



Repercussão metabólica na prole adulta gerada a partir de mães com  
ausência de melatonina durante a gestação e lactação

DANILO DA SILVA FERREIRA

Campinas

2012





Danilo da Silva Ferreira

REPERCUSSÃO METABÓLICA NA PROLE ADULTA GERADA A PARTIR DE  
MÃES COM AUSÊNCIA DE MELATONINA DURANTE A GESTAÇÃO E  
LACTAÇÃO

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe

Dissertação de Mestrado apresentada  
à Pós-Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas - UNICAMP  
para obtenção de título de Mestre em  
Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
DANILO DA SILVA FERREIRA E ORIENTADA  
PELO PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHE.

---

Assinatura do Orientador

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

F413r Ferreira, Danilo da Silva, 1987-  
Repercussão metabólica na prole adulta gerada à  
partir de mães com ausência de melatonina durante a  
gestação e lactação / Danilo da Silva Ferreira. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Gabriel Forato Anhê .  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glândula pineal. 2. Melatonina. 3. Metabolismo  
energético. I. Anhê, Gabriel Forato, 1980-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Metabolic input in adult offspring of mothers without melatonin during pregnancy and lactation.

**Palavras-chave em inglês:**

Pineal gland

Melatonin

Energy metabolism

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Gabriel Forato Anhê [Orientador]

Fabio Bessa Lima

Stephen Hyslop

**Data da defesa:** 13-12-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

---

## Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

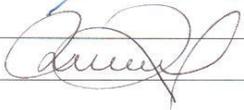
---

DANILO DA SILVA FERREIRA

---

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe

---

<b>Membros:</b>	
Professor Doutor Gabriel Forato Anhe	
Professor Doutor Stephen Hyslop	
Professor Doutor Fábio Bessa Lima	

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 13/12/2012

---

## AGRADECIMENTOS

A toda minha família pela compreensão durante o transcorrer do curso.

Ao meu orientador, **Gabriel Forato Anhô**, por acreditar e me proporcionar uma formação diferenciada.

Professora **Silvana Auxiliadora Bordin** e professor **José Cipolla Neto** pelo auxílio técnico, infraestrutura laboratorial concedida, bem como seus alunos que corroboraram para realização deste trabalho.

A **Caroline Costa Mesquita** e **Ana Paula de Lima Barbosa**, fundamentais desde o início do trabalho, pois sem o auxílio de ambas, de fato, não conseguiria finalizar o trabalho com qualidade.

A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia do Diabetes.

À **FAPESP** e **CNPq** pelo auxílio e apoio científico.

## ***Resumo***

É sabido que a exposição de ratas gestantes a retardos no início da fase clara diminui a secreção de melatonina, gerando intolerância à glicose na prole. No rato adulto, a melatonina exerce controle sobre aspectos circadianos do metabolismo. Esse controle ocorre por modulação da produção de insulina e supressão da gliconeogênese noturna. O presente trabalho busca analisar a importância da melatonina materna na programação metabólica da prole.

Descobrimos que a prole originada de mães pinealectomizadas (PINX-P1) desenvolveu resistência hepática à insulina com aumento de enzimas gliconeogênicas. Não houve alterações na sinalização da insulina na musculatura esquelética. As ilhotas isoladas do grupo PINX-P1 apresentaram uma diminuição na secreção de insulina frente ao estímulo com glicose. É importante ressaltar que os achados metabólicos ocorreram no final da fase clara, do ciclo claro/escuro, indicando que o grupo PINX-P1 apresentava uma intolerância à glicose tempo-dependente. O perfil metabólico da prole não sofreu alteração em mães pinealectomizadas que receberam reposição de melatonina durante a gestação e lactação

Assim, os presentes achados apoiam a hipótese de que a melatonina materna durante a gestação é responsável pela programação metabólica da prole.

**Palavras-chave:** pinealectomia, melatonina e metabolismo da prole.  
Financiamento: FAPESP e CNPq

## ***ABSTRACT***

Phase shifts are known to decrease night time melatonin secretion and to elicit glucose intolerance in the offspring when applied to gestating rats. In the adult rat, melatonin plays an important role in the circadian control of metabolism by timing insulin action and suppressing nocturnal gluconeogenesis. The present study addresses, therefore, the importance of maternal melatonin for the programming of the metabolic status of the offspring.

We found that rats born to and breast-fed by pinealectomized mothers (PINX-P1) were glucose intolerant displaying hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis. No parallel changes in insulin signal transmission were detected in skeletal muscle. Pancreatic islets isolated from PINX-P1 presented impaired glucose-stimulated insulin secretion. Importantly, these alterations were detected exclusively at the end of the light phase of the light/dark cycle, indicating that PINX-P1 rats exhibit time-dependent glucose intolerance. This altered pattern of daily energy metabolism was absent in the offspring of pinealectomized mothers that received melatonin replacement during pregnancy and lactation.

The present results support the novel concept that maternal melatonin is responsible for the programming of the daily pattern of energy metabolism in the offspring.

**Key words:** pinealectomy, melatonin and offspring metabolism.

Funding: FAPESP and CNPq.

# Sumário

Lista de abreviaturas e siglas .....	10
Introdução .....	11
Ritmos circadianos .....	11
Glândula Pineal.....	12
Melatonina e sono .....	14
Melatonina e metabolismo.....	15
Sinalização intracelular da insulina .....	16
Programação fetal da resistência à insulina.....	18
Objetivos gerais .....	20
Objetivos específicos.....	20
Metodologia .....	20
Animais .....	20
Pinelectomia .....	21
Reposição de Melatonina .....	21
Análise metabólica na prole.....	22
Isolamento de ilhotas Pancreáticas .....	24
Secreção Cumulativa de Insulina .....	25
Análise da via de sinalização da insulina .....	25
Análise estatística .....	27
Resultados.....	27
Discussão .....	41
Conclusão .....	46
Anexo.....	47
Referências.....	48

## **Lista de abreviaturas e siglas**

**DMT2:** diabetes mellitus tipo 2

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra acético

**GAPDH:** gliceraldeido-3- fosfato desidrogenase

**GLUT4:** transportador de glicose 4

**GTT:** teste de tolerância à glicose

**HIOMT:** hidroxindol-oxi-metiltransferase

**IRS1:** substrato 1 para receptor de insulina

**IRS2:** substrato 2 para receptor de insulina

**ITT:** teste de tolerância à insulina

**MERK/ERK:** cinases reguladas por sinais extracelulares

**MT1:** receptor 1 de membrana para melatonina

**MT2:** receptor 2 de membrana para melatonina

**NAS:** N- acetilserotonina

**NAT:** arilalquilamina N-acetiltransferase

**PEPCK:** enzima fosfenol piruvato carboxi quinase

**PI3K:** fosfatidolinositol-3- quinase

**PINX:** ratas pinealectomizadas

**PINX+MEL:** ratas pinealectomizadas com reposição de melatonina

**PTT:** teste de tolerância ao Piruvato

**SDS:** dodecil sulfato de sódio

**SHAM:** ratas submetidas a cirurgia “sham”

**SNC:** sistema nervosa central

## Introdução

### *Ritmos circadianos*

Os ritmos biológicos, ubíquos nos seres vivos, constituem uma forma adaptativa ao meio ambiente fundamental nos mais diversos processos comportamentais e fisiológicos, tais como: relações sociais, comportamento alimentar, regulação de temperatura, síntese de hormônios e até mesmo expressão de receptores [22,19]. Os estudos relacionados a ritmos circadianos podem ser considerados recentes; no entanto, ganharam vulto nas duas últimas décadas e, até hoje, vêm sendo amplamente explorados, principalmente nos processos envolvendo saúde e doença [1]. Os ritmos biológicos podem ser divididos em: (i) infradianos, que são os que possuem duração maior que 28 horas, (ii) ultradianos, com duração menor que 20 horas e (iii) circadianos, que oscilam entre 24 e 25 horas [15].

Os ritmos circadianos podem ser modulados por variáveis como idade, sexo e fatores genéticos. São parâmetros de variação circadiana clássica o estado sono-vigília, a temperatura corporal e a síntese de hormônios como cortisol e melatonina [1]. A ruptura no ciclo claro-escuro e consequente diminuição na produção de melatonina tem demonstrado estar associada a diversas patologias, como eventos cardiovasculares, reprodutivos e metabólicos [28,27]. Buxton et al. (2012) demonstraram que sujeitos jovens e saudáveis, quando privados de sono, apresentam intolerância à glicose concomitante à hipoinsulinemia. Neste mesmo estudo, mostrou-se que, quando há o reestabelecimento do sono, os níveis plasmáticos de glicose e insulina retornam ao normal [10].

## *Glândula Pineal*

A glândula pineal de humanos está localizada na região do diencefalo, inferiormente ao esplênio do corpo caloso e separada pela carióidea do terceiro ventrículo e das veias cerebrais ali contidas. Sua base, direcionada anteriormente, está presa por um pedúnculo, o qual se divide em lâminas superior e inferior, separadas por um recesso pineal do terceiro ventrículo que contém as comissuras posterior e hibenular, respectivamente [45].

A glândula possui um rico suprimento sanguíneo. As artérias pineais são ramos das caróidea posteriores mediais que, em si, são ramos da artéria cerebral posterior. O aspecto do órgão é vermelho acinzentado e sua dimensão chega a 8 mm de diâmetro [45].

Funcionalmente, a glândula pineal é considerada um órgão neuroendócrino, cuja secreção é composta principalmente de N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) [38].

O primeiro passo para produção de melatonina é a captação, pela pineal, do aminoácido triptofano, este é biotransformado em 5-hidroxitriptofano (5HTP) pela ação da enzima triptofano 5-hidroxilase, passo limitante para formação da serotonina. Subsequentemente, ocorre a sua descarboxilação por meio de descarboxilase de aminoácido inespecífica, originando a 5-hidroxitriptamina (serotonina). Em seguida, a serotonina é transformada em N-acetil-serotonina (NAS) pela ação da arilalquilamina n-acetiltransferase (NAT), enzima considerada importante por ser regulada diariamente pela estimulação simpática. Por fim, a



simpáticas e projetam-se no gânglio cervical superior , de onde sairão as fibras que se projetarão até a glândula pineal e mediado pela noradrenalina iniciará a produção de melatonina.

### *Melatonina e sono*

Dentre os diversos parâmetros fisiológicos rítmicos que podem ser modulados pela melatonina, o estado sono-vigília é aquele que é mais amplamente estudado. O sono pode ser definido como um estado complexo reversível, caracterizado por um período de repouso com conseqüente diminuição a respostas a estímulos externos [20].

O sono é fundamental para o funcionamento cerebral, sendo afetado em diversas patologias que acometem o sistema nervoso central. A fadiga diurna é frequentemente percebida em pessoas com problemas neurológicos, repercutindo, assim, nos diversos sistemas biológicos do indivíduo [2,13,26]. Na sociedade moderna, há uma tendência de redução do período de sono com conseqüente aumento da sonolência diurna.

O sistema nervoso central (SNC) tem função marca-passo nas alterações circadianas do organismo, sendo que a melatonina funciona como um sincronizador desse sistema. A porção parvicelular do núcleo paraventricular projeta-se direta ou indiretamente para a coluna intermédio lateral da medula espinal torácica, onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Estes realizam projeções para a porção anterior do gânglio cervical superior, cujos neurônios originam os nervos carotídeos internos e os nervos conários que são responsáveis pela inervação simpática da glândula pineal [45].

O aumento do tônus adrenérgico para a pineal resulta em ativação da NAT via receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\alpha_1$  localizados na membrana do pinealócito [12].

O aumento da melatonina no período noturno implica a diminuição da temperatura para o início do sono. O nadir da melatonina coincide com a produção máxima do cortisol, hormônio responsável por contrarregular a ação da insulina [5].

### *Melatonina e metabolismo*

Os receptores de melatonina possuem grande distribuição pelo corpo e estão presentes em vários órgãos metabolicamente ativos, como fígado e pâncreas. Experimentos com animais pinealectomizados demonstraram um papel importante deste hormônio na manutenção da massa corporal e ação na sinalização periférica de insulina [38,23].

