

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Brenda Akemi Nagagata Franklin de Mattos

Suplementação de melatonina em mães obesas: Efeitos na ilhota pancreática, tecido adiposo branco e marrom, e hipotálamo na prole adulta de machos

> Rio de Janeiro 2024

Brenda Akemi Nagagata Franklin de Mattos

Suplementação de melatonina em mães obesas: Efeitos na ilhota pancreática, tecido adiposo branco e marrom, e hipotálamo na prole adulta de machos

> Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro 2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N147 Nagagata, Brenda Akemi.

Suplementação de melatonina em mães obesas: Efeitos na ilhota pancreática, tecido adiposo branco e marrom, e hipotálamo na prole adulta de machos / Brenda Akemi Nagagata. – 2024. 95 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade materna – Complicações. 2. Melatonina – Uso terapêutico – Teses. 3. Desenvolvimento fetal – Nutrição – Teses. 4. Saúde do adulto – Nutrição – Teses. I. Lacerda, Marcia Barbosa Águila Mandarim de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.015.4

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Brenda Akemi Nagagata Franklin de Mattos

Suplementação de melatonina em mães obesas: Efeitos na ilhota pancreática, tecido adiposo branco e marrom, e hipotálamo na prole adulta de machos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de junho de 2024.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (orientadora) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Isabele Bringhenti Sarmento Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dra. Karina dos Santos Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Dedico ao Thalison, Manu, Cat, Allan e Athenicua por serem meu coração fora do peito e meu Norte para nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo amor.

Ao Thalison Pinho, pelo ser minha fonte inesgotável de força, amparo e amor. Obrigada por ser meu melhor amigo e meu lar. Aos meus irmãos e afilhada por serem meu motivo de chegar até aqui.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr^a Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda, primeiro pela confiança. Mas, além de tudo por ter acreditado na Brenda com 17 anos, que não sabia de absolutamente nada, mas se jogou de peito aberto na pesquisa. Professora, ter a senhora comigo, desde o início me fez uma profissional melhor. A disciplina de anatomia, me aproximou do laboratório e graças a senhora, pude encontrar a carreira que queria seguir à docência e a pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, pela oportunidade e por todo amparo desde a iniciação científica, pelo período que fui residente e agora no doutorado. Sou grata pela história que construímos juntas e tenho uma enorme admiração e carinho pela senhora.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda obrigada pelo incentivo, por dispor de recursos, sua disponibilidade e diálogo, seus ensinamentos, estímulos constantes ao aperfeiçoamento e conhecimento. Por ter me capacitado dia a pós dia desses anos a me tornar uma pesquisadora melhor.

E, claro que não haveria uma pesquisadora em mim se não fosse a semente plantada pela minha coorientadora do doutorado e de toda a minha graduação Prof.^a Dr^a Fernanda Ornellas. Obrigada pela orientação, mas obrigada mesmo pela sua amizade e por ter plantado em mim a semente da pesquisa e da docência, desde que te conheci eu sonhei mais alto.

Esse trabalho, que eu tenho tanta felicidade de ter realizado, que é meu objeto de estudo desde a IC, não teria sido executado de maneira tão linda se eu não tivesse a minha eterna dupla Matheus Ajackson.

Agradeço a Aline Penna, Thatiany Marinho e Andrea Bertoldo por todo o amparo técnico e científico durante esses quase quatro anos.

À Renata Spezani e Ilitch Aquino pelo suporte e amizade.

À Gabrielle Brito, por ter sido muito mais que uma IC, por ter me permitido passar tudo que aprendi e por ter levado adiante com maestria grande parte dos meus experimentos.

Agradeço aos colegas e professores do LMMC pelas trocas, comemorações e ajuda nos momentos de dificuldade.

As minhas estagiárias Anna, Andressa, Tamires e Isabelle pela ajuda e por permitirem ensinar o que um dia aprendi.

Aos meus amigos da vida, obrigada por permanecerem, sou melhor por ter vocês aqui.

Quase quatro anos depois do dia que iniciei o desafio de fazer o doutorado, a realização de um sonho que eu nem sabia quando chegaria e chegou... Tão intensamente e tão de repente e eu não seria capaz de fazer essa travessia, se não fossem as pessoas que tanto amo e tanto admiro me fortalecendo para seguir. No meu peito a gratidão transborda e eu agradeço ao universo, por nunca ter me deixado só.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, CNPq e FAPERJ.

