diluída 1:10000 em 10ml de tampão de bloqueio, por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma nova lavagem com PBS-tween e as bandas imunorreativas foram detectadas por autoradiografia em um filme Kodak GBX2 utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce, EUA).

A densidade óptica das bandas imunorreativas foi determinada por densitometria óptica digital (Scion Image Software), sendo os valores obtidos expressos em relação às densidades ópticas das bandas de α -tubulina empregada como controle interno.

3.4 - Estatística

Os valores das concentrações plasmáticas de GLI, TG, COL, AGL, INS, e os valores das densidades ópticas das bandas imunorreativas obtidas com Western blot foram submetidos à ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls. A evolução ponderal dos animais por sua vez, foi submetida à ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste

de Bonferroni. Em ambos os casos o nível de significância $P < 0,05$ foi assumido como indicativo da presença de diferença estatística.

4 - RESULTADOS

4.1 - Evolução Ponderal

A avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o peso corporal dos animais foi expressa considerando-se a evolução ponderal (EP) dos mesmos, que correspondeu ao cociente entre o peso corporal registrado em cada uma das idades consideradas e do peso corporal do animal na idade P2 (Figura 1).

Assim, a EP dos animais tratados com os veículos de diluição (MV e LV) foi semelhante a dos animais sem tratamento farmacológico (ST) ($F_{2,162} = 2,18$; $P > 0,05$). Contrariamente, todos os grupos tratados com melatonina e com melatonina+luzindole (M10+L1) apresentaram redução da EP ao longo do tempo ($F_{7, 414} = 21,23$; $P < 0,0001$). Dentre estes, o grupo dos animais tratados com 100 mg/kg de melatonina (M100) exibiram acentuada queda da EP quando comparada a dos demais grupos ($F_{7, 483} = 87,66$; $P < 0,0001$). Vale notar que esse efeito já pôde ser observado no grupo M100 após a primeira dose. Assim, 24 horas após o início do experimento (P3) esses valores corresponderam a: M100=0,967±0,026; M50=1,185±0,026; M10=1,192±0,035; M10+L1=1,140±0,006; M1=1,111±0,014; MV=1,251±0,023; LV=1,146±0,026; ST=1,170±0,023 (Figura 1). Nos demais grupos que receberam melatonina, a queda na EP pôde ser registrada após o terceiro dia de tratamento. Desta forma, na idade P5, a EP dos grupos M1, M10 e M10+L1 e M50 foi respectivamente de (M1=1,430±0,021; M10=1,455±0,050; M10+L1=1,400±0,017; M50=1,487±0,021). Por sua vez, o grupo M100, embora tenha sempre apresentado EP inferior ao dos demais grupos, a partir da idade P5 apresentou ligeira recuperação da EP. Assim, ao final do experimento (P8) as EP dos diferentes grupos foram:

M100=1,688±0,077 (n=8), M50=1,914±0,056 (n=9), M10=2,105±0,051 (n=10), M10+L1=2,085±0,048 (n=10); M1=2,135±0,051 (n=10), MV=2,315±0,044 (n=10) LV=2,261±0,047 (n=10) e ST=2,324±0,045 (n=10).

É importante destacar que nos grupos M50 e M100 houve morte de animais a partir do quarto e quinto dia de tratamento, respectivamente. Ao final do experimento sobreviveram 90% animais dos grupos M50 e apenas 40% dos animais do grupo M100, sendo que o grupo M100 foi constituído por dois lotes distintos de 10 animais cada. Assim, o tratamento diário com MLT a partir de P2 modificou, significativamente, o desenvolvimento dos animais com redução na evolução ponderal.

4.2 - Dosagens Plasmáticas

As dosagens plasmáticas realizadas ao final dos experimentos (P8) (Tabela 2) mostraram que o valor do COL dos animais dos grupos tratados com MLT foi semelhante ao dos grupos controle MV e ST. Por outro lado, os grupos LV e M10+L1 apresentaram aumento dos valores de COL em relação aos demais grupos. Por sua vez, os valores de GLI foram menores nos grupos M50 e M100 quando comparados aos demais grupos ($P<0,05$). É importante destacar que administração de melatonina e luzindole conjuntamente (M10+L1) não modificou o valor da GLI quando comparado ao registrado no grupo M10 ($P>0,05$). A concentração plasmática de INS sofreu redução nos animais dos grupos M10, M50 e M100 quando comparada à dos demais grupos. Também foi observada redução dos TG nos grupos M10+L1, M50, M100 e LV ($P<0,05$). É interessante notar que a redução de TG foi acentuada nos M10+L1 e LV. Além disso, a redução de TG foi significativamente mais

intensa no grupo LV quando comparado com o grupo M10+L1. Ao mesmo tempo foi verificada a diminuição de AGL plasmático nos grupos M10, M10+L1, M50, M100 e LV quando comparado aos grupos ST e MV ($P < 0,05$). É importante verificar que a redução de AGL foi mais acentuada no grupo M10+L1 quando comparado com o grupo LV (Tabela 2).

4.3 - Análise da fosforilação das proteínas AKT e ERK1/2 por Western blot

A avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a fosforilação das proteínas AKT e ERK1/2 foi expressa como densidade óptica relativa a qual correspondeu, primeiramente, ao cociente entre a densidade óptica do grupo ST e a densidade óptica de cada um dos demais grupos. E, em seguida, ao cociente entre as formas fosforiladas e não fosforiladas das proteínas.

A análise da fosforilação de proteínas no hipotálamo mostrou que todos os grupos tratados com MLT exibiram aumento da fosforilação da AKT ($pAKT/AKT$: M1=1,338±0,075; M10=1,709±0,143; M50=1,644±0,147; M100=1,635±0,095) quando comparados ao grupo MV (1,014±0,012; $P < 0,05$; Figura 2). A relação $pAKT/AKT$ foi semelhante entre os grupos tratados com as diferentes doses de MLT utilizadas, embora essa relação no grupo M1 tenha se apresentado ligeiramente inferior à dos demais grupos M10, M50 e M100. Por sua vez, a administração conjunta de MLT e LZD (M10+L1) fez com que o valor de $pAKT/AKT$ (1,021±0,044) se assemelhasse aos valores observados nos animais dos grupos MV e LV (0,946±0,019; 0,962±0,034, respectivamente; $P > 0,05$; Figura 3).

Finalmente, a relação pERK1/2 / ERK1/2 não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados com 1, 50 e 100 mg/Kg de melatonina (M1= 1,184±0,086; M50=1,24±0,016; M100=1,09±0,035; P>0,05), quando comparada com a obtida no grupo MV (1,083±0,033; P>0,05; Figura 2). Contudo, o grupo M10 apresenta diferença significativa da relação pERK1/2 / ERK1/2 quando comparado ao grupo MV (M10= 1,316±0,06; MV= 1,083±0,033; P<0,05). Por sua vez, a administração conjunta de MLT e LZD (M10+L1), fez com que o grupo M10+L1 apresentasse valores de pERK1/2 semelhantes os grupos MV, LV (M10+L1=1,047±0,032; MV=1,006±0,053; LV=0,979±0,055; P>0,05; Figura 3) e valores inferiores a M10 (1,299±0,027; P<0,05; Figura 3).