Um dos primeiros trabalhos relacionando adipócito e melatonina foi publicado em 1994 e constatou que a incubação do adipócito com melatonina aumenta a captação de glicose estimulada por insulina [24]. Posteriormente a esta constatação, o mesmo grupo realizou experimentos com animais pinealectomizados, constatando que a ablação da pineal gera, no animal, uma intolerância à glicose, inicialmente associada à diminuição na concentração do transportador de glicose GLUT4 no tecido adiposo [25].

Subsequente à constatação que a pinealectomia gera diminuição de GLUT4, foi observado que os animais pinealectomizados apresentam resistência à insulina frente ao teste de tolerância à insulina (ITT). Vale ressaltar que a

diminuição na captação de glicose pelo adipócito isolado apresentou modulações frente aos diversos momentos do ciclo claro/escuro e que a reposição de melatonina nesses animais reverteu tanto a resistência à insulina quanto a redução de expressão de GLUT4 no tecido adiposo [55,3].

### *Sinalização intracelular da insulina*

A promoção dos efeitos biológicos pela insulina é disparada pela sua ligação à porção extracelular de seu receptor transmembrânico. Essa ligação promove alterações estruturais na porção intracelular do receptor que, a partir desse momento, passa a exercer sua atividade enzimática. Além de catalisar a fosforilação de resíduos de tirosina de sua própria cadeia proteica intracelular, o receptor de insulina (IR) também catalisa a fosforilação de resíduos de tirosina de uma série de substratos proteicos intracelulares (IRS). Cada uma dessas distintas proteínas recrutadas por intermédio de fosforilação tem a capacidade de se associar a um grupo distinto de outras proteínas intracelulares que contêm o domínio *Src homology 2* (SH2). A interação física entre essas proteínas e os substratos dos receptores do receptor de insulina se dá pela associação entre o domínio SH2 e resíduos de aminoácidos vicinais ao tirosil fosforilado [44].

Dos substratos proteicos que são fosforilados pelo IR, os *insulin receptor substrate 1* e *2* (IRS1 e IRS2) são aqueles cuja importância nos efeitos metabólicos da insulina já foi convincentemente demonstrada experimentalmente [21]. Em conjunto com o IRS1 e o IRS2, o parceiro predominantemente ancorado pelas tirosinas fosforiladas é a subunidade reguladora de 85 kDa (p85) da enzima *phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K). A subunidade catalítica desta enzima contém

110 kDA (p110) e encontra-se constitutivamente associada e inibida pela p85 no citoplasma. Quando uma molécula de IRS fosforilada em tirosina encontra um heterodímero p85-p110 no citoplasma, ocorre uma rápida associação entre o substrato fosforilado em tirosina e a p85, liberando a p110, que passa a exibir a sua atividade enzimática. A p110 da PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (4,5) bifosfato na posição 3', gerando, assim, fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato. Estudos *in vitro* e *in vivo*, com inibidores farmacológicos da PI3K, demonstraram que a atividade desta enzima é indispensável para a captação de glicose estimulada pela insulina. A via de sinalização ativada pela PI3K resulta em aumento da captação de glicose em tecidos que expressam o transportador de glicose GLUT4. Esta proteína, expressa preferencialmente no tecido adiposo e na musculatura esquelética, localiza-se na membrana de vesículas intracelulares. Quando há exposição da célula à insulina, com ativação da PI3K, ocorre a translocação para a membrana celular, fundindo-se a esta, o que provoca o aumento da quantidade de transportador e, conseqüentemente, do influxo de glicose para a célula [48].

Apesar de não se conhecerem, com exata precisão, todos os eventos intracelulares desencadeados pela PI3K, a maioria dos estudos envolvendo a sinalização da insulina demonstra que, para que a geração de fosfatidilinositol 3 fosfato resulte em translocação das vesículas de GLUT4 para a membrana celular, é necessária a fosforilação/ativação da enzima AKT [48].

## *Programação fetal da resistência à insulina*

A prevalência de obesidade associada à resistência à insulina vem crescendo acentuadamente em países industrializados [16,31], em paralelo ao crescente consumo de dietas ricas em proteínas e gorduras e pobres em carboidratos [17]. Em mulheres, a prevalência da obesidade na idade reprodutiva também vem aumentando, sendo provável que este evento acompanhe o consumo excessivo de gorduras durante a gestação e/ou lactação. Esses dados epidemiológicos apontam também que o aumento da incidência do DMT2 ocorre em paralelo à exposição a diversas outras situações ambientais que vão além de alteração da natureza da dieta, tais como a crescente exposição à poluição luminosa e mudanças no horário de alimentação [36,30,18].

Um estudo realizado em usuárias do Sistema Único de Saúde demonstrou que, no Brasil, cerca de 30% das gestações cursam com obesidade no último trimestre [57]. Essa situação é preocupante para obstetras e pediatras, uma vez que tal condição aumenta os riscos de macrosomia no nascituro, bem como a possibilidade de complicações infecciosas no puerpério [30].

Estudos com animais experimentais mostram que a alta ingestão de gorduras durante a gestação e lactação tem consequências marcantes na prole quando adulta. Em especial, foi constatado que as proles oriundas de mães que consumiram dieta hiperlipídica durante a gestação e/ou lactação apresentaram resistência à insulina e intolerância à glicose logo após o desmame [56].

Esses estudos consolidaram a hipótese de que a programação fetal é relevante para a etiologia do DMT2 e da resistência à insulina. Os mecanismos

pelos quais essas alterações se estabelecem são certamente modulações epigenéticas que envolvem a expressão de microRNAs, metilação de DNA e modificações covalentes de histonas. Neste contexto, o DMT2 acompanhado de resistência à insulina tem sido apontado como uma patologia com alto grau de determinante epigenético [41].

Além da natureza da dieta, já está estabelecido que a subnutrição materna durante a gestação gera uma prole de fêmeas adultas que se caracterizam por hiperfagia, intolerância à glicose, resistência à insulina e maior adiposidade [18]. Essas adaptações transmitem-se tanto pela linhagem paterna quanto pela linhagem materna, inclusive para a prole gerada a partir da geração número 1 das mães subnutridas [56]. Além de alterações qualitativas e quantitativas na dieta, modificações na ritmicidade das fases clara e escura, durante a gestação de ratas, resultam também no surgimento de uma prole com resistência à insulina. Mais especificamente, foi demonstrado que retardos de 12h na fase clara do ciclo claro/escuro, de três em três dias, durante toda a gestação, fazem com que a prole, constituída de machos na 12<sup>a</sup> semana de vida, apresente resistência à insulina frente ao teste de sensibilidade à insulina (ITT), com níveis glicêmicos normais no teste de tolerância à glicose [53]. O retardamento no ciclo claro/escuro materno, durante o período gestacional, provavelmente causa um remodelamento na síntese de melatonina materna, repercutindo na sincronização do feto [53].

Os dados supracitados demonstram que alterações em ritmos circadianos podem repercutir no metabolismo do indivíduo adulto, bem como intercorrências no transcorrer gestacional podem repercutir na prole adulta, corroborando para a

propositura de que o distúrbio circadiano materno pode alterar o metabolismo da prole.

## **Objetivos gerais**

Investigar se a ausência de melatonina durante a gestação e lactação predispõe a prole a desenvolver resistência à insulina e intolerância à glicose.

### *Objetivos específicos*

1. Estudar a sensibilidade à insulina pelo ITT (*insulin tolerance test*) na prole oriunda de três grupos distintos, a saber: mães submetidas a uma cirurgia CTL (SHAM), mães pinealectomizadas (PINX), mães pinealectomizadas que receberam reposição de melatonina durante a gestação e a lactação (PINX+mel).
2. Estudar a tolerância à glicose pelo GTT (*glucose tolerance test*) na prole oriunda de mães SHAM, PINX e PINX+mel.
3. Estudar a sinalização da insulina (fosforilação da AKT, IR e IRS1/2) em tecido muscular e hepático na prole oriunda de mães SHAM, PINX, PINX+mel.

## **Metodologia**

### *Animais*

Ratas fêmeas da linhagem Wistar foram mantidas em caixas coletivas (4 animais/gaiola) sob condições de temperatura controlada (25°C), ciclo

claro/escuro de 12/12h (período claro iniciado às 7h) e alimentação com ração balanceada (Nuvital®) e água *ad libitum*.

### *Pinelectomia*

Ao atingirem seis semanas, os animais foram anestesiados com ketamina (0,4g/kg) e xilazina (0,02g/kg), o escalpo foi aberto sagitalmente e, após dividimento da musculatura e fâscias que cobrem o crânio na região da junção sutural lâmbda, foi feita uma abertura circular usando-se uma broca circular. 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. Um grupo de ratas foi submetido à anestesia e cirurgia similar sem remoção da Pineal (SHAM).

### *Reposição de Melatonina*

Após a ablação da pineal ou da cirurgia SHAM, os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma: (1) controle (SHAM); (2) pinelectomizado (PINX); (3) pinelectomizados com suplementação de melatonina (PINX+MEL).

A suplementação de melatonina nos animais PINX+MEL foi feita por via oral, tendo os animais recebido 1mg/kg de melatonina dissolvida em 0,0001% de etanol na água de beber. A reposição iniciava 60 minutos antes do início da fase escura e durava até 60 minutos após o início da fase clara. Os demais grupos receberam água com 0,0001% de etanol.

Após cinco semanas de suplementação, os animais foram colocados em contato com um macho, sendo a suplementação de melatonina mantida. Ao constatar a presença de espermatozóide no lavado vaginal (indicativo de primeiro dia de gravidez), as ratas eram separadas do macho e marcava-se o primeiro dia da gestação.

O grupo PINX+MEL continuou recebendo a reposição de melatonina durante a gestação e lactação. Dois dias após o parto, os neonatos foram pesados e ajustados para, no máximo, 8 por mãe.

### *Análise metabólica na prole*

A prole foi mantida em caixas coletivas (com 4 animais/gaiola) sob condições de temperatura controlada de 25°C, ciclo claro/escuro de 12/12h (período claro iniciado às 7 h) e alimentação com ração balanceada (Nuvital®) e água *ad libitum*. O Teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado nos animais na 8ª e 18ª semanas de vida, o PTT na 16ª semana e o ITT na 18ª.

Nesses testes, a glicemia foi mensurada usando um glicosímetro (Accu-Check Active – Roche, Brasil), que determina os valores de glicose em sangue total a partir do método enzimático da glicose oxidase. Antes desses ensaios, os animais foram colocados em jejum por nove horas. Após o jejum, eles foram anestesiados com Tiopental sódico (0,5mg/kg).

Para o GTT (Teste de tolerância à glicose), os animais receberam 2g/kg de glicose intraperitoneal (20% m/v, dissolvidos em uma solução de NaCl 0,9%) e a

glicemia foi medida 0, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção. A área sob a curva (glicemia vs. tempo) foi calculada como parâmetro de tolerância à glicose.

No PTT (Teste de tolerância ao Piruvato), os animais receberam 2g/kg de piruvato de sódio intraperitoneal (20% m/v dissolvidos em água de injeção) e a glicemia foi medida 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após a injeção. A área sob a curva (glicemia vs. tempo) foi calculada como parâmetro de quantidade total de glicose produzida a partir do piruvato.

No ITT (teste de tolerância à insulina), os animais receberam 2UI/kg de insulina intraperitoneal (2 UI/ml diluídos em uma solução de albumina a 0,1% m/v) e a glicemia foi medida 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos após a injeção. O  $K_{ITT}$  foi calculado como parâmetro de sensibilidade à insulina.

Os testes foram realizados ou no ZT3 (Zeitgeber Time) ou no ZT10. ZT é **Demonstração do fotoperíodo claro-escuro em relação à escala ZT**

exemplo, o ciclo claro-escuro ambiental. No caso desses testes, os valores da escala ZT de 0-12 representam o período claro do ciclo claro/escuro e os valores da escala ZT que vão de 12 a 24 representam o período escuro do ciclo, como demonstrado na fig.1.