Eu disse sim pro mundo Eu disse sim pro sonhos E pra tudo que eu não previa Sim pro inexplicável Eu disse sim, eu caso Eu disse sim pra tudo que eu podia E eu podia mais do que eu sabia

Sandy

RESUMO

NAGAGATA, Brenda Akemi. **Suplementação de melatonina em mães obesas: Efeitos na ilhota pancreática, tecido adiposo branco e marrom, e hipotálamo na prole adulta de machos**. 2024. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O estudo foi projetado para investigar possível efeitos da suplementação de melatonina às mães com obesidade e a saúde dos filhos quando adultos. Métodos: Fêmeas C57Bl/6 (mães) foram divididas em dois grupos com base na dieta: controle (C, 17% kJ lipídio) ou hiperlipídica (HF, 49% kJ lipídio) e acasaladas com machos alimentados com dieta controle. Durante a gestação e a lactação, metade das mães C e HF recebeu suplementação diária de melatonina (10 mg/kg), enquanto a outra metade recebeu igual volume de veículo, formando os grupos C, CMel, HF e HFMel (n=10/grupo). Após o desmame e até 12 semanas de idade, os filhotes receberam apenas a dieta C. Foram analisados a biometria, bioquímica plasmática, imunohistoquímica, a expressão gênica da ilhota pancreática, do tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) e tecido adiposo marrom interescapular (TAMi), a expressão de proteínas e genes no hipotálamo. Resultados: As mães HF e seus filhotes apresentaram maior massa corporal, intolerância à glicose, resistência à insulina e menor sensibilidade à insulina em comparação com as mães C e seus filhotes. No entanto, mães e filhotes HFMel mostraram melhorias significativas no metabolismo da glicose e redução da massa corporal em comparação com as mães e filhotes HF. Na ilhota pancreática dos filhotes, observou-se aumento nos marcadores pró-inflamatórios e de estresse de retículo endoplasmático (RE) nos filhotes HF, com redução nos filhotes HFMel e as enzimas antioxidantes foram menos expressas nos filhotes HF, mas aumentaram nos filhotes HFMel. Além disso, houve aumento da massa de células beta e hipersecreção de insulina nos filhotes HF, enquanto os filhotes HFMel apresentaram diminuição desses parâmetros. Comparando os filhotes HFMel com os filhotes HF, houve redução nos depósitos de gordura e nos marcadores pró-inflamatórios plasmáticos, e os adipócitos do TABs apresentaram fenótipo bege, acompanhado pela ativação do receptor beta-3 adrenérgico e da UCP-1, compatível com atividade termogênica do TAMi. Filhotes HFMel também mostraram redução nos marcadores de neuroinflamação no hipotálamo e diminuição da expressão gênica e proteica do neuropeptídeo Y (NPY, anabólico) e aumento da expressão gênica de proopiomelanocortina (POMC, catabólico). A análise dos componentes principais (ACP) separou os filhotes HF dos filhotes HFMel, indicando o benefício da suplementação materna com melatonina. Conclusão: Os efeitos benéficos da suplementação de melatonina em mães com obesidade refletiram-se, nos filhotes adultos, no remodelamento e na função das ilhotas pancreáticas mais adequados, com redução da inflamação, estresse oxidativo e estresse do RE, resultando em um melhor controle dos níveis de glicose e insulina nas ilhotas pancreáticas. Adicionalmente, a melatonina contribuiu para o aumento do amarronzamento do TABs, aprimorou a termogênese no TAMi e mitigou a inflamação no hipotálamo e nos neurotransmissores reguladores do apetite.

Palavras-chave: DOHaD; melatonina; ilhota pancreática; tecido adiposo; hipotálamo.