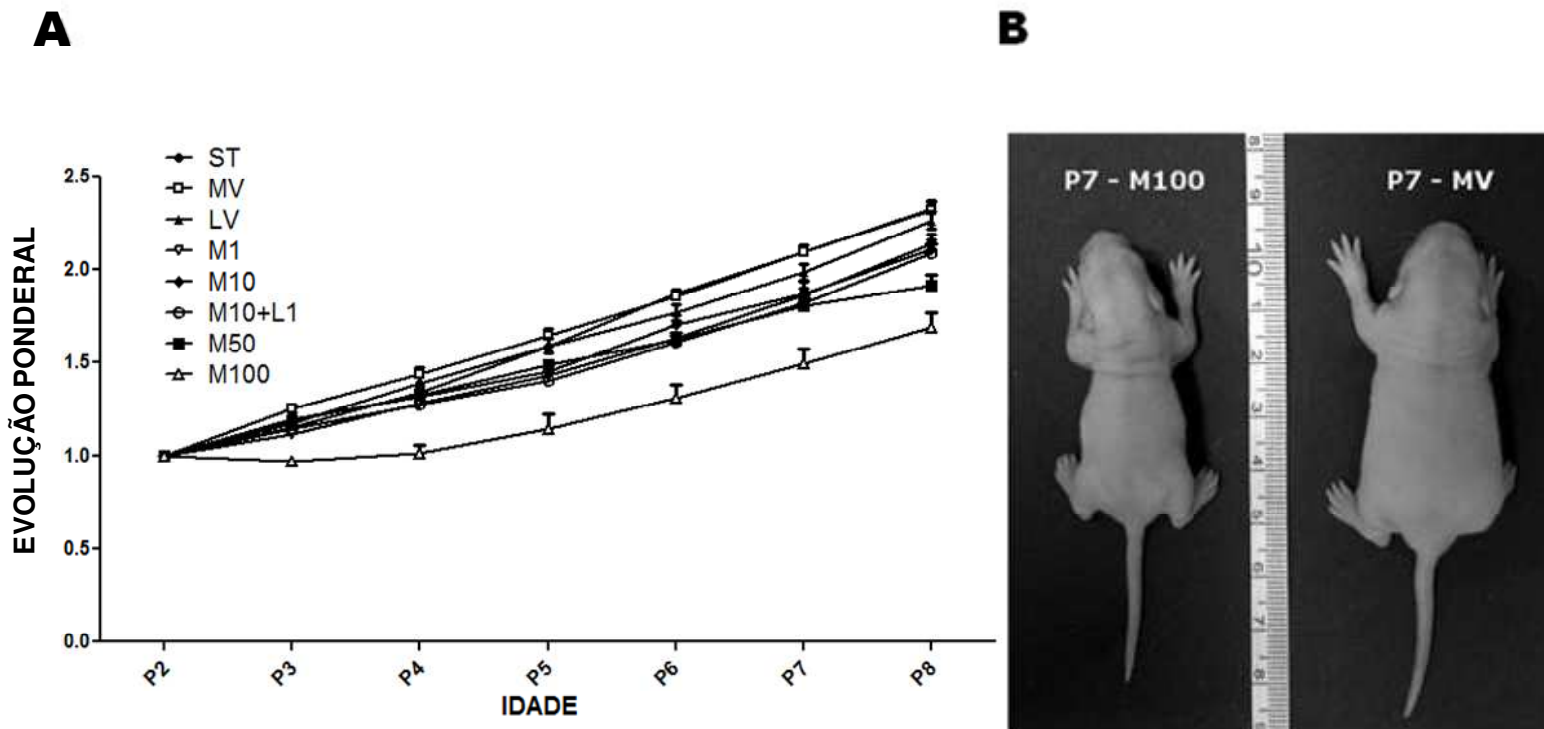


Figura 1. Efeito do tratamento com MLT sobre a evolução ponderal. A MLT foi administrada diariamente (s.c.) da idade P2 à idade P8 nas doses de 1 mg/kg (M1); 10 mg/kg, (M10), 50 mg/kg (M50) e 100 mg/kg (M100). Outro grupo de animais recebeu doses diárias de 10mg/kg de MLT associadas 1,0 mg/kg de LZD (M10+L1). Os grupos controle receberam doses diárias do veículo de diluição do LZD (LV), do veículo da MLT (MV) ou permaneceram sem tratamento algum (ST). A) A evolução ponderal dos animais corresponde ao valor do cociente obtido entre o peso corporal registrado em cada uma das idades consideradas e o peso corporal do animal na idade P2. Os valores foram expressos como média±e.p.m, os quais foram submetidos à ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni, assumido-se o nível de significância $P < 0,05$ (para as comparações vide texto). B) Animais com idade P7 tratados, respectivamente, com 100 mg/kg MLT e com o veículo de diluição da MLT.

Tabela 2 - Variação dos valores plasmáticos dos substratos energéticos e insulina.

Dosagens Plasmáticas								
Parâmetros Bioquímicos	Tratamentos							
	M1	M10	M10 + L1	M50	M100	MV	LV	ST
Glicose (mg/dl)	143,74 ± 4,83	136,60 ± 5,03	145,91 ± 4,0	119,73 ± 3,9*	107,12 ± 4,17*	140,01 ± 1,77	152,87 ± 5,02	143,21 ± 4,86
Triglicérides Livres (mg/dl)	115,23 ± 9,89	116,67 ± 3,29	92,55±4,6*	105,90 ± 4,49*	80,28 ± 4,78*	126,42 ± 6,74	53,79±3,1*	129,46 ± 10,84
Colesterol Total (mg/dl)	128,79 ± 4,31	125,32 ± 2,62	156,31±5,54*	122,70 ± 4,77	123,53 ± 3,63	125,19 ± 2,62	145,91±4,31*	125,19 ± 5,08
Ácido Graxo Livre (mmol/L)	0,865±0,071	0,502±0,012*	0,361±0,031*	0,525±0,029*	0,481±0,035*	0,948±0,034	0,533±0,055*	0,894±0,07
Insulina (ng/ml)	0,754 ± 0,049	0,570 ± 0,078*	0,903±0,077	0,542 ± 0,049*	0,438 ± 0,072*	0,969 ± 0,071	0,975±0,099	0,993 ± 0,120

Os valores correspondem a média\ e.p.m, os quais foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se o grau de significância para *p<0,05 vs ST.