Fig.2: As setas demonstram os horários nos quais os testes foram realizados, ambos no fotoperíodo claro.

## *Isolamento de ilhotas Pancreáticas*

A prole de ratos machos, oriunda de mães SHAM, PINX e PINX+MEL, foi mantida em caixas coletivas (com 4 animais/gaiola) sob condições de temperatura controlada de 25°C e ciclo de 12/12h (período claro iniciado às 7h), recebeu ração balanceada (Nuvital®) e água *ad libitum*. Foi realizado GTT na 8ª semana de vida e um PTT na 16ª semana de vida (metodologia anteriormente descrita).

Após as análises metabólicas na 18ª semana de vida, os animais foram sacrificados por decapitação. Após incisão abdominal e oclusão da extremidade do ducto biliar comum, foi inserida uma cânula de polietileno através de uma pequena incisão na parte proximal (hepática) deste ducto. Por esta cânula, foi injetada solução de Hanks adicionada de 0,9mg/ml de colagenase para todos os grupos. O pâncreas foi excisado e dissecado de gorduras, da maioria do tecido vascular e gânglios linfáticos. O pâncreas foi reduzido a fragmentos pequenos, que foram transferidos para tubo de ensaio contendo Hanks e colagenase.

Em seguida, os fragmentos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 23 minutos. Após o período de incubação, o tubo foi manualmente agitado até a obtenção de mistura homogênea, devido à ação da colagenase sobre o tecido acinoso. O conteúdo foi transferido para um béquer e o material lavado com solução de Hanks 4 vezes para que fosse feita a remoção da colagenase, das enzimas digestivas liberadas durante a incubação e também dos fragmentos celulares.

As ilhotas, completamente separadas do tecido acinoso, foram coletadas uma a uma, sob lupa, por aspiração com auxílio de uma pipeta Pasteur, previamente estirada e siliconizada.

### *Secreção Cumulativa de Insulina*

As ilhotas coletadas foram transferidas para placas de cultura com 24 reservatórios contendo 0,5ml de solução de Krebs, suplementada com 0,5% de albumina bovina (m/v) e 5,6mM de glicose (pH=7,4). Em cada reservatório, havia 5 ilhotas que foram acondicionadas em estufa a 37°C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gazeado com carbogênio). As ilhotas permaneceram, então, pré-incubadas por 45 minutos com essa solução. Ao final do período, a solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação, contendo agora 5.6, 8.3, 11.1 ou 16.7 mM de glicose. Após 1 hora de incubação, as placas foram resfriadas a 4°C, o sobrenadante foi removido e quantificado por radioimunoensaio, usando padrão de insulina de rato.

### *Análise da via de sinalização da insulina*

A prole foi mantida em caixas coletivas (com 4 animais/gaiola) sob condições de temperatura controlada de 25°C e ciclo de 12/12h (período claro iniciado às 7h), recebeu ração balanceada (Nuvital®) e água *ad libitum*. Foi realizado GTT na 8ª semana de vida e um PTT na 16ª semana de vida (metodologia anteriormente descrita).

Os animais foram colocados em jejum por 12 horas. Anestesiados com tiopental sódico (50mg/kg), foi realizado um corte sagital na cavidade abdominal, expondo toda região visceral, um fragmento do fígado e um coxim gorduroso do tecido adiposo periepídimal ou periuterino foram removidos e mantidos em gelo seco. Também foi removido um músculo solear inteiro de uma das patas. Em seguida, uma injeção endovenosa de insulina (2 UI por animal) foi aplicada na veia cava. Um fragmento adicional do fígado e tecido solear restantes foram removidos 30 e 60 segundos após a injeção, respectivamente. Os tecidos retirados dos animais foram homogeneizados com um Polytron (Kinematica, Suíça) em tampão de extração (SDS 1%, Tris (pH 7,4) 100mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 100mM) e incubadas a 96°C por 10 minutos. Após centrifugação, parte do sobrenadante das amostras foi utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com reagente Bradford (Biorad, CA, USA) e o restante acrescido de tampão Laemmli 5X e incubado a 96°C por 10 minutos. A mesma quantidade de proteínas totais de cada amostra tratada com Laemmli foi fracionada em SDS-PAGE (2,6%C e 8-12%T) em aparelho para minigel (*Mini-Protean, Bio-Rad*). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA). Estas foram bloqueadas com uma solução contendo leite desnatado 5%, Tris-Base, NaCl e Tween-20 por 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra fosfo-AKT 1/2/3 (Ser 473), AKT1/2/3, IRS1, IRS2 e IR $\beta$ , PEPCK e GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) por 4 horas à temperatura ambiente. Após marcação com

anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (GE Healthcare, USA). Antes da detecção, foram incubadas durante 1 minuto com uma solução contendo luminol, ácido p-cumárico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, então, expostas durante tempos variados a filmes de raio-X. Depois de revelados, esses filmes foram submetidos à análise de densitometria óptica pelo software Scion Image (Scioncorp, NIH, USA).

### *Análise estatística*

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, ou duas vias com pós-teste de *Student*, quando apropriado). Também foi realizado, quando adequado, o teste de *Student*. Em todos os resultados, foram adotados 5% como limite de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

Os resultados, aqui apresentados, são constituídos de testes metabólicos, sinalização hepática, bem como secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas na prole de animais, cujas mães sofreram cirurgia de pinealectomia (PINX-P1), cirurgia de pinealectomia com reposição de melatonina durante a gestação e a lactação (PM-P1) e cirurgia SHAM (SHAM-P1).

A massa dos animais foi mensurada no decorrer da vida, a partir do desmame até a 18<sup>a</sup> semana de vida. Não houve diferença significativa no ganho de massa entre os grupos de machos (fig. 3A) e fêmeas (fig. 3B). A glicemia basal,

coletada na 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas de vida no ZT 10, também não apresentou diferença significativa entre grupos de ambos os gêneros (fig. 3C e 3D).

Na 8<sup>a</sup> semana de vida, no ZT10, os valores glicêmicos e a AUC obtida após o GTT na prole constituída de ratos machos não apresentaram diferença estatística em nenhum ponto do teste (fig. 4A e 4B). Já na 18<sup>a</sup> semana de vida, no ZT10, a glicemia da prole de ratos machos apresentou diferença estatística em dois pontos da curva glicêmica: no intervalo de 30 minutos após o estímulo (em que o grupo PINX-P1 apresentou um aumento de 20,58% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 17,14% em relação ao grupo PM-P1) e no intervalo de 60 minutos após estímulo (em que o grupo PINX-P1 apresentou um aumento de 21,53% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 8,40% em relação ao grupo PM-P1) (fig. 3C). Com relação à área sob a curva, os valores da prole de ratos machos PINX-P1 apresentou um aumento de 78,66% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 42,66% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 4D).

Na 18<sup>a</sup> semana de vida, no ZT3, os valores glicêmicos e a AUC obtida após o GTT na prole constituída de ratas fêmeas não apresentou diferença estatística em nenhum ponto do teste (fig. 5C e 5D). Quando realizado, ainda na 18<sup>a</sup> semana de vida, no ZT10, a glicemia da prole constituída de fêmeas apresentou diferença estatística em dois pontos na curva glicêmica: no intervalo 60 minutos após o estímulo (em que o grupo PINX-P1 apresentou um aumento de 33,40% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 21,69% em relação ao grupo PM-P1) e no intervalo 120 minutos após o estímulo (em que o grupo PINX-P1 apresentou um aumento de 32,8% em relação ao grupo SHAM e um aumento de 18,81% em relação ao grupo PM-P1) (fig. 5A). Com relação à área sob a curva, o

grupo PINX-P1 apresentou uma elevação de 49,26% em relação ao grupo SHAM-P1 e uma elevação de 55,53% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 5B).

Não houve diferenças significativas no  $K_{ITT}$  calculado a partir do teste de sensibilidade à insulina (ITT), realizado no ZT10, na 18ª semana de vida, tanto nos machos (fig. 6A, 6B) quanto nas fêmeas (fig. 6C, 6D).

A produção de glicose a partir do piruvato foi mensurada na 18ª semana de vida em ambos os grupos e em momentos diferentes do ciclo claro/escuro. Na prole constituída de machos, as diferenças pontuais na produção hepática a partir do piruvato ocorreram no intervalo 90 minutos após estímulo no ZT10 (em que o grupo PINX-P1 apresentou um aumento de 22,46% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 13,93% em relação ao grupo PM-P1) e no intervalo 120 minutos após estímulo (com um aumento de 22,13% do grupo PINX-P1 em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 10,52% em relação ao grupo PM-P1) (fig. 6A). Com relação à área sob a curva, o grupo PINX-P1 apresentou uma elevação de 75,22% em relação ao grupo SHAM-P1 e uma elevação de 46,49% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 7B).

A produção de glicose a partir do piruvato na prole constituída de fêmeas na 18ª semana de vida apresentou diferenças pontuais no tempo 60 minutos após estímulo no ZT10, em que os animais PINX-P1 apresentaram um aumento de 27,08% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 32,02% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 7C). Com relação à área sob a curva, o grupo PINX-P1 apresentou aumento de 145% em relação ao grupo SHAM-P1 e 135% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 7D). Quando o teste foi realizado na prole de machos com o

mesmo tempo de vida no ZT3, não houve diferença estatística na produção hepática de glicose a partir do piruvato entre os grupos (fig. 7E, 7F).

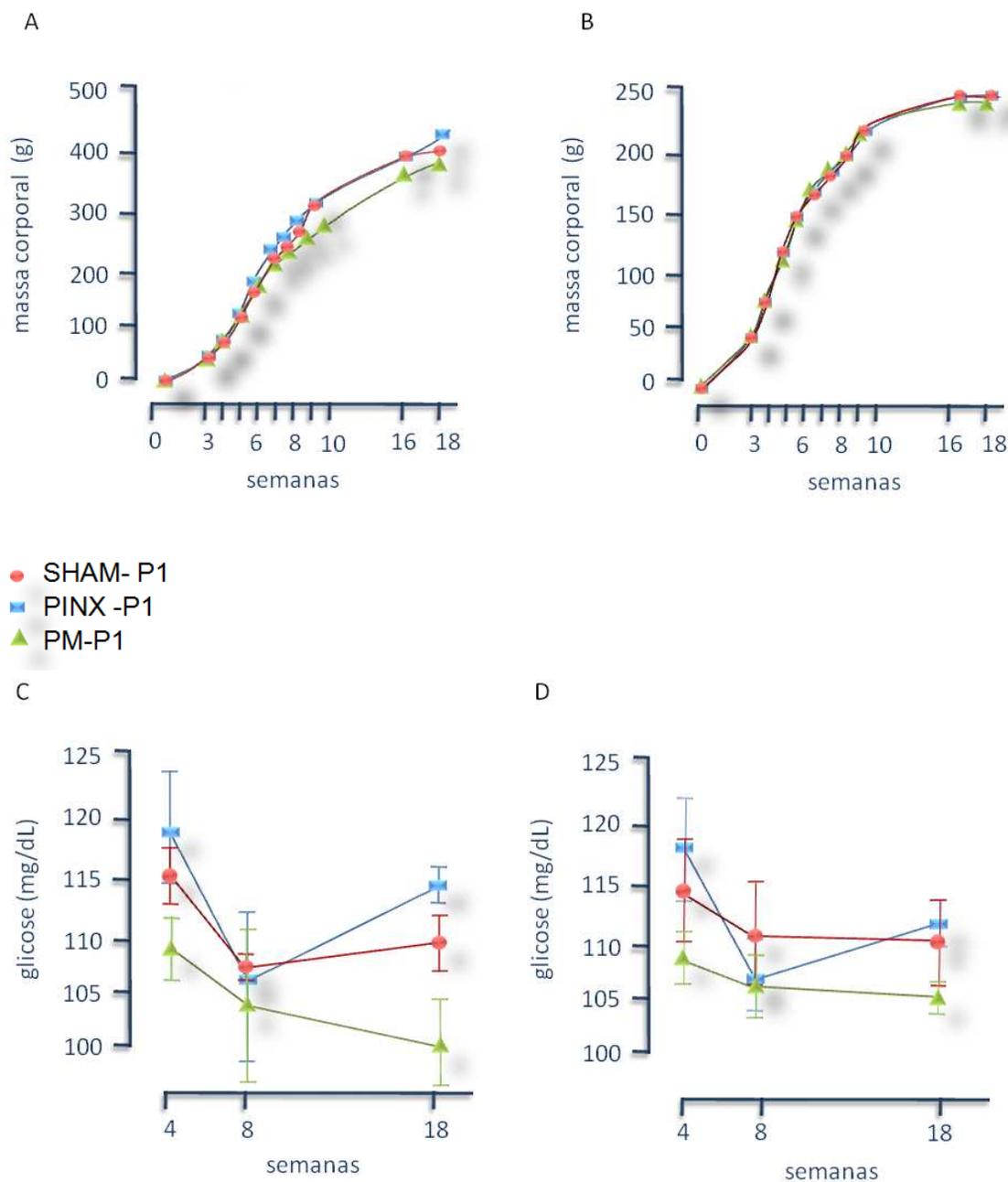
A secreção cumulativa estática de insulina foi mensurada na prole constituída de machos na 18ª semana de vida e no ZT10, apresentando diferença estatística quando estimulada com 11,1 e 16,7 mM de glicose. A secreção de insulina do grupo PINX-P1 apresentou uma diminuição de 68,77% em relação ao grupo SHAM-P1 e uma diminuição de 66,34% em relação ao grupo PM-P1 em ambos os estímulos (fig. 8).