ABSTRACT

NAGAGATA, Brenda Akemi. *Melatonin supplementation in obese mothers: Effects on pancreatic islets, white and brown adipose tissue, and hypothalamus in adult male offspring.* 2024. 95 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The study was designed to investigate the potential effects of melatonin supplementation in obese mothers on the health of their offspring in adulthood. Methods: Female C57B1/6 mice (mothers) were divided into two groups based on diet: control (C, 17% kJ lipid) or high-fat (HF, 49% kJ lipid) and mated with males fed a control diet. During pregnancy and lactation, half of the C and HF mothers received daily melatonin supplementation (10 mg/kg), while the other half received an equal volume of vehicle, forming the groups C, CMel, HF, and HFMel (n=10/group). After weaning and until 12 weeks of age, offspring received only the C diet. Biometrics, plasma biochemistry, immunohistochemistry, gene expression in pancreatic islets, subcutaneous white adipose tissue (sWAT), and inter-scapular brown adipose tissue (iBAT), and protein and gene expression in the hypothalamus were analyzed. Results: HF mothers and their offspring showed higher body mass, glucose intolerance, insulin resistance, and lower insulin sensitivity compared to C mothers and their offspring. However, HFMel mothers and offspring showed significant improvements in glucose metabolism and reduced mass compared to HF mothers and offspring. In the pancreatic islets, increased pro-inflammatory and endoplasmic reticulum (ER) stress markers were observed in HF offspring, with reductions in HFMel offspring, and antioxidant enzymes were less expressed in HF offspring but increased in HFMel offspring. Additionally, there was an increase in beta-cell mass and hypersecretion of insulin in HF offspring, while HFMel offspring showed a decrease in these parameters. Comparing HFMel offspring to HF offspring, there was a reduction in fat deposits and plasma pro-inflammatory markers, and sWAT adipocytes exhibited a beige phenotype, accompanied by activation of the beta-3 adrenergic receptor and UCP-1, indicative of iBAT thermogenic activity. HFMel offspring also showed a reduction in neuroinflammation markers in the hypothalamus, with a diminished gene and protein expression in neuropeptide Y (anabolic) and augmented gene expression of proopiomelanocortin (catabolic) expression. Principal component analysis (PCA) separated HF offspring from HFMel offspring, indicating the benefit of maternal melatonin supplementation. Conclusion: The beneficial effects of melatonin supplementation in mothers with obesity were reflected in adult offspring in more suitable pancreatic islet remodeling and function, with reduced inflammation, oxidative stress, and ER stress, resulting in better control of glucose and insulin levels in pancreatic islets. Additionally, melatonin contributed to increased sWAT browning, enhanced iBAT thermogenesis, and mitigated inflammation in the hypothalamus and appetite-regulating neurotransmitters.

Keywords: DOHaD. melatonin; pancreatic islet; adipose tissue; hypothalamus.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 | Efeitos da obesidade materna na descendência | 18 | |
|-----------|--|----|--|
| Figura 2 | Remodelamento da ilhota pancreática 1 | | |
| Figura 3 | Desenho esquemático da interação entre os núcleos hipotalâmicos e os | | |
| | neuropeptídeos e a ativação da termogênese | 21 | |
| Figura 4 | Desenho esquemático dos tipos de adipócitos e suas características | 23 | |
| Figura 5 | Mecanismos propostos do papel anti-inflamatório e antioxidante da | | |
| | melatonina | 24 | |
| Figura 6 | Desenho esquemático do mecanismo que os insultos precoces | | |
| | impulsionam as doenças de origens desenvolvimentistas | 25 | |
| Figura 7 | Linha do tempo experimental | 29 | |
| Figura 8 | Procedimento de isolamento do pâncreas para obtenção das ilhotas | | |
| | pancreáticas | 34 | |
| Figura 9 | Tecido adiposo branco ovariano (TABo) das mães | 43 | |
| Figura 10 | Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) das mães | 44 | |
| Figura 11 | Expressão de genes relacionados à inflamação e estresse do retículo | | |
| | (ER) no tecido adiposo branco ovariano (TABo) das mães | 45 | |
| Figura 12 | Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo | | |
| | branco subcutâneo (TABs) das mães | 47 | |
| Figura 13 | Evolução da massa corporal dos filhotes machos e teste oral de | | |
| | tolerância a glicose | 49 | |
| Figura 14 | Ilhotas pancreáticas dos filhotes machos adultos | 53 | |
| Figura 15 | Secreção de insulina nas ilhotas isoladas dos filhotes machos adultos | 54 | |
| Figura 16 | Marcadores pró-inflamatórios na ilhota pancreática dos filhotes machos | | |
| | adultos | 55 | |
| Figura 17 | Marcadores de estresse oxidativo e do retículo endoplasmático na ilhota | | |
| | pancreática dos filhotes machos adultos | 56 | |
| Figura 18 | Fatores de transcrição e marcadores de identificação de células beta dos | | |
| | filhotes machos adultos | 57 | |
| Figura 19 | Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo branco | | |
| | subcutâneo dos filhotes machos adultos | 58 | |