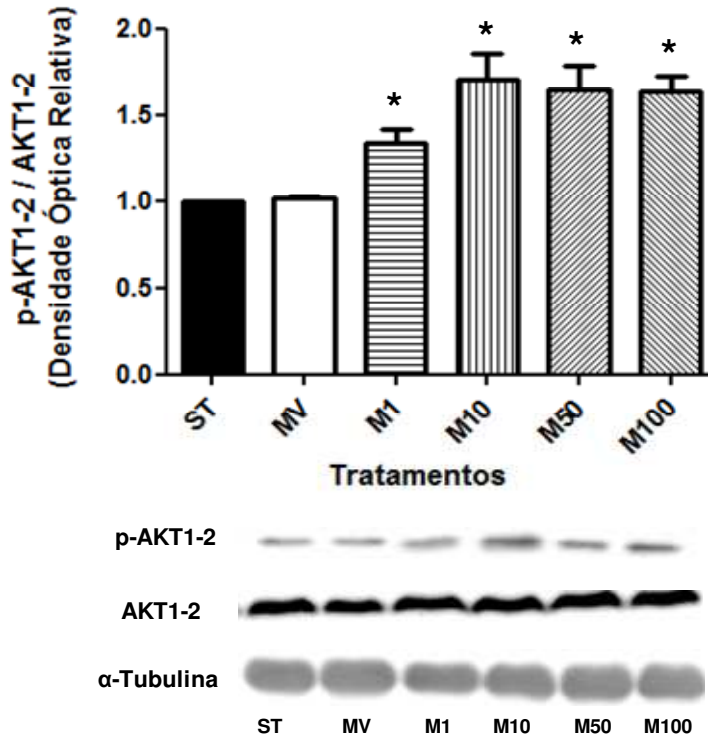
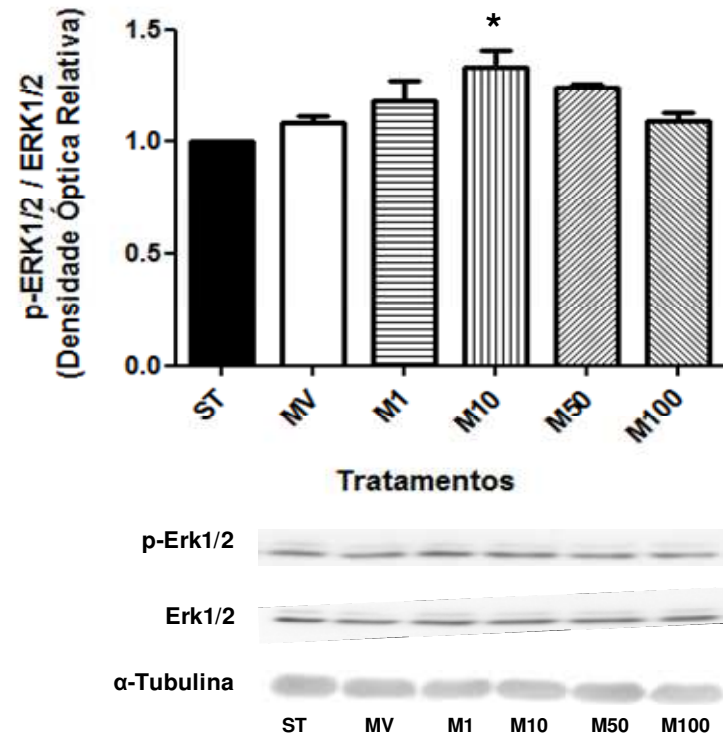
A**B**

Figura 2. Efeito do tratamento com MLT sobre a fosforilação da AKT1-2 e ERK1/2 no hipotálamo. A MLT foi administrada diariamente (s.c.) da idade P2 à idade P8 nas doses de 1mg/kg (M1); 10mg/kg, (M10), 50mg/kg (M50) e 100mg/kg (M100). Os grupos controles receberam doses diárias do veículo de diluição da MLT (MV) ou permaneceram sem tratamento (ST). Os valores correspondem à densidade óptica relativa à densidade óptica registrada no grupo ST. Os valores correspondem a média±e.p.m, os quais foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se o grau de significância para $p < 0,05$: A) Grupos M1, M10, M50, M100 apresentam significativa fosforilação da AKT quando comparados com os grupos MV (* $P < 0,05$); B) A MLT induziu um aumento da pERK1-2 / ERK1-2 no grupo M10 quando comparado ao grupo MV (* $P < 0,05$). Abaixo dos gráficos são apresentadas as bandas representativas para cada grupo (n=5).