Com relação à sinalização hepática na prole constituída de machos, esta foi realizada no ZT10 com os animais na 18ª semana de vida, sendo observado que a fosforilação em serina da AKT do grupo PINX-P1 apresentou uma diminuição de 28,83% em relação ao grupo SHAM-P1 e 29,09% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 9A, 9B). A quantidade total de AKT presente no tecido hepático não variou entre os grupos (fig. 9C, 9D). Concomitante à diminuição da AKT no grupo PINX-P1, a enzima gliconeogênica PEPCK apresentou um aumento de 199,46% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 33,20% em relação ao grupo PM-P1. O grupo PM-P1 apresentou um aumento de 124,81% em relação ao grupo SHAM-P1, havendo, portanto, uma reversão parcial nos níveis das enzimas gliconeogênica (fig. 9C, 9E).

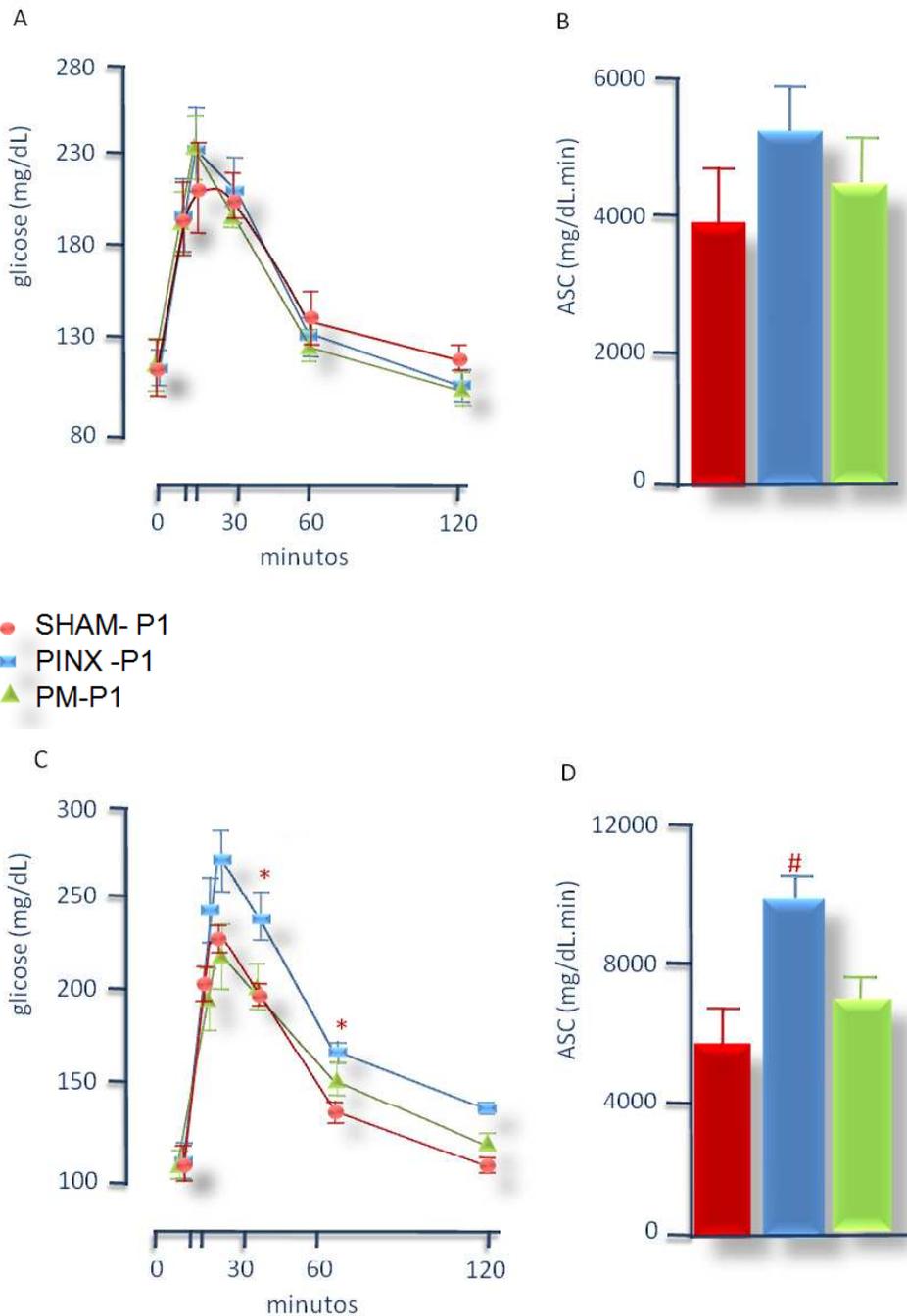
Quanto ao tecido hepático das fêmeas, ainda na 18ª semana de vida e ZT10, o grupo PINX-P1 apresentou um decréscimo de 41,39% na fosforilação em serina da AKT em relação ao grupo SHAM-P1 e 29,37% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 10 A, B). A quantidade total da proteína AKT não apresentou variação entre os grupos (fig. 10C, 10D). A PEPCK, nas fêmeas do grupo PM-P1, apresentou um

aumento de 41,68% em relação ao grupo SHAM-P1 e um aumento de 58,13% em relação ao grupo PM-P1 (fig. 10C, 10E).

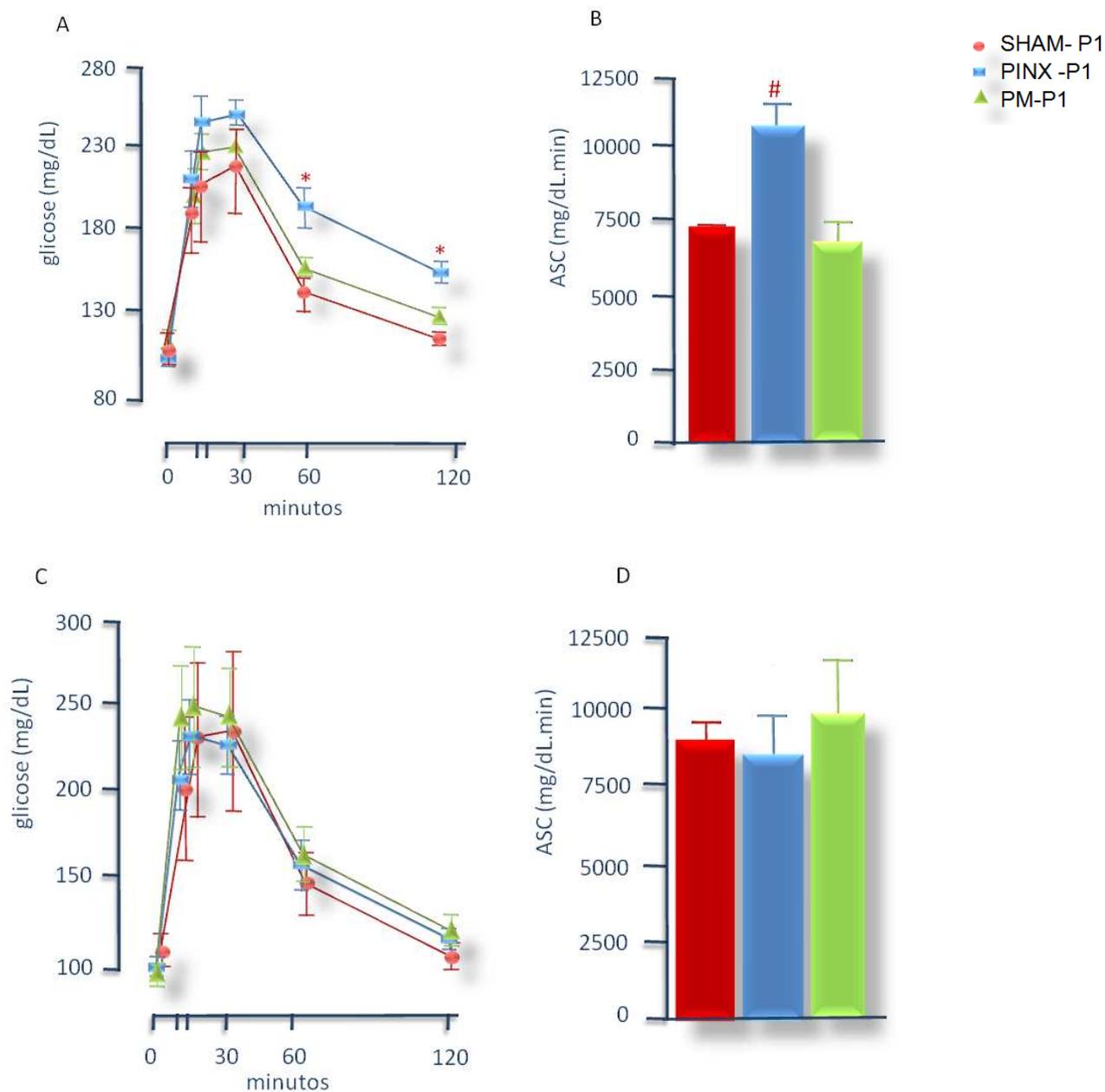
A sinalização da insulina em músculo esquelético, em ambos os grupos, na 18ª semana de vida e no ZT10, não apresentou diferença significativa entre os grupos, nas duas subunidades da proteína p-Tyr pp180/pp95 (fig. 11A, 11B e 11C), bem como na fosforilação da proteína AKT em serina (fig. 11D, 11E).