| Figura 20 Expressão gênica no tecido adiposo branco subcutâneo (TAI | | | | |
|---|---|----|--|--|
| | filhotes machos adultos | 60 | | |
| Figura 21 | Expressões gênicas no tecido adiposo marrom interescapular (TAMi) | | | |
| | dos filhotes machos adultos | 62 | | |
| Figura 22 | Fotomicrografias do tecido adiposo marrom interescapular dos filhotes | | | |
| | machos adultos | 63 | | |
| Figura 23 | Expressões gênicas hipotalâmicas dos filhotes machos adultos | 65 | | |
| Figura 24 | Expressões de proteínas hipotalâmicas dos filhotes machos adultos 66 | | | |
| Figura 25 | Matriz de Correlação (coeficientes r de Pearson) e Análise de | | | |
| Componentes Principais (ACP) dos marcadores termogênicos do tecid | | | | |
| | adiposo dos filhotes machos adultos | 67 | | |
| Figura 26 | Matriz de Correlação (coeficientes r de Pearson) e Análise de | | | |
| | Componentes Principais dos marcadores pró-inflamatórios | | | |
| | hipotalâmicos dos filhotes machos adultos | 68 | | |
| Figura 27 | Resumo gráfico dos resultados da suplementação de melatonina obtidos | | | |
| | nas mães com obesidade | 72 | | |
| Figura 28 | Resumo gráfico dos resultados obtidos neste trabalho | | | |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1 – | Composição das dietas experimentais segundo a recomendação da AIN- | dação da AIN- | |
|------------|--|---------------|--|
| | 93G | 28 | |
| Tabela 2 – | Sequência dos primers utilizados no estudo | 38 | |
| Tabela 3 – | Biometria e bioquímica das mães | 42 | |
| Tabela 4 – | Biometria e bioquímica dos filhotes | 50 | |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| A [ilhota] | Área seccional média da ilhota |
|------------|--|
| ACP | Análise dos componentes principais |
| Adipoq | Adiponectina |
| Adrb3 | Receptor adrenérgico, beta 3 (gene) |
| AGRP | Proteína relacionada ao agouti |
| AIN | American Institute of Nutrition |
| АМРКр | Proteína quinase ativada por AMP fosforilada |
| AMPKt | Proteína quinase ativada por AMP total |
| ARC | Núcleo arqueado |
| Arx | Fator de transcrição aristaless-related homeobox gene |
| ASC | Área Sob a Curva |
| Atf4 | ativando o fator de transcrição 4 |
| B3AR | Receptor Beta 3 adrenérgico (Anticorpo) |
| Bmp8b | Proteína morfogenética óssea 8b |
| BSA | Albumina do soro do leite |
| С | Controle |
| CART | Transcrito regulado por cocaína e anfetamina |
| Chop | Transcrito induzível por danos ao DNA 3 |
| Cidea | fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efetor semelhante |
| | à subunidade alfa A |
| Cit C | citocromo C |
| СР | Componentes principais |
| Cpt1b | Carnitina palmitoil transferase 1b |
| DM2 | Diabetes Mellitus do tipo 2 |
| DMH | Hipotálamo dorsomedial; |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DOHaD | Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| Fgf21 | Fator de crescimento de fibroblastos 21 |
| FIRi | Índice de resistência a insulina em jejum |