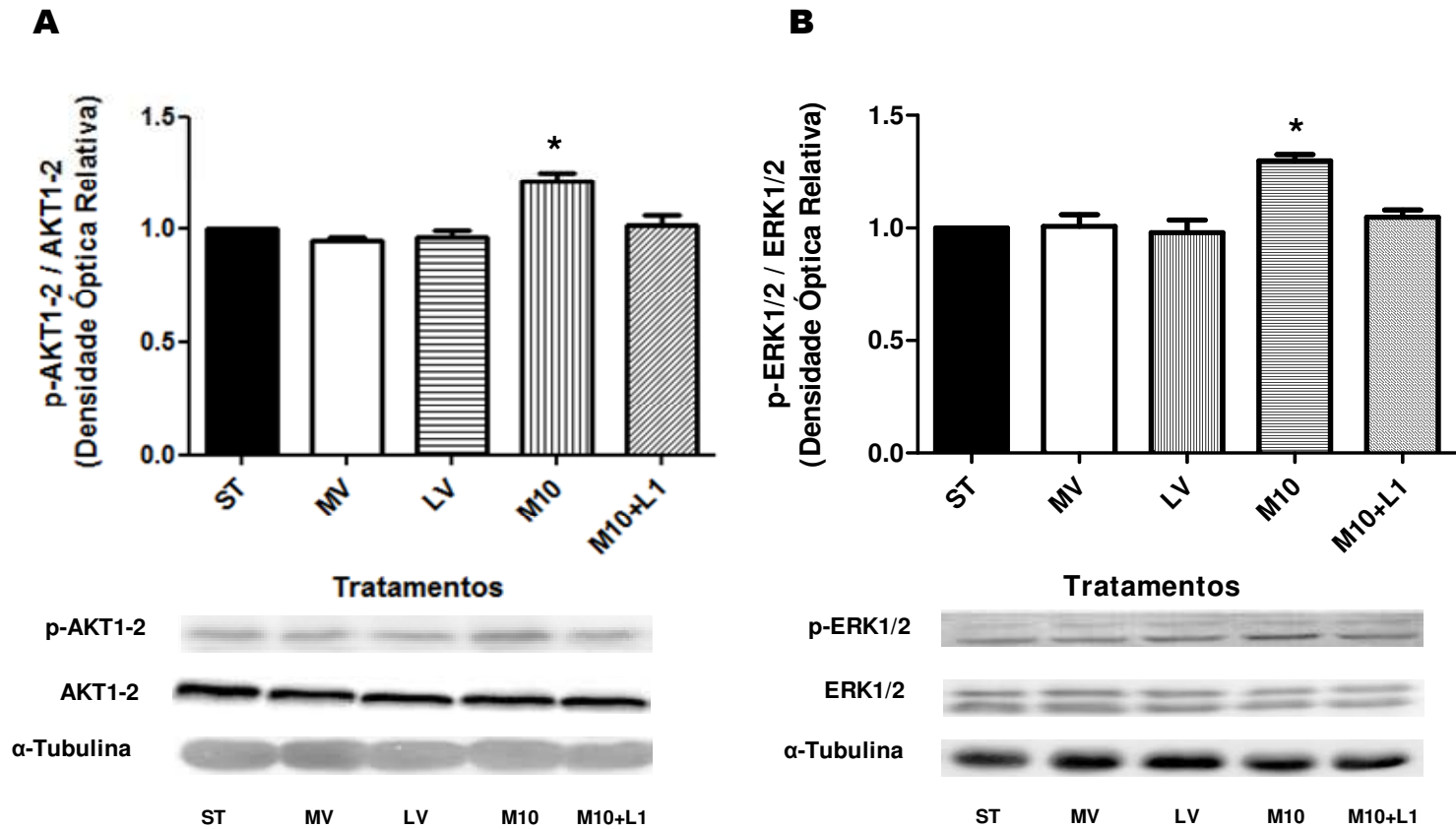


Figura 3. Efeito do tratamento com MLT sobre a fosforilação da AKT1-2 e ERK1/2. A MLT foi administrada diariamente (s.c.) da idade P2 à idade P8 na dose de 10mg/kg. Os grupos controle receberam doses diárias do veículo de diluição da MLT (MV) ou permaneceram sem tratamento (ST). Outro grupo de animais recebeu doses diárias de 10mg/kg de MLT associadas 1,0 mg/kg de LZD (M10+L1). Os valores correspondem à densidade óptica relativa à densidade óptica registrada no grupo ST. Os valores correspondem a média±e.p.m, os quais foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se o grau de significância para $p < 0,05$: A) Grupo M10 apresenta significativa fosforilação da AKT quando comparado com os grupos MV, LV, M10+L1 ($P < 0,05$); B) Grupo M10 apresenta significativo aumento pERK1/2 quando comparado com MV, LV e M10+L1 ($P < 0,05$). Abaixo dos gráficos são apresentadas as bandas representativas para cada grupo (n=5).

5 - DISCUSSÃO

A participação da melatonina (MLT) endógena no controle do metabolismo energético tem sido evidenciada nos últimos anos por diversos autores (Vanecek, 1998; Drew et al., 2001; Delagrange e Jockers, 2003). Contudo, poucos estudos foram realizados com a finalidade de se investigar o efeito da administração crônica de MLT sobre o metabolismo energético e o desenvolvimento, especialmente em animais jovens e recém nascidos (Wolden-Hanson et al., 2000). Neste contexto, o presente trabalho mostrou que a administração diária de doses farmacológicas de MLT em ratos durante a primeira semana de vida modifica o desenvolvimento, com alterações significativas das concentrações plasmáticas de substratos energéticos.

Inicialmente, nossos resultados confirmam observações prévias de Rogério et al. (2002) quando, ao investigarem o efeito neuroprotetor da MLT em ratos neonatos verificaram que, paralelamente à sua ação neuroprotetora, a administração diária desta produziu redução da evolução ponderal dos animais, particularmente naqueles que receberam doses de 50 e 100 mg/kg. Nossos dados ampliaram essas observações e revelam que mesmo os animais que receberam doses de 1 e 10mg/kg também exibiram queda no crescimento corporal ao final do tratamento (P8). Curiosamente, este efeito também esteve presente nos animais que receberam doses diárias de 10 mg/kg de MLT e de 1 mg/kg de luzindole (LZD), seu antagonista não seletivo. Embora as ações antagônicas do LZD e MLT tenham sido evidenciadas no efeito da MLT sobre a secreção de insulina e glicemia, este dado sugere que possivelmente as concentrações de LZD e MLT (1:10) não tenham sido suficientes para impedir a ação inibitória da MLT sobre peso corporal, especialmente

no que tange à sua ação periférica. Esta possibilidade parece receber apoio no fato de que a presença de LZD também não impediu que a MLT reduzisse as concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos livres. Por outro lado, é importante considerar que os animais tratados com o veículo de diluição do LZD (dimetil-sulfoxida 2% em solução salina – DMSO) também apresentaram diminuição de triglicérides e ácidos graxos livres, além de um aumento do colesterol plasmático. De fato, a literatura reporta que o DMSO é capaz de modificar esses substratos energéticos em ratos adultos (Debons et al., 1987). Desta forma, é possível supor que as propriedades do DMSO tenham sido responsáveis em parte pelas alterações do metabolismo lipídico observados nos ratos que receberam o veículo de diluição do LZD, não se podendo excluir também uma maior sensibilidade dos neonatos.

Quanto às causas da redução na evolução ponderal produzida pelo tratamento com MLT, também não podemos descartar a possibilidade da MLT ter exercido algum efeito sobre as concentrações de grelina, e/ou leptina, já que estas estão presentes nos ratos neonatos (Bruder et al., 2005). Não obstante a existência de controvérsia, vários autores mostraram que a MLT exógena causa redução dos níveis plasmáticos de grelina e aumento da leptina (Mustonen et al., 2001; Canpolat et al., 2006). Embora não tenhamos realizado a dosagem destas moléculas, a possibilidade da leptina ter atuado sobre seus alvos hipotalâmicos adquire particular relevância se considerarmos o intenso efeito produzido pela MLT na dose de 100 mg/kg sobre o crescimento dos animais 24 horas após a primeira dose. Além disso, neste grupo foi constatada morte de animais a partir do terceiro dia de tratamento, chegando a atingir 60% dos animais ao final do experimento. Por outro lado, e em concordância com diversos autores, nossos resultados mostram que a MLT promoveu a

inibição de secreção de insulina de maneira crescente com dose empregada (Peschke, 2008 para revisão; Picinato et al., 2008).