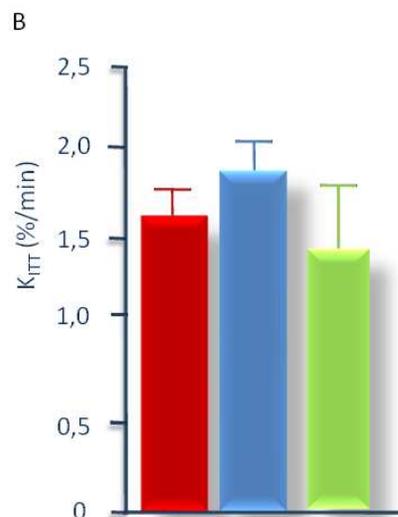
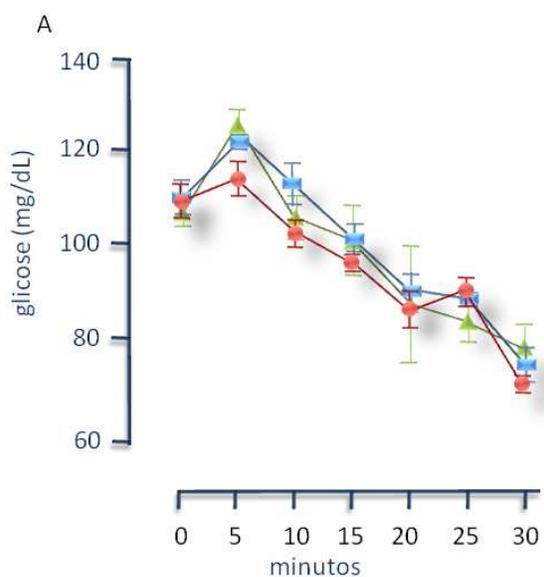
**Fig. 3:** Peso e glicemia basal de ratos machos e fêmeas SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. Macho (A) e Fêmea (B), SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. Os ratos foram pesados no segundo dia de vida e no final das 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas de vida. Glicemia do macho (C) e Fêmea (D), SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1, no final das 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas de vida, no ZT 10. Os dados apresentados são média ± EPM. \* < 0,05 vs semana 0 dentro do mesmo grupo



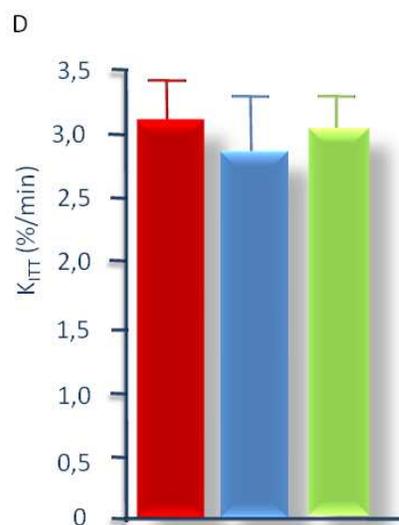
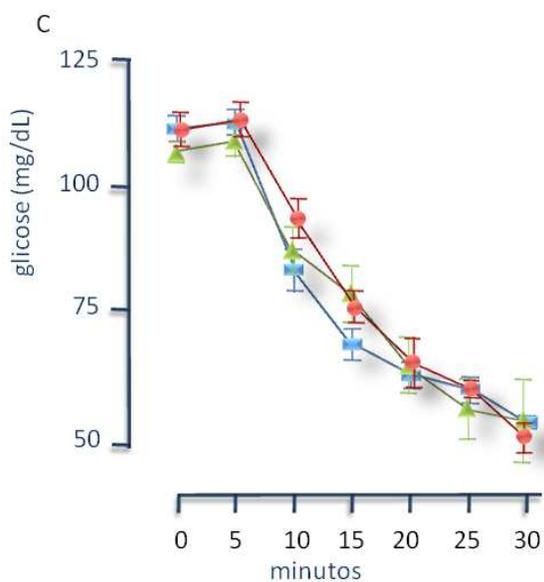
**Fig.4:** Tolerância à glicose em ratos machos dos grupos SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1, em diferentes momentos do ciclo claro/escuro. A glicemia de jejum foi medida e, logo após, os animais receberam uma injeção i.p. de glicose (2g/kg). A glicemia foi medida nos tempos 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção e a área sob a curva foi calculada. Os testes foram realizados na prole de machos no final das 8<sup>a</sup> (A e B) e 18<sup>a</sup> (C e D) semanas de vida no ZT10. Os dados são apresentados como média ± EPM. \* P<0.05 vs. SHAM-P1 ao mesmo tempo após injeção de glicose; # P<0.05 vs. SHAM-P1.



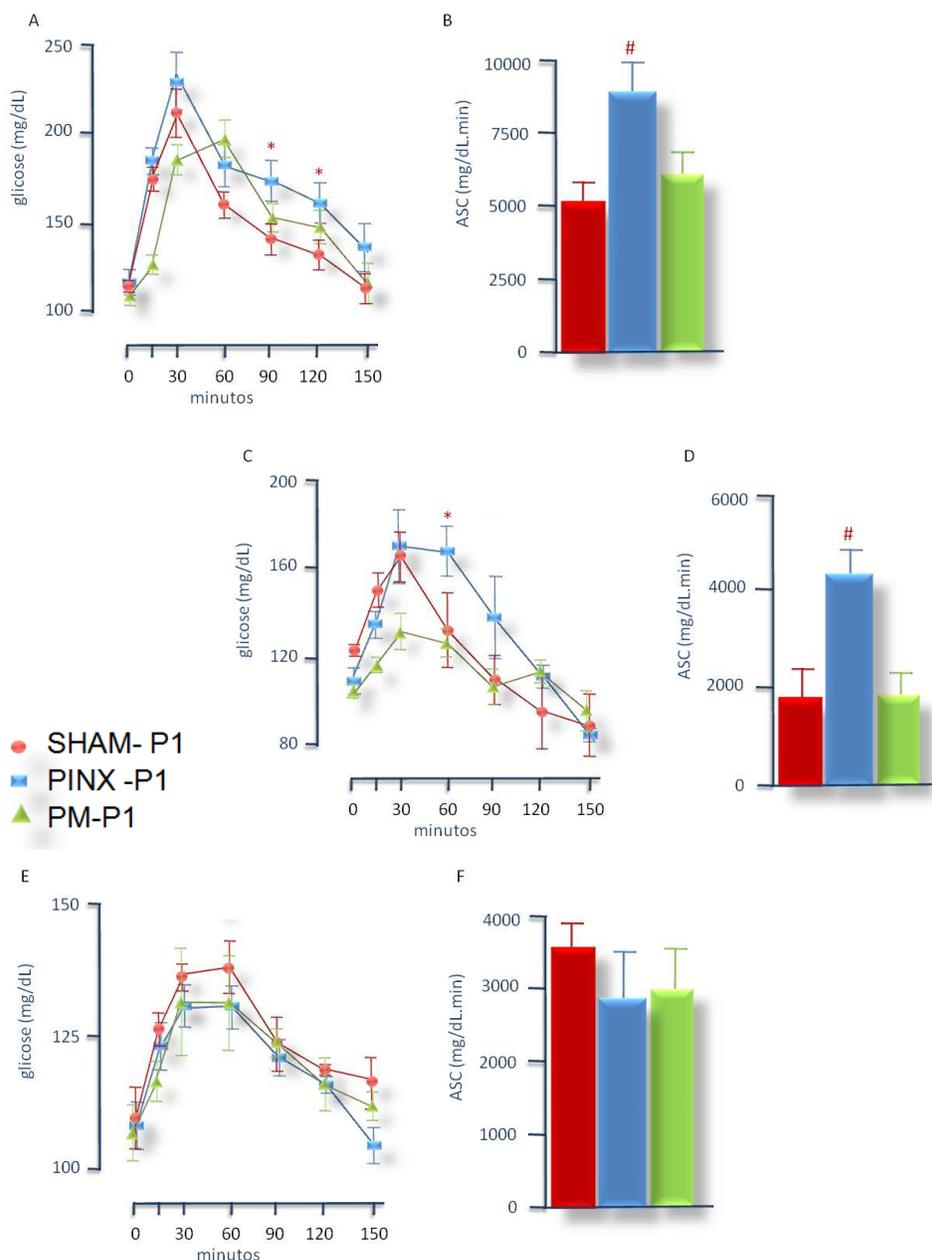
**Fig.5:** Tolerância à glicose em ratos dos grupos SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1, em diferentes momentos do ciclo claro/escuro. A glicemia de jejum foi medida e, logo após, os animais receberam uma injeção i.p. de glicose (2g/kg). A glicemia foi medida nos tempos 10, 15, 30, 60 e 120 minutos após injeção. Os valores da glicemia foram plotados em relação ao tempo após a injeção e a área sob a curva foi calculada. Os testes foram realizados na prole composta de fêmeas no final da 18<sup>a</sup> semana de vida no ZT 10 (A e B) e na prole composta de fêmeas na 18<sup>a</sup> semana de vida, no ZT 3 (C e D). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1 ao mesmo tempo após injeção de glicose; #  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1.



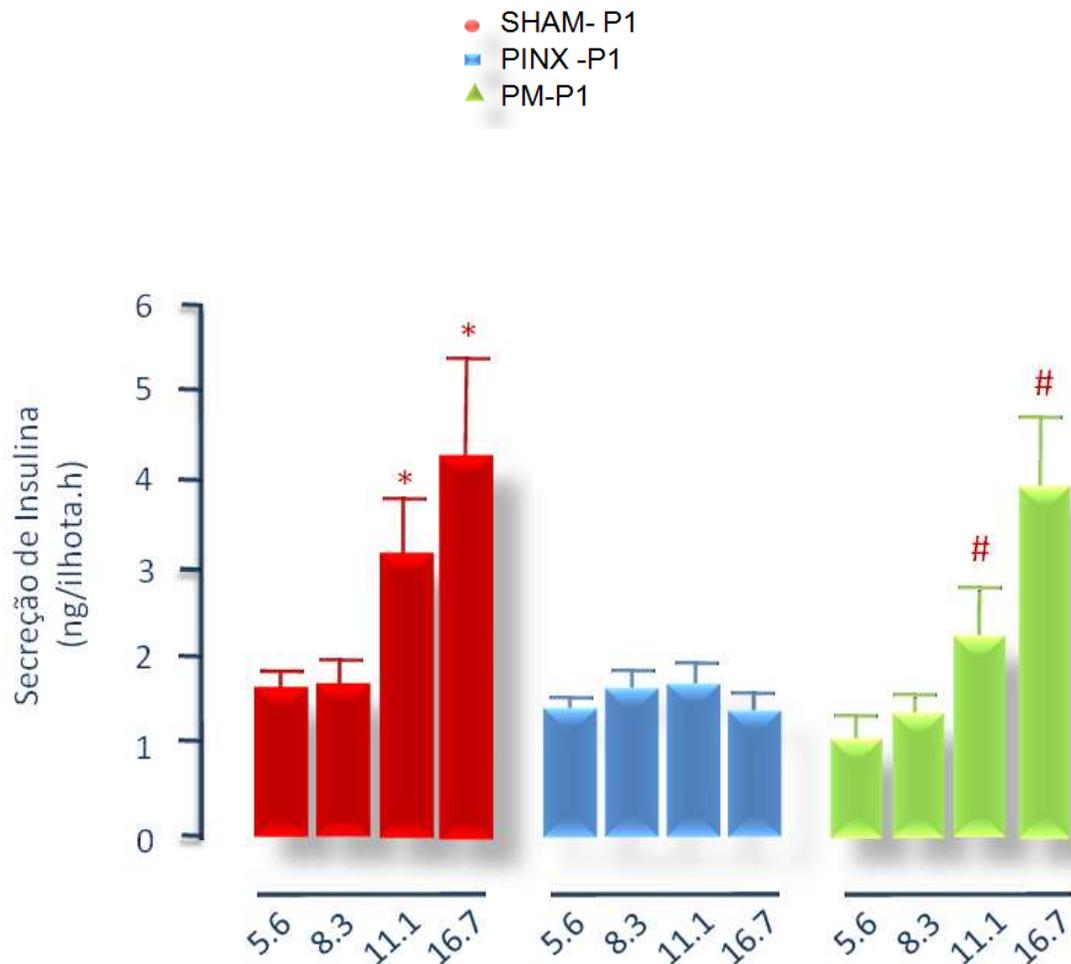
- SHAM-P1
- PINX-P1
- ▲ PM-P1



**Fig.6:** Sensibilidade à insulina em ratos machos e fêmeas SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. A glicemia de jejum foi medida e, logo após, os animais receberam uma injeção i.p. de insulina (2UI/kg). A glicemia foi medida nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção. Os valores da glicemia foram plotados em relação ao tempo após a injeção e o  $K_{ITT}$  foi calculado. Os testes foram realizados na prole de machos (A e B) e fêmeas (C e D) na 18ª semana de vida, ZT10. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