| Gadd45 | Parada de crescimento e danos ao DNA induzíveis 45 |
|---------------|---|
| GIP | Polipeptídeo inibidor gástrico |
| GLP-1 | Peptídeo tipo 1 análogo ao Glucagon |
| GLUT 4 | Transportador de glicose do tipo 4 |
| Gpx | Glutationa peroxidase |
| HF | High-fat |
| 1110 | Interleucina 10 |
| IA | Ingestão alimentar |
| IE | Ingestão energética |
| IKK | quinase do inibidor do NF-κB |
| Il1b | interleucinal beta |
| IL6 | Interleucina 6 |
| JNK | quinase c-Jun N-teminal |
| KRB | Solução de Krebs |
| LHA | hipotálamo lateral; |
| M[ilhota] | Ilhota massa de ilhotas |
| Mafa | família de oncogenes de fibrossarcoma musculoaponeurótico v-maf |
| MC | Massa corporal |
| MCP-1 | Proteína-1 quimiotática -32- de monócitos |
| Mel | Melatonina |
| Mg | Miligramas |
| mL | Mililitros |
| Mt2 | receptor de Mel 1B |
| MTNR1A | Receptor de melatonina do tipo 1 |
| Myf5+ | Fator miogênico 5 positivo |
| NA[adipócito] | Densidade numérica por área dos adipócitos |
| Neurod1 | Diferenciação neurogênica 1 |
| NFKB | Fator nuclear kappa B |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| Nrfl | Fator respiratório nuclear 1 |
| p38 | proteínas quinases ativadas por mitógenos |
| p50 | subunidade p50 do NFKB |
| p65 | subunidade p60 do NFKB |

| Pax4 | Paired box 4 |
|-------------|--|
| Pax6 | Paired box 6 |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| Pdx 1 | Homeobox duodenal pancreático 1 |
| PDX1 | Fator homeobox pancreático-duodenal 1 |
| PGC1alfa | Coativador 1 alfa do ppar-gama |
| POMC | Proopiomelanocortina |
| PP | Polipeptídeo pancreático |
| Рр | Pontos parciais |
| PPAR | Receptor agonista proliferador de peroxisoma |
| Ppara | Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma |
| Pparg | Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama |
| Ppargcla | Receptor ativado proliferativo de peroxissomo, gama, coativador 1 alfa |
| Prdm16 | PR domain containing 16 |
| PT | Pontos totais |
| РҮҮ | Polipeptídeo intestinal |
| QA [ilhota] | Densidade numérica por área das ilhotas |
| QUICKi | Índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RI | Resistência à insulina |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RTq-PCR | Reação da cadeia polimerase quantitativo em tempo real |
| SIRT 1 | Sirtuína 1 |
| SNS | Sistema nervoso simpático |
| Sod | superóxido dismutase |
| TAMo | Tecido adiposo branco ovariano |
| TAMs | Tecido adiposo branco subcutâneo |
| TABv | Tecido adiposo branco visceral |
| TAMi | Tecido adiposo marrom interescapular |
| Tbp | TATA box binding protein |
| Tfam | Fator de transcrição A, mitocondrial |
| Tmem26 | Proteína transmembrana 26 |
| Tnfa | Fator de necrose tumoral alfa |

| TOTG | Teste oral de tolerância a glicose |
|-------|--|
| Ucp1 | proteína desacopladora 1 |
| UPR | Unfolded Protein Response |
| Vegfa | Fator de crescimento endotelial vascular A |
| VMH | Hipotálamo ventromedial |
| Vv | Densidade de volume. |
| WB | Western Blotting |
| | |

SUMÁRIO

| | INTRODUÇÃO | 18 | |
|-------|--|----|--|
| 1 | OBJETIVOS | 26 | |
| 1.1 | Geral | 26 | |
| 1.2 | Específicos | 26 | |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 27 | |
| 2.1 | Animais e dietas | 27 | |
| 2.2 | Suplementação com Melatonina | 29 | |
| 2.3 | Massa corporal, ingestão alimentar e energética | 30 | |
| 2.4 | Glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose, índice de resistência à | | |
| | insulina em jejum e índice quantitativo de verificação de sensibilidade à | | |
| | insulina | 30 | |
| 2.5 | Sacrifício | 31 | |
| 2.6 | Análises plasmáticas | 31 | |
| 2.7 | Pâncreas | 32 | |
| 2.7.1 | Análise estereológica do pâncreas | 32 | |
| 2.7.2 | Isolamento do pâncreas para obtenção das ilhotas | 33 | |
| 2.7.3 | Teste de secreção de insulina in vitro | 34 | |
| 2.8 | Tecido adiposo branco ovariano (TABo), epididimário (TABe), subcutâneo | | |
| | (TABs) e tecido adiposo marrom interescapular