Nossos resultados mostram também que a MLT atuou sobre o hipotálamo modificando a fosforilação de proteínas de vias de sinalização ativadas pela insulina. A presença de receptores da melatonina no hipotálamo sugere que esta tenha um papel importante no controle neural do metabolismo (Drew et al. 2001). O que é corroborado pelo fato de que esses receptores começam a ser expressos nas regiões hipotalâmicas durante o desenvolvimento embrionário (Weaver et al. 1989). Dentre os grupamentos de neurônios hipotalâmicos que expressam receptores de melatonina e que estão diretamente comprometidos com os mecanismos de fome e saciedade e com o balanço energético, encontra-se o núcleo dorso-medial (Weaver et al. 1989; Vanecek, 1998; Elmquist et al. 1999; Kalra et al. 1999; Drew et al., 2001; Williams et al., 2001). Este núcleo projeta-se ao núcleo paraventricular, que é o maior centro integrador da regulação do metabolismo energético no hipotálamo (Weaver et al. 1989; Kalra et al. 1999; Morgan e Mercer, 2001). Paralelamente, existem evidências de que o núcleo supraquiasmático, classicamente reconhecido como alvo da melatonina - atue indiretamente sobre a fisiologia do tecido adiposo através vias simpáticas hipotalâmicas (Song e Bartness, 2001). Assim a melatonina poderia participar na regulação da lipólise no tecido adiposo branco e da termogênese no tecido adiposo marrom, mediadas pelo núcleo supraquiasmático.

Nossos resultados mostram que a administração de melatonina a ratos durante a primeira semana de vida modificou o perfil plasmático de diversos substratos energéticos. É interessante observar que o aumento da dose de melatonina foi acompanhado pela redução das concentrações plasmáticas de triglicérides e ácidos graxos livres. Fato similar

pôde ser observado para a glicemia, embora neste caso a redução foi significativa apenas nos animais tratados com 50 ou 100mg/kg de MLT.

Wolden-Hanson et al.(2000) observaram que ratos de meia-idade (10 meses) que receberam MLT dissolvida na água do bebedouro (4µg/ml) durante 12 semanas apresentaram redução do peso corporal e da quantidade de tecido adiposo intra-abdominal quando comparados aos animais controle. Recentemente Bojkovà et al. (2008), utilizando o mesmo modelo experimental, verificaram que a redução do peso corporal foi acompanhada pela redução da glicemia e da concentração plasmática de triglicérides. Considerando que a produção da MLT sofre redução com a idade, esses autores sugerem que a administração crônica de MLT tenha compensado essa redução. Conseqüentemente, a MLT pode ter intensificado o metabolismo energético desses animais, impedindo assim o natural aumento da quantidade de gordura abdominal e ganho de peso que ocorre com a idade. Embora, as condições fisiológicas e as exigências metabólicas dos ratos neonatos sejam diferentes dos ratos adultos, as observações de Wolden-Hanson et al.(2000) e Bojkovà et al. (2008) reforçam a hipótese do papel regulador da MLT sobre o metabolismo energético e dão suporte aos nossos dados. Além disso, é interessante destacar que Wolden-Hanson et al. (2000) registram redução da concentração de insulina plasmática nos ratos adultos, fato que observamos nos ratos neonatos.

A insulina é um hormônio produzido pelas células β do pâncreas e é considerado o principal responsável pelo controle metabólico entre o estado de jejum e o estado alimentado (Flier, 2004). O papel da MLT no controle da secreção de insulina não foi ainda totalmente elucidado e resultados controversos têm sido publicados (Peschke, 2008). Dentre estas observações está o fato de que os níveis de insulina são altos durante o dia e

baixos durante a noite, que correspondem às fases de redução e aumento da secreção de melatonina, respectivamente (Bizot-Espiard et al., 1998).

Tal inibição da secreção de insulina pela melatonina tem sido atribuída à presença de receptores MT1 nas ilhotas pancreáticas (Peschke et al., 2000, 2002). De fato, a presença de luzindole reverteu o efeito inibidor da melatonina sobre a secreção de insulina por ilhotas de ratos neonatos e por células de insulinoma (INS1) in vitro (Peschke et al., 2000, 2002). Os dados obtidos em nossos experimentos in vivo estão de acordo com estas observações, especialmente se considerarmos que nos animais que receberam MLT e luzindole a concentração plasmática de insulina se manteve similar à dos animais controles (Grupos ST, MV e ML).

Os estudos realizados nos últimos anos confirmaram as observações de que a insulina atua no SNC participando no controle neural na homeostase energética e que possui também importante ação neuroprotetora (Schwartz, 2000, Plum et al., 2005). No hipotálamo a insulina é capaz de ativar vias de sinalização intracelular em neurônios do núcleo arqueado que participam do circuito neuronal implicado na regulação do apetite e da termogênese (Plum et al., 2005). A administração de insulina por via intracerebroventricular (ICV) produz efeito anorexigênico, que resulta na redução do peso corporal em várias espécies de animais (Woods et al., 1979, Air et al., 2002; Carvalheira et al., 2003). Contrariamente, quando a insulina é impedida de atuar no hipotálamo ocorre um efeito orexigênico que leva ao aumento do peso corporal associado à resistência periférica à insulina (McGowan et al., 1990; Bruning et al., 2000; Obici et al., 2002; Carvalheira et al., 2003). Os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos anorexigênicos da insulina estão relacionados à sua capacidade modificar a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos

(Plum et al., 2005). Neste sentido, vários autores verificaram que a insulina administrada por via intracerebroventricular (ICV) é capaz de reduzir a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e de aumentar a expressão do hormônio melanócito estimulante (α -MSH; derivando do pro-hormônio precursor do hormônio melanócito estimulante – POMC) dos neurônios do núcleo arqueado (Schwartz et al., 1992; Benoit et al., 2002). Estes se conectam com neurônios do núcleo paraventricular que expressam receptores para o NPY e para o α -MSH (MC4). A ação da insulina sobre os neurônios do núcleo arqueado resulta no aumento da expressão do CRH (peptídeo liberador do hormônio adrenocorticotrófico – ACTH), que possui ação anorexigênica e é produzido por neurônios do núcleo paraventricular (Plum et al., 2005). Em particular, existem evidências de que o aumento da expressão do α -MSH seja o principal responsável pela mediação da ação anorexigênica da insulina (Benoit et al., 2002).

Conforme observamos acima, nossos resultados referentes à redução do peso corporal, bem como os demais efeitos causados pela MLT, tornam plausível a hipótese de que os mesmos tenham sido derivados da atuação desta no hipotálamo modificando a fosforilação de proteínas de vias de sinalização ativadas pela insulina. De fato, evidências de que há um entrelaçamento das ações da melatonina e da insulina no SNC foram obtidas por Anhê et al. (2004) ao verificarem que a MLT é capaz de induzir no hipotálamo de ratos a rápida ativação do IR, bem como a ativação do IRS-1, através da sua interação com o receptor MT2. Embora não se conheça o mecanismo pelo qual o receptor MT2 dispare a fosforilação em tirosina do IR e posterior fosforilação do IRS-1, Anhê et al. (2004) verificaram que a administração intracerebroventricular de MLT resultou na fosforilação da AKT e ERK em serina.