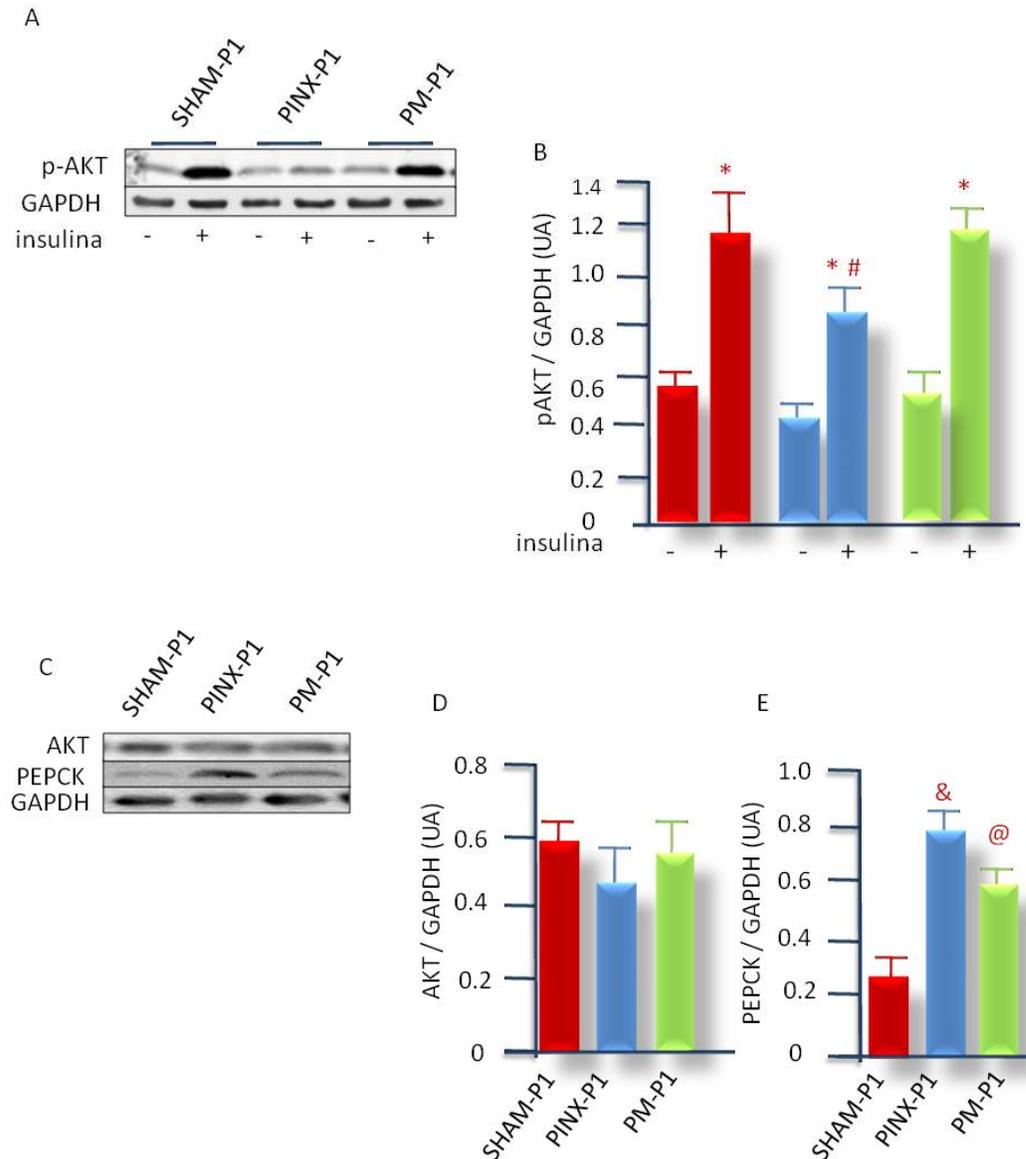


**Fig.7:** Produção de glicose a partir do piruvato de sódio em machos e fêmeas SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1 em diferentes momentos do ciclo claro/escuro. A glicemia de jejum foi medida e, logo após, os animais receberam uma injeção i.p. de piruvato de sódio (2g/kg). A glicemia foi medida nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após injeção. Os valores da glicemia foram plotados em relação ao tempo após a injeção e a área sob a curva foi calculada. Os testes foram realizados na prole de machos (A e B) e fêmeas (C e D) na 18ª semana de vida, no ZT 10. O mesmo teste foi realizado na prole de machos, 18ª semana de vida, no ZT 3 (E e F). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1 ao mesmo tempo após injeção de glicose; #  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1.

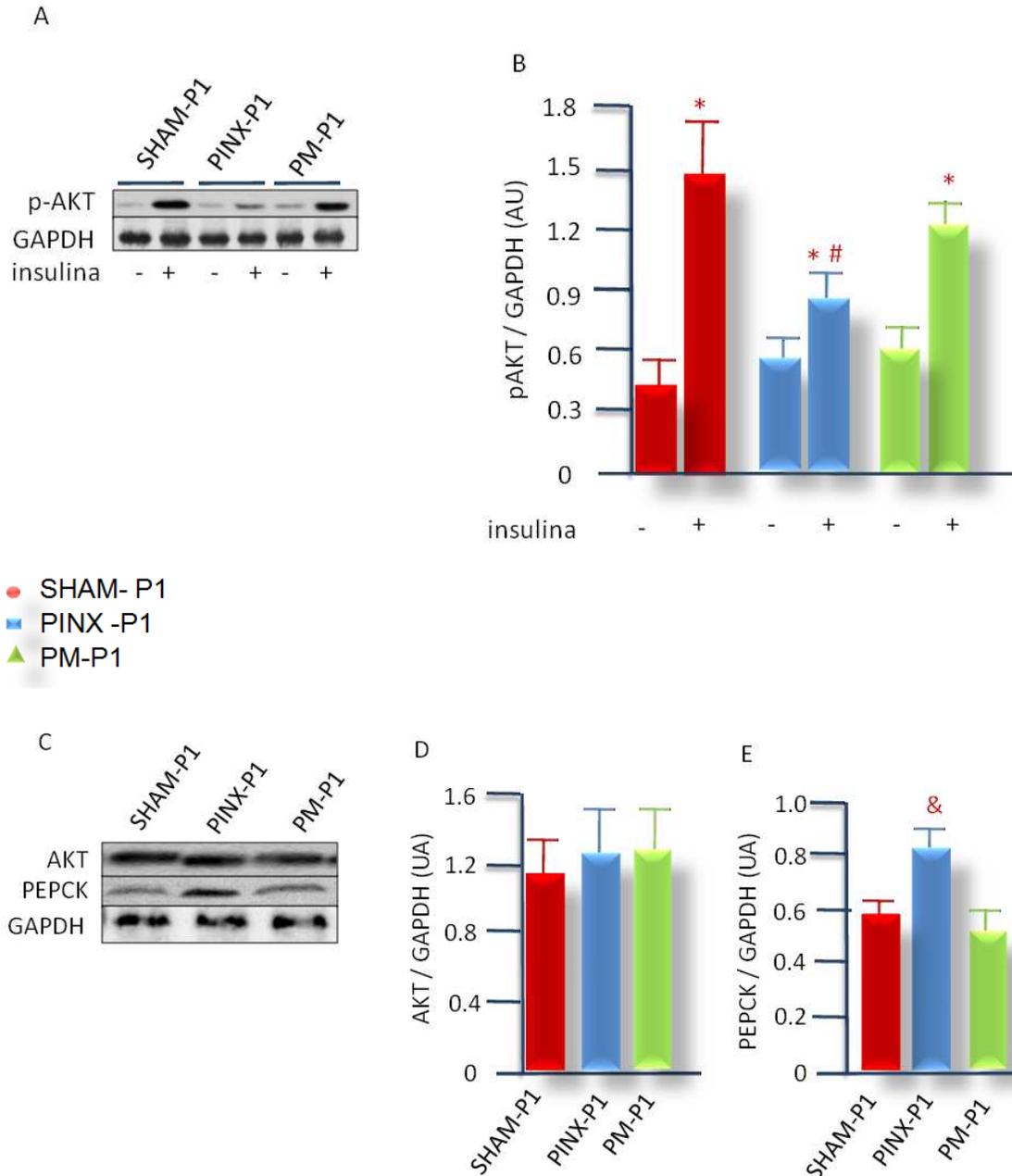


**Fig. 8:** Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas em ratos machos SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. A prole foi decapitada no ZT 10 e o pâncreas foi infundido com collagenase para isolamento das ilhotas. Após isolamento, um grupo de 5 ilhotas foi incubado por 45min a 37°C em uma solução tampão Krebs-bicarbonato, contendo 5,6 mM de glicose, equilibrada com 95% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, pH 7,4. A solução foi substituída por um tampão Krebs-bicarbonato novo e as ilhotas foram incubadas por 1 hora com meio contendo 5,6, 8,3, 11,1 ou 16,7 mM de glicose. A insulina foi quantificada por radioimunoensaio do sobrenadante. Os dados representam a secreção de insulina cumulativa ao longo de 1 hora e são dados com média ± EMP. \*P<0.05 vs. SHAM-P1 com 5,6 mM de glicose; #P<0.05 vs. PINX+MEL-P1 com 5,6 mM de glicose.

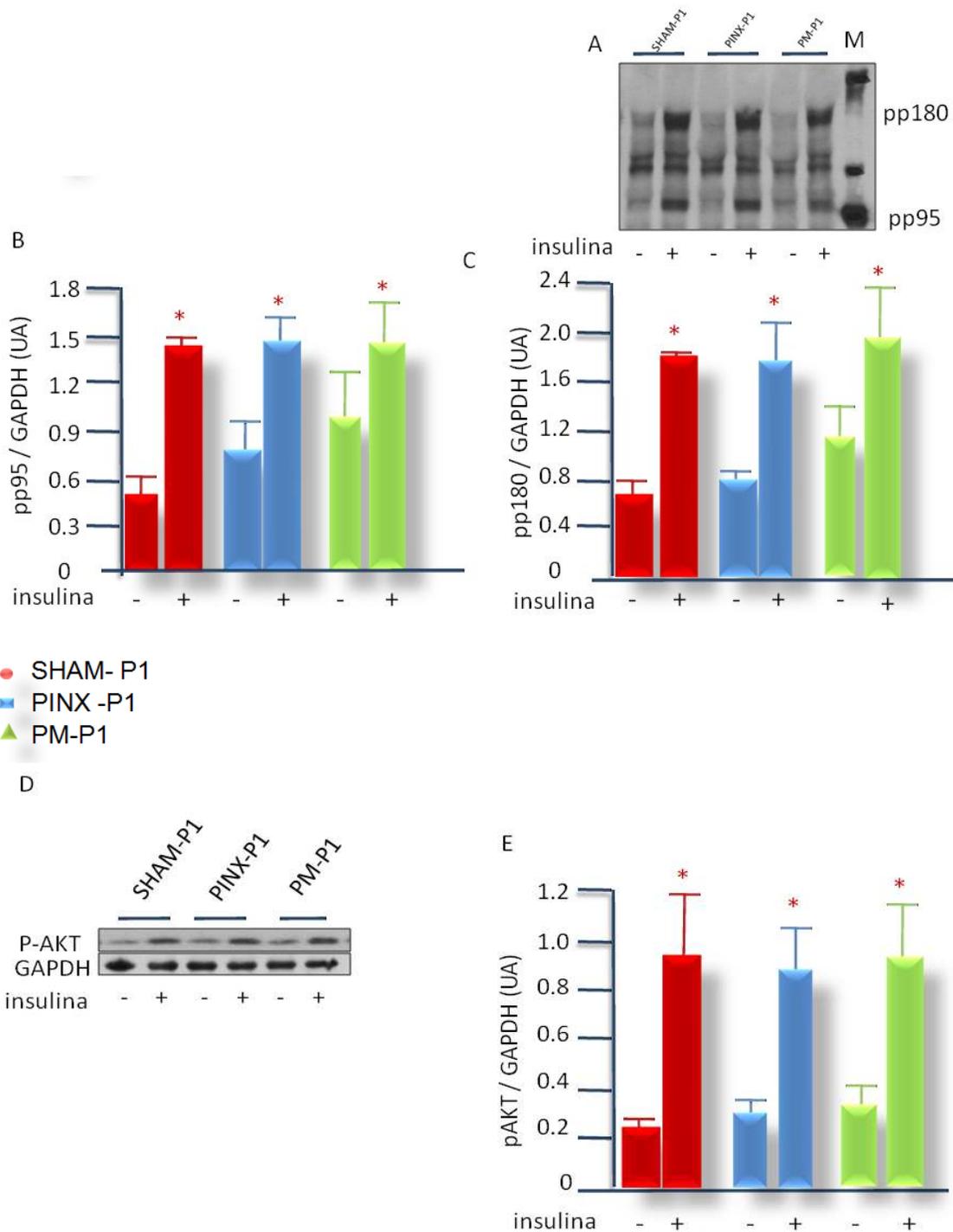
- SHAM-P1
- PINX-P1
- ▲ PM-P1



**Fig.9:** Sinalização da insulina nos fígados de ratos machos SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. A prole de machos na 18ª semana de vida foi anestesiada no ZT10, um fragmento do fígado foi retirado para detecção da fosforilação basal, um fragmento adicional do fígado foi retirado 30 segundos após injeção endovenosa de insulina. As amostras foram processadas para extração de proteínas e western blot de pAKT e GAPDH na prole de machos (A). Os valores obtidos para a pAKT foram normalizados pela GAPDH (B). Amostras usadas para fosforilação basal compuseram uma nova corrida e transferência para detecção por western blot de AKT, PEPCK e GAPDH em prole de machos (C). Os valores de AKT e PEPCK obtidos nos machos (D e E) foram normalizados com GAPDH. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  vs. não estimulado dentro do mesmo grupo; #  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1 estimulado com insulina; &  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1 não estimulado; @  $P < 0.05$  vs. PINX-P1 não estimulado.



**Fig.10:** Sinalização da insulina nos fígados de ratas SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. A prole de fêmeas na 18ª semana de vida foi anestesiada no ZT 10, um fragmento do fígado foi retirado para detecção da fosforilação basal, um fragmento adicional do fígado foi retirado 30 segundos após injeção endovenosa de insulina. As amostras foram processadas para extração de proteínas e western blot de pAKT e GAPDH na prole de fêmeas (A). Os valores obtidos nas fêmeas de pAKT foram normalizados pela GAPDH (B). Amostras usadas para fosforilação basal compuseram uma nova corrida e transferência para detecção por western blot de AKT, PEPCK e GAPDH em prole de fêmeas (C). Os valores de AKT e PEPCK obtido nas Fêmeas (D e E) foram normalizados com GAPDH. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0.05$  vs. não estimulado dentro do mesmo grupo; #  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1 estimulado com insulina; &  $P < 0.05$  vs. SHAM-P1 não estimulado; @  $P < 0.05$  vs. PINX-P1 não estimulado.



**Fig.11:** Sinalização da insulina em músculo esquelético de machos SHAM-P1, PINX-P1 e PM-P1. A prole de machos na 18ª semana de vida foi anestesiada no ZT 10 e um músculo esquelético sóleo foi retirado para detecção da fosforilação basal, o músculo remanescente foi retirado 90 segundos após injeção endovenosa de insulina. As amostras foram processadas para extração de proteínas e detecção por western blot de p-Tyr (A); pAKT e GAPDH (D). Os valores de tirosina fosforilada pp95 (B), pp185 (C) e pAKT (E) foram normalizados com GAPDH. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM \*  $P < 0.05$  vs. não estimulado dentro do mesmo grupo.

## Discussão

A melatonina materna no estado gravídico possui uma modulação a partir do 10º dia de gestação em ratas frente à quantidade de conceptos [47]. A ablação cirúrgica da glândula pineal materna desencadeia a ausência de pico noturno na prole análogo à genitora pinealectomizada nas primeiras semanas de vida [54].

Em modelo de subnutrição, ocorre aumento de radicais livres placentários e este repercute na prole que nasce com baixo peso, contudo a reposição de melatonina no decorrer gestacional reestabelece as enzimas antioxidantes placentárias melhorando o peso do neonato [43].

É fato que, com o capitalismo, os trabalhos em turnos estão mais frequentes em sociedades desenvolvidas. Tais atividades repercutem na saúde dos indivíduos, com alterações na secreção de diversos hormônios [42,32]. Pesquisas realizadas com trabalhadores em turno demonstram que nestes a melatonina está diminuída quando comparados a um trabalhador do turno diurno [14]. Ainda na mesma linha, Varcoe e colaboradores (2011) demonstraram que o turno durante a gestação programa a prole adulta à intolerância à glicose [53].

Os dados atuais corroboram para a propositura da hipótese de que a ruptura no ciclo claro/escuro, com conseqüente prejuízo na síntese de melatonina pela glândula pineal durante a gestação, altera a homeostasia glicêmica da prole adulta. No caso da presente pesquisa, a intolerância à glicose na prole advinda de mães pinealectomizadas foi perceptível na 18ª semana de vida e o resultado por nós descrito foi em período de vida anterior àquele encontrado por Varcoe *et al.*

[53], no qual a prole de ratas expostas a turnos variados durante a gestação manifestou intolerância à glicose após 12 meses de vida.

O grupo do Varcoe demonstrou que a prole oriunda de mães submetidas a phase shifts durante a gestação apresenta distúrbios metabólicos apenas no 12º mês de vida [53]. Os resultados aqui apresentados, no entanto, demonstram que a ausência total de melatonina durante a gestação e a lactação faz com que a prole manifeste distúrbios metabólicos muito mais precocemente, ao redor do 4º mês de vida. Tal diferença entre os estudos pode ser explicada pelo grau de interferência na síntese da melatonina. Deste modo, podemos especular que, nos nossos experimentos, observamos alterações mais precocemente na prole porque as mães estavam suprimidas completamente de melatonina, ao passo que, nos estudos de Varcoe, ocorria apenas mudança da fase/amplitude.

Nossos resultados demonstram que a ausência de melatonina, durante a gestação nas mães PINX, programa a prole adulta para intolerância à glicose. Este é, aliás, um fato constatado, pois, quando estas sofrem reposição de melatonina durante a gestação e a lactação, originando o grupo PM-P1, a prole apresenta um perfil glicêmico normal, sem intolerância à glicose.

Os ratos machos adultos, quando pinealectomizados, apresentam uma resistência à insulina no período de transição entre o ciclo claro/escuro [25]. De forma análoga, a prole originada de mães PINX apresentou a resistência hepática à insulina na mesma fase do ciclo, demonstrando, mais uma vez, que tal efeito metabólico é um resquício da ausência da melatonina materna. Acreditamos que a resistência gerada na prole seja efeito gerado pela descendência, com mecanismo similar ao que ocorre no animal adulto pinealectomizado.

Nossos resultados também demonstram que a geração oriunda de mães PINX se torna intolerante à glicose, em parte pela resistência hepática à insulina e gliconeogênese aumentada. Além disto, a fosforilação da AKT induzida pela insulina é um passo crucial para supressão da gliconeogênese, estando esse mecanismo prejudicado em filhos de mães PINX. Concordantemente, a PEPCCK, estava aumentada no fígado de filhos de mães PINX, resultado da resistência hepática na prole originada de mães PINX, o que vai ao encontro dos resultados anteriormente descritos em ratos pinealectomizados adultos. Os ratos adultos e a prole de mães PINX apresentam uma diminuição na fosforilação de AKT induzida pela insulina, aumento da expressão de PEPCCK e, conseqüentemente, aumento da gliconeogênese. No caso dos ratos adultos com ausência da glândula pineal, a resistência hepática à insulina ocorre por um aumento na pseudo kinase TRB3 com prejuízo na fosforilação de AKT [33]. Esse mecanismo ocorrido em ratos pinealectomizados com ação direta na AKT pode ser semelhantes ao encontrado na prole originada de mães PINX. Evidenciamos essa hipótese, pois não houve qualquer alteração da fosforilação em tirosina de IR ou IRS entre grupos.

A prole de PINX possui uma resistência hepática e um aumento de gliconeogênese também observados em ratos machos submetidos à pinealectomia, no entanto, nem todos os parâmetros metabólicos dos filhos de PINX se assemelham ao rato PINX adulto. Os animais PINX apresentam uma resistência sistêmica à insulina corporal, com diminuição nos valores do  $K_{ITT}$  e diminuição na expressão do GLUT4 em musculatura esquelética [55, 8]. Os filhos de PINX não demonstraram alteração no desaparecimento de glicose plasmática frente a um desafio com insulina, evidenciando que não houve desenvolvimento

de resistência sistêmica à insulina. Isto ocorre provavelmente porque, em nosso modelo, não há resistência à insulina na musculatura esquelética, uma vez que este território é responsável por cerca de 80% na captação de glicose estimulada por insulina [7].

Apoiamo-nos nessa propositura, uma vez que não houve alteração em IRS1/2 e AKT na musculatura esquelética dos filhos nascidos de mães PINX, sendo que a ativação de IRS1/2 e de AKT são nós críticos estimulados pela insulina para captação de glicose pelo tecido muscular esquelético [39, 4].

Outra característica que difere os animais PINX da prole de mães PINX é o padrão secretório de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas. A secreção de insulina estimulada por glicose em ratos PINX é regulada nos vários momentos do ciclo claro/escuro [40]. De fato, a melatonina mostrou possuir ação direta em células beta pancreáticas, com ação inibitória na secreção de insulina [38, 32].

Em contraste, nossos dados demonstraram que a prole oriunda de mães PINX apresenta uma menor secreção de insulina frente ao estímulo de glicose no ZT10, quando comparado com prole de mães SHAM no mesmo período. De forma concordante, os níveis de insulina foram reduzidos nos grupos PINX-P1, fato não constatado nos grupos PM-P1, no mesmo ZT.

O perfil secretório deficiente das ilhotas pancreáticas em PINX-P1 é consistente com a informação de que a melatonina se relaciona com a sinalização da PI3K/AKT, bem como de MERK/ERK, implicando, assim, o controle de proliferação ou apoptose em células beta pancreáticas [40]. É possível que a ausência de melatonina no ambiente intrauterino e no início da vida, com

consequente diminuição da via de sinalização, influencie no fenótipo pancreático do indivíduo quando adulto.

Embora a descrição do mecanismo pelo qual a ausência de melatonina causa intolerância à glicose em ratos oriundos de mães PINX não seja o foco do nosso trabalho, acreditamos que o aumento da corticosterona plasmática no início da vida seja um provável mecanismo para os fenômenos aqui descritos [52, 11]. Anteriormente, foi demonstrado que a prole de primatas cujas mães foram expostas à luz contínua durante a gestação apresentam um aumento de cortisol no quarto dia de vida, no entanto, se a mãe, mesmo sob luz contínua durante o transcorrer gestacional foi suplementada com melatonina, este perfil desaparece na prole [50].

Há ainda estudos que demonstram que a melatonina materna é capaz de suprimir a produção de cortisol induzida por ACTH, sendo esse mecanismo dependente da ativação de receptores MT1/2 alocados na glândula adrenal [49]. Em adição a esses dados e baseando-se em glândulas adrenais de primatas, a melatonina tem demonstrado diminuir a expressão da proteína regulatória aguda estereogênica (Star), passo limitante para a síntese de glicocorticóide, em cultura de glândulas adrenais de fetos de ratos [51]. Notadamente, a exposição a glicocorticóides, tardiamente no transcorrer gestacional, programa o feto ao aumento da expressão da PEPCCK, promovendo a intolerância hepática à glicose tardiamente na prole [34].

## **Conclusão**

Concluindo, nós mostramos que a ausência de melatonina materna, durante a gestação e a lactação, programa intolerância à glicose na prole por dois mecanismos: resistência hepática à insulina e diminuição da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas.

Esses dados revelam ainda um papel desconhecido da melatonina na fisiologia animal, podendo desequilibrar a homeostasia da glicose na prole quando há qualquer dessincronização frente ao ciclo claro/escuro, como os trabalhos em turnos.

Além disso, a presente pesquisa fornece informações básicas que suportam estudos epidemiológicos em descendentes nascidos de mães submetidas à luz durante a noite, como ocorre em trabalhos em turnos.

# Anexo



CEUA/Unicamp

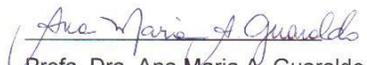
## Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

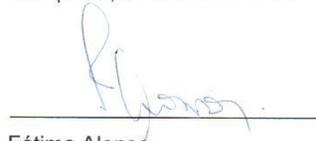
### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Investigação da repercussão metabólica na prole adulta constituída de ratos machos gerados a partir de mães com ausência de melatonina durante a gestação e/ou lactação" (protocolo nº 2324-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô / Danilo da Silva Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de fevereiro de 2011.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## Referências

1. ADAN, A.; ARCHER, S.N.; HIDALGO, M.P.; Di MILIA, L.; NATALE, V.; RANDLER, C. (2012). Circadian typology: a comprehensive review. *29(9):1153-75*.
2. ALONSO-VALE, M.I.; BORGES-SILVA, C.N.; ANHÊ, G.F.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M.A.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F.B. (2004). Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. *Hormone and Metabolic Research*, v.36, n.7, p. 474-479.
3. BAE, S.S.; CHO, H.; MU,J.; BIRNBAUM, M.J. (2003). Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 49530–49536.
4. BIRKETVEDT, G.S.; FLORHOLMEN, J.; SUNDSFJORD, J.; OSTERUD, B.; DINGES, D.; BILKER, W.; STUNKARD, A. (1999) Behavioral and neuroendocrine characteristics of the night-eating syndrome. *JAMA*. v.282, n. 7, p.657-63.
5. BONADONNA, R.C.; Del PRATO, S.; SACCOMANI, M.P.; BONORA, E.; GULLI, G. *et al.* (1993). Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with noninsulin-dependent diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 92: 486–494.
6. BONORA, E.; MANICARDI, V.; ZAVARONI, I.; COSCELLI, C.; BUTTURINI, U. (1987), Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes & Metabolism*, 13: 116–12.
7. BORJIGIN, J.; LI, X.; SNYDER, S.H. (1999). The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39: 53-65.
8. BUXTON, O.M.; CAIN, S.W.; O'CONNOR, S.P.; PORTER, J.H.; DUFFY, J.F.; WANG, W.; CZEISLER, C.A.; SHEA, S.A. (2012). Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Science Translational Medicine*, 4, 129ra43.
9. CAPERUTO, L.C.; ANHÊ, G.F.; CAMBIAGHI, T.D.; AKAMINE, E.H.; do CARMO BUONFIGLIO, D. *et al.* (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*, 149: 6326–6335.
10. CIPOLLA-NETO, J.; SKORUPA, A.L.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; BARTOL, I.; MOTA, S.R.; AFECHE, S.C.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA-LEMAÎTRE, B.; CANTERAS, N.S. (1999). The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. *Neuroendocrinology*, 69: (2), 97-104.

11. DRIJFHOUT, W.J.; BRONS, H.F.; OAKLEY, N.; HAGAN, R.M.; GROL, C.J. *et al.* (1997) A microdialysis study on pineal melatonin rhythms in rats after an 8-h phase advance: new characteristics of the underlying pacemaker. *Neuroscience*, 80: 233–239.
12. DUBOCOVICH, M.L.; DELAGRANGE, P.; KRAUSE, D.N.; SUGDEN, D.; CARDINALI, D.P.; OLCESE, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacological Reviews*. 62: 343–380.
13. DUMONT, M.; LANCTÔ, T. V.; CADIEUX-VIAU, R.; PAQUET, J. (2012) Melatonin production and light exposure of rotating night workers. *Chronobiology International*, 29: 203–210.
14. FLEGAL, K.M.; CARROLL, M.D.; KUCZMARSKI, R.J.; JOHNSON, C.L. (1998). Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v.22, p.39–47.
15. FOSTER, G.D.; WYATT, H.R.; HILL, J.O.; McGUICKIN, B.G.; BRILL, C.; MOHAMMED, B.S.; SZAPARY, P.O.; RADER, D.J.; EDMAN, J.S.; KLEIN, S.A. (2003). Randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *New England Journal of Medicine*, v.348, p.2082–2090.
16. GEORGE, L.A.; ZHANG, L.; TUIERSUNJIANG, N.; MA, Y.; LONG, N.M.; UTHLAUT, A.B.; SMITH, D.T.; NATHANIELSZ, P.W.; FORD, S.P. (2012). Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v.302, n.7, p.795-804.
17. GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MADRID, J.A.; ORDOVÁS, J.M.; GARAULET, M. (2012). Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology and Nutrology.*, 59(1): 50-61.
18. GUARDIOLA-LEMAÎTRE, B.; QUERA-SALVA, M.A. Melatonin and the regulation of sleep and circadian rhythm. *Chronobiology*, 36: 420-430.
19. HARRINGTON, J.; LEE-CHIONG, T. (2012). Basic biology of sleep. *Dental Clinics of North America*, 56(2): 319-30.
20. HAUS, E. (2007). Chronobiology in the endocrine system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 985–1014.
21. HUANG, C.; THIRONE, A.C.; HUANG, X.; KLIP, A. (2005) Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 19426–19435.

22. KRÄUCHI, K.; CAJOCHE, C.; PACHE, M.; FLAMMER, J.; WIRZ-JUSTICE, A. (2006). Thermoregulatory effects of melatonin in relation to sleepiness. *Chronobiology International*, 23(1-2): 475-84.
23. La FLEUR, S.E.; KALSBECK, A.; WORTEL, J.; van der VLIET, J.; BUIJS, R.M. (2001). Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(12): 1025-32.
24. LIMA, F.B.; MATSUSHITA, D.H.; HELL, N.S.; DOLNIKOFF, M.S.; OKAMOTO, M.M.; CIPOLLA-NETO, J. (1994). The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of periodicity of food intake, time of the day and melatonin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.27: 995-1000.
25. LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H. *et al.* (1998) Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *American Journal of Physiology*, 275: E934–E941
26. LINCOLN, G.A.; JOHNSTON, J.D.; ANDERSSON, H.; WAGNER, G.; HAZLERIGG, D.G. (2005). Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology*, 146(9): 3782-90.
27. LO, S.H.; LIAU, C.S.; HWANG, J.S.; WANG, J.D. (2008). Dynamic blood pressure changes and recovery under different work shifts in young women. *American Journal of Hypertension*, 21(7): 759-64.
28. MANENSCHIJN, L.; van KRUYBERGEN, R.G.; de JONG, F.H.; KOPER, J.W.; van ROSSUM, E.F. (2011) Shift work at young age is associated with elevated long-term cortisol levels and body mass index. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96: E1862–E1865
29. MONTE, S.; VALENTI, O.; GIORGIO, E.; RENDA, E.; HYSENI, E.; FARACI, M.; De DOMENICO, R.; Di PRIMA, F.A. (2011) Maternal weight gain during pregnancy and neonatal birth weight: a review of the literature. *Journal of Prenatal Medicine*, 5(2): 27-30.
30. MOSZCZYNSKIA, A.; MURRAY, B.J. (2012). Neurobiological aspects of sleep physiology. *Neurol Clin.* In press.
31. MOKDAD, A.H.; FORD, E.S.; BOWMAN, B.A.; NELSON, D.E.; ENGELGAU, M.M.; VINICOR, F.; MARKS, J.S. (2000) Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care*, v.23: 1278–1283.
32. MÜHLBAUER, E.; ALBRECHT, E.; HOFMANN, K.; BAZWINSKY-WUTSCHKE, I.; PESCHKE, E. (2011) Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma b-cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2. *Journal of Pineal Research*, 51: 361–372.

33. NOGUEIRA, T.C.; LELLIS-SANTOS, C.; JESUS, D.S.; TANEDA, M.; RODRIGUES, S.C. *et al.* (2011) Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. *Endocrinology*, 152: 1253–1263.
34. NYIRENDA, M.J.; LINDSAY, R.S.; KENYON, C.J.; BURCHELL, A.; SECKL, J.R. (1998) Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 2174–2181.
35. OZAKI, Y.; LYNCH, H.J. (1976). Presence of melatonin in plasma and urine or pinealectomized rats. *Endocrinology*, 99(2): 641-4.
36. PAN, A.; SCHERNHAMMER, E.S.; SUN, Q.; HU, F.B. (2011). Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Medicine*, dec., 8(12): e1001141.
37. PANDA, S.; NAYAK, S.K.; CAMPO, B.; WALKER, J.R.; HOGENESCH, J.B.; JEGLA, T. (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*, 28; 307(5709): 600-4.
38. PICINATO, M.C.; HABER, E.P.; CARPINELLI, A.R.; CIPOLLA-NETO, J. (2002) Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *Journal of Pineal Research*, 33: 172–177.
39. PICINATO, M.C.; HABER, E.P.; CIPOLLA-NETO, J., CURI, R.; de OLIVEIRA CARVALHO, C.R. *et al.* (2002) Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*, 33: 156–160.
40. PICINATO, M.C.; HIRATA, A.E.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; de OLIVEIRA CARVALHO, C.R. *et al.* (2008) Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*, 44: 88–94.
41. PINNEY, S.E.; SIMMONS, R.A. (2010). Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. *Trends Endocrinology & Metabolism*, v.21, n.4: 223-229.
42. PLoS Medicine Editors (2011) Poor diet in shift workers: a new occupational health hazard? *PLoS Medicine*, 8: e1001152.
43. RICHTER, H.G.; HANSELL, J.A.; RAUT, S.; GIUSSANI, D.A. (2009) Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. *Journal of Pineal Research*, 46: 357–364.
44. SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology*, v.12, n.2: 65-71.

45. STANDRING, S. (Ed.) *Grey's anatomia: A base anatômica da prática clínica*. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
46. SUGDEN, D. (1989). Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*, 45(10): 922-32.
47. TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; NAKAMURA, Y.; REITER, R.J.; SUGINO, N. (2008). Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *Journal of Pineal Research*, 44: 335–340
48. TANIGUCHI, C.M; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Review Molecular Cell Biology*, v.7, n.2: 85-96.
49. TORRES-FARFAN, C.; RICHTER, H.G.; ROJAS-GARCÍA, P.; VERGARA, M.; FORCELEDO, M.L. *et al.* (2003) mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88: 450–458.
50. TORRES-FARFAN, C.; RICHTER, H.G.; GERMAIN, A.M.; VALENZUELA, G.J.; CAMPINO, C. *et al.* (2004) Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *Journal of Physiology*, 554: 841–856.
51. TORRES-FARFAN, C.; MENDEZ, N.; ABARZUA-CATALAN, L.; VILCHES, N.; VALENZUELA, G.J. *et al.* (2011) A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal. *Endocrinology*, 152: 1891–1900.
52. TROTTIER, G.; KOSKI, K.G.; BRUN, T.; TOUFEXIS, D.J; RICHARD, D.; WALKER, C.D. (1998). Increased Fat Intake during Lactation Modifies Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responsiveness in Developing Rat Pups: A Possible Role for Leptin. *Endocrinology*, v.139: 3704–3711.
53. VARCOE, T.J.; WIGHT, N.; VOULTSIOS, A.; SALKELD, M.D.; KENNAWAY, D.J. (2011) Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat. *PLoS One*, 6: e18504.
54. YELLON, S.M.; LONGO, L.D. (1988).Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. *Biology of Reproduction*, 39(5): 1093-9.
55. ZANQUETTA, M.M.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U.F. (2003). Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *Journal of Pineal Research*, 35: 141–148.
56. ZHANG, J.; LEWIS, R.M.; WANG, C.; HALES, N.; BYRNE, C.D. (2005) Maternal dietary iron restriction modulates hepatic lipid metabolism in the

- fetuses. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Compative Physiology*, v.288: 104–111.
57. ZUGAIB, M. (2012). Obesidade materna em gestações de alto risco e complicações infecciosas no puerpério. *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 58, no.4.