É importante notar que a fosforilação da AKT é um passo da via de sinalização da insulina posterior à associação do IRS-1 à fosfoinositol-3 quinase (PI3K), a qual passa então ao estado ativado (van der Heide et al., 2006). Spanswick et al. (2000) mostraram, através de estudos eletrofisiológicos, que a ativação da via de sinalização da insulina em neurônios do hipotálamo de ratos é capaz de provocar a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Por sua vez, Niswender et al. (2003) mostraram claramente que nos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo esta ativação K_{ATP} é dependente da PI3K. Como se sabe, os neurônios do núcleo arqueado são elementos chave para a ação anoréxica central da insulina (Plum et al., 2005). Ou seja, a abertura dos canais de K_{ATP} provocaria hiperpolarização dos neurônios do núcleo arqueado, levando à redução da sua atividade sobre os neurônios do núcleo paraventricular e, conseqüentemente, inibindo desta forma o comportamento alimentar. Nossos resultados mostraram que a MLT estimulou a fosforilação da AKT, evidenciando, portanto, que houve ativação da PI3K. Este dado permite supor que o efeito inibitório da MLT sobre o ganho de peso corporal dos animais possa ter sido, pelo menos em parte, decorrente de ação sobre neurônios do núcleo arqueado. Esta hipótese recebe suporte no fato dos animais que receberam MLT+LZD apresentarem quantidade de AKT fosforilada semelhante à dos grupos controle. É interessante notar também que o efeito da MLT sobre a fosforilação da AKT foi semelhante nos animais que receberam doses de 10, 50 e 100 mg/kg. Esta observação apóia a hipótese de uma possível ação da MLT via receptor MT2, os quais estão sujeitos a saturação em função da concentração do ligante. Por outro lado, o fato de a concentração de 100 mg/kg de MLT ter produzido inibição do ganho de peso superior às demais doses pode ser atribuído à sua ação periférica (Ha et al., 2006).

Por outro lado, nossos resultados relativos à fosforilação da proteína ERK1/2 são de difícil interpretação à luz da ativação do IR pela MLT, conforme proposto por Anhê et al. (2004). Em nossos experimentos observamos aumento fosforilação da ERK1/2 somente nos animais que receberam MLT na dose de 10 mg/kg. Nos demais grupos tratados com MLT não houve diferença quando comparados aos animais sem tratamento e aos animais controle que receberam os veículos de diluição. É preciso considerar que o presente trabalho foi realizado em ratos recém nascidos, que foram tratados com MLT cronicamente, durante 6 dias, por via subcutânea. Por sua vez, os resultados reportados por Anhê et al. (2004) foram obtidos a partir de experimentos como ratos adultos após uma única administração por via intracerebroventricular. Estes autores utilizaram apenas a dose de 100ng de MLT e reportaram aumento da fosforilação 10 minutos após a infusão da mesma. Assim, a aparente discrepância que se observa entre os nossos resultados e os reportados por Anhê et al. (2004) talvez possa ser atribuída à grande diferença dos modelos e desenhos experimentais utilizados. Neste contexto, se considerarmos uma possível ativação do IR pela MLT nossos resultados sugerem que o tratamento crônico com MLT possa ter modificado a capacidade de associação do IRS1 com os substratos da via da ERK1/2.

Nossos dados mostram pela primeira vez que doses de 1 a 100 mg/kg de melatonina produzem alterações metabólicas em ratos neonatos, e que tais efeitos podem ser atribuídos à sua ação periférica e central. Tais observações são relevantes ao se considerar possíveis efeitos sistêmicos concomitantemente ao seu emprego como agente neuroprotetor.

6 - CONCLUSÕES

A administração crônica de melatonina a ratos neonatos, nas doses de 1, 10, 50 e 100mg/kg, reduz o ganho de peso durante a primeira semana de vida. Este efeito está associado a alterações nas concentrações plasmáticas de substratos energéticos e na secreção de insulina.

Os efeitos da administração crônica de melatonina sobre redução na evolução ponderal podem ter sido causados por ação direta sobre tecidos periféricos, sobre neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle do apetite e sobre homeostasia energética.

A possível ação central da melatonina que levou à redução na evolução ponderal teria como mecanismo alternativo sua interação com receptores MT2 presentes nos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo.

Tais observações corroboram a hipótese da existência de um mecanismo de interação dos receptores MT2 e IR dos neurônios hipotalâmicos, levando à ativação da via de sinalização da insulina nestes neurônios.

7 - BIBLIOGRAFIA

ABEL ED, PERONI O, KIM JK, KIM YB, BOSS O, HADRO E, MINNEMANN T, SHULMAN GI, KAHN BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature**, (409): 729-733, 2001.

AIR EL, BENOIT SC, CLEGG DJ, SEELEY RJ, WOODS SC. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. **Endocrinology**, 143(6): 2449-2452, 2002.

ANHE GF, CAPERUTO LC, PEREIRA-DA-SILVA M, SOUZA LC, HIRATA AE, VELLOSO LA, CIPOLLA-NETO J, CARVALHO CR. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. **J Neurochem**, (90): 559-566, 2004.

BAILEY CJ, ATKINS TW, MATTY AJ. Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. **Horm Res**, 5(1): 21-28, 1974.

BARRENETXE J, DELAGRANGE P, MARTINEZ JA. Physiological and metabolic functions of melatonin. **J Physiol Biochem**, (60): 61-72, 2004.

BARTNESS TJ, DEMAS GE, SONG CK. Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. **Exp Biol Med**, (227): 363-376, 2002.

BENOIT SC, AIR EL, COOLEN LM, STRAUSS R, JACKMAN A, CLEGG DJ, SEELEY RJ, WOODS SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. **J Neurosci**, 15;22(20): 9048-9052, 2002.

BIZOT-ESPIARD JG, DOUBLE A, COUSIN B, LESIEUR D, GUARDIOLA-LEMAITRE B, DELAGRANGE P, KTORZA A, PENICAUD L. Lack of melatonin effects on insulin action in normal rats. **Horm Metab Res**, (30): 711-716, 1998.

BOJKOVÁ B, ORENDÁS P, FRIEDMANOVÁ L, KASSAYOVÁ M, DATELINKA I, AHLERSOVÁ E, AHLERS I. Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. **Acta Physiol Hung**, 95(1): 65-76, 2008.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, (72): 248-254, 1976.

BRUDER ED, JACOBSON L, RAFF H. Plasma leptin and ghrelin in the neonatal rat: interaction of dexamethasone and hypoxia. **J Endocrinol**, (185): 477-484, 2005.

BRÜNING JC, GAUTAM D, BURKS DJ, GILLETTE J, SCHUBERT M, ORBAN PC, KLEIN R, KRONE W, MÜLLER-WIELAND D, KAHN CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science.**, **22;289(5487)**: 2122-2125, 2000.

BRYDON L, PETIT L, DELAGRANGE P, STROSBERG AD, JOCKERS R. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. **Endocrinology.**, **(142)**: 4264-4271, 2001.

CANPOLAT S, AYDIN M, YASAR A, COLAKOGLU N, YILMAZ B, KELESTIMUR H. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on immunohistochemical ghrelin staining of arcuate nucleus and serum ghrelin levels in the rat. **Neurosci Lett.**, **(410)**: 132-136, 2006.

CARVALHEIRA JB, RIBEIRO EB, ARAÚJO EP, GUIMARÃES RB, TELLES MM, TORSONI M, GONTIJO JA, VELLOSO LA, SAAD MJ. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia.**, **46(12)**:1629-1640, 2003.

CASSONE VM, WARREN WS, BROOKS DS, LU J. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. **J Biol Rhythms.**, **(8)**: 73-81, 1993.

COSTA EJ, LOPES RH, LAMY-FREUND MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **J Pineal Res.**, **(19)**: 123-126, 1995.

Csaba G, Baráth P. Are Langerhan's islets influenced by the pineal body? **Experientia.**, **27(8)**: 962, 1971.

de LIMA LM, dos REIS LC, de LIMA MA. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. **Braz J Biol.**, **(61)**: 333-340, 2001.

DEBONS AF, FANI K, JIMENEZ FA, MAAYAN ML. Inhibition of cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits by dimethyl sulfoxide. **J Pharmacol Exp Ther.**, **243(2)**: 745-57, 1987.

DELAGRANGE P, JOCKERS R. Melatonin and energy homeostasis: peripheral versus central regulation. **Minerva Endocrinol.**, **(28)**: 313-320, 2003.

DRAGO F, BUSA L, BENELLI A, BERTOLINI A. Acute low doses of melatonin stimulate rat sex behavior: the role of serotonin neurotransmission. **Eur J Pharmacol.**, **(385)**: 1-6, 1999.

DREW JE, BARRETT P, MERCER JG, MOAR KM, CANET E, DELAGRANGE P, MORGAN PJ. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. **J Neuroendocrinol.**, **(13)**: 453-458, 2001.

DUBOCOVICH ML, MARKOWSKA M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine.**, (27): 101-110, 2005.

ELMQUIST JK, ELIAS CF, SAPER CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron.**, (22): 221-232, 1999.

FABIS M, PRUSZYNSKA E, MACKOWIAK P. In vivo and in situ action of melatonin on insulin secretion and some metabolic implications in the rat. **Pancreas.**, (25): 166-169, 2002.

FACCHINI G, ROGÉRIO F, SALERNO AG, AMARAL AG, REZENDE ACS, OLIVEIRA HC, LANGONE F. Efeito de altas doses de melatonina sobre o metabolismo energético de ratos neonatos. **XXI Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE**: 11.010, 2006

FINOCCHIARO LM, GLIKIN GC. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. **J Pineal Res.**, (24): 22-34, 1998.

FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell.**, (116): 337-350, 2004.

FRASCHINI A, FUHRMAN CONTI AM. Nuclear phospholipids during the adaptation of human EUE cells to hypertonic stress. **Histochem Cell Biol.**, (103): 47-57, 1995.

Gibbs FP, Vriend J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. **Endocrinology** 109(5): 1796-8, 1981.

HA E, YIM SV, CHUNG JH, YOON KS, KANG I, CHO YH, BAIK HH. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. **J Pineal Res.** 41(1): 67-72, 2006.

HARDELAND R, PANDI-PERUMAL SR, CARDINALI DP. Melatonin Int J Biochem Cell Biol., (38): 313-316, 2006.

HELDMAIER G, HOFFMANN K. Melatonin stimulates growth of brown adipose tissue **Nature.**, (247): 224-225, 1974.

HUETHER G, POEGGELER B, REIMER A, GEORGE A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. **Life Sci.**, (51): 945-953, 1992.

HUETHER G, POEGGELER B, ADLER L, RUTHER E. Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. **Eur J Pharmacol.**, (238): 249-254, 1993.

HUETHER G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. **Experientia.**, (49): 665-670, 1993.

JAHNKE G, MARR M, MYERS C, WILSON R, TRAVLOS G, PRICE C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. **Toxicol Sci.**, (50): 271-279, 1999.

KALRA SP, DUBE MG, PU S, XU B, HORVATH TL, KALRA PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocr Rev.**, (20): 68-100, 1999.

KEMP DM, UBEDA M, HABENER JF. Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. **Mol Cell Endocrinol.**, (191): 157-166, 2002.

KIM SJ, REITER RJ, ROUVIER GARAY MV, QI W, EL-SOKKARY GH, TAN DX. 2-Nitropropane-induced lipid peroxidation: antitoxic effects of melatonin. **Toxicology.**, (130): 183-190, 1998.

KLEIN TW, SZENTIVANYI A, FISHEL CW. Effects of serotonin on platelets of normal and B. pertussis-injected mice. **Proc Soc Exp Biol Med.**, (147): 681-686, 1974.
LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, (227): 680-685, 1970.

LE GS, ATGIE C, VIGUERIE-BASCANDS N, HANOUN N, LARROUY D, AMBID L, RAIMBAULT S, RICQUIER D, DELAGRANGE P, GUARDIOLA-LEMAITRE B, PENICAUD L, CASTELLA L. Characterization of a melatonin binding site in Siberian hamster brown adipose tissue. **Eur J Pharmacol.**, (339): 271-278, 1997.

LEE EJ, LEE MY, CHEN HY, HSU YS, WU TS, CHEN ST, CHANG GL. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. **J Pineal Res.**, (38): 42-52, 2005.

LIMA FB, MACHADO UF, BARTOL I, SERAPHIM PM, SUMIDA DH, MORAES SM, HELL NS, OKAMOTO MM, SAAD MJ, CARVALHO CR, CIPOLLA-NETO J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol.**, (275): 934-941, 1998.

MCGOWAN MK, ANDREWS KM, KELLY J, GROSSMAN SP. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. **Behav Neurosci.**, 104(2): 373-385, 1990.

MAYO JC, SAINZ RM, ANTOLI I, HERRERA F, MARTIN V, RODRIGUEZ C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cell Mol Life Sci.**, (59): 1706-1713, 2002.

MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX, HARDELAND R, LEON J, RODRIGUEZ C, REITER RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **J Neuroimmunol.**, (165): 139-149, 2005.

MORGAN PJ, MERCER JG. The regulation of body weight: lessons from the seasonal animal. **Proc Nutr Soc.**, (60): 127-134, 2001.

MUNEOKA K, OGAWA T, TAKIGAWA M. Effects of neonatal melatonin administration on the extra-hypothalamic regions in rat brains: effects on the serotonergic system. **Neurochem Res.**, (25): 817-822, 2000.

MUSTONEN AM, NIEMINEN P, HYVARINEN H. Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels. **Endocrine.**, (16): 43-46, 2001.

NISWENDER KD, GALLIS B, BLEVINS JE, CORSON MA, SCHWARTZ MW, BASKIN DG. Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 3-kinase activation by insulin and leptin. **J Histochem Cytochem.**, 51(3): 275-283, 2003.

NOSJEAN O, FERRO M, COGE F, BEAUVERGER P, HENLIN JM, LEFOULON F, FAUCHERE JL, DELAGRANGE P, CANET E, BOUTIN JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J Biol Chem.**, (275): 31311-31317, 2000.

OBICI S, ZHANG BB, KARKANIAS G, ROSSETTI L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. **Nat Med.**, 8(12):1376-1382, 2002.

PANDI-PERUMAL SR, SRINIVASAN V, MAESTRONI GJ, CARDINALI DP, POGGELER B, HARDELAND R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? **FEBS J.**, (273): 2813-2838, 2006.

PEI Z, CHEUNG RT. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **J Pineal Res.**, (37): 85-91, 2004.

Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. **J Pineal Res.**, 44(1): 26-40, 2008.

PESCHKE E, FAUTECK JD, MUSSHOF U, SCHMIDT F, BECKMANN A, PESCHKE D. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. **J Pineal Res.**, 28(3):156-64, 2000.

PESCHKE E, MUHLBAUER E, MUSSHOF U, CSERNUS VJ, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D. Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. **J Pineal Res.**, (33): 63-71, 2002.

PICINATO MC, HABER EP, CIPOLLA-NETO J, CURI R, DE OLIVEIRA CARVALHO CR, CARPINELLI AR. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. **J Pineal Res.**, (33): 156-160, 2002.

PICINATO MC, HIRATA AE, CIPOLLA-NETO J, CURI R, CARVALHO CR, ANHÊ GF, CARPINELLI AR. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **J Pineal Res.**, 44(1): 88-94, 2008.

PLUM L, SCHUBERT M, BRÜNING JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends Endocrinol Metab.**, 16(2): 59-65, 2005.

POON AM, CHOY EH, PANG SF. Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on melatonin receptors in mouse hepatocytes. **Biol Signals Recept.**, (10): 367-379, 2001.

PRUNET-MARCASSUS B, AMBID L, VIGUERIE-BASCANDS N, PENICAUD L, CASTEILLA L. Evidence for a direct effect of melatonin on mitochondrial genome expression of Siberian hamster brown adipocytes. **J Pineal Res.**, (30): 108-115, 2001.

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

QUAY WB, GORRAY KC. Pineal effects on metabolism and glucose homeostasis: evidence for lines of humoral mediation of pineal influences on tumor growth. **J Neural Transm.**, 47(2):107-120, 1980.

RASMUSSEN DD, BOLDT BM, WILKINSON CW, YELLON SM, MATSUMOTO AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology.**, (140): 1009-1012, 1999.

REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Prog Neurobiol.**, (56): 359-384, 1998.

REITER RJ, TAN DX, OSUNA C, GITTO E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. **J Biomed Sci.**, (7): 444-458, 2000.

RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM, ANTOLIN I, HERRERA F, MARTIN V, REITER RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J Pineal Res.**, (36): 1-9, 2004.

ROGERIO F, DE SOUZA QL, TEIXEIRA SA, OLIVEIRA AL, DE NG, LANGONE F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transaction. **Brain Res.**, (926): 33-41, 2002.

ROGERIO F, TEIXEIRA SA, DE REZENDE AC, DE SA RC, DE SOUZA QL, DE NG, MUSCARA MN, LANGONE F. Superoxide dismutase isoforms 1 and 2 in lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin treatment. **Brain Res.**, (154): 217-225, 2005.

ROGERIO F, JORDAO H, JR., VIEIRA AS, MARIA CC, SANTOS DE REZENDE AC, PEREIRA GA, LANGONE F. Bax and Bcl-2 expression and TUNEL labeling in lumbar enlargement of neonatal rats after sciatic axotomy and melatonin treatment. **Brain Res.**, (1112): 80-90, 2006.

SCHWARTZ MW. Biomedicine. Staying slim with insulin in mind. **Science.**, 22;289(5487): 2066-7, 2000.

SCHWARTZ MW, FIGLEWICZ DP, BASKIN DG, WOODS SC, PORTE D JR. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. **Endocr Rev.**, 13(3): 387-414, 1992.

SPANSWICK D, SMITH MA, MIRSHAMSI S, ROUTH VH, ASHFORD ML. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. **Nat Neurosci.**, 3(8): 757-758, 2000.

SONG CK, BARTNESS TJ. CNS sympathetic outflow neurons to white fat that express MEL receptors may mediate seasonal adiposity. **Am J Physiol.**, (281): 666-672, 2001.

van der HEIDE LP, RAMAKERS GM, SMIDT MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Prog Neurobiol.**, 79(4): 205-221, 2006.

VANECEK J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol Rev.**, (78): 687-721, 1998.

WEAVER DR, RIVKEES SA, REPPERT SM. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. **J Neurosci.**, (9): 2581-2590, 1989.

WEINBERG U. Evidence that melatonin retention by the neonatal rat is greatly increased as compared to the adult: a novel biochemical mechanism. **Brain Res.**, (217): 221-224, 1981.

WEISHAUPT JH, BARTELS C, POLKING E, DIETRICH J, ROHDE G, POEGGELER B, MERTENS N, SPERLING S, BOHN M, HUTHER G, SCHNEIDER A, BACH A, SIREN AL, HARDELAND R, BAHR M, NAVE KA, EHRENREICH H. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. **J Pineal Res.**, (41): 313-323, 2006.

WILLIAMS LM, DREW JE, BUNNETT NW, GRADY E, BARRETT P, ABRAMOVICH DR, MORRIS A, SLATER D. Characterization of an antibody to the human melatonin mtl receptor. **J Neuroendocrinol.**, (13): 94-101, 2001.

WITT-ENDERBY PA, BENNETT J, JARZYNKA MJ, FIRESTINE S, MELAN MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. **Life Sci.**, (72): 2183-2198, 2003.

WOLDEN-HANSON T, MITTON DR, MCCANTS RL, YELLON SM, WILKINSON CW, MATSUMOTO AM, RASMUSSEN DD. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. **Endocrinology.**, (141): 487-497, 2000.

WOODS SC, LOTTER EC, MCKAY LD, PORTE D JR. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature.**, 29;282(5738): 503-505, 1979.

8 - ANEXO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada **EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE MELATONINA SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO E FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS SINALIZADORAS NO HIPOTÁLAMO DE RATOS NEONATOS**

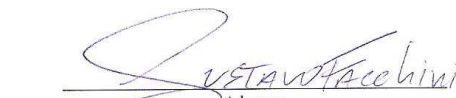

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto **CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____), intitulado _____;

(**X**) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 509-1);

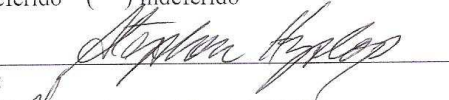
() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____


Aluno:

Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(**X**) Deferido () Indeferido

Nome: 
Função: **Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO**
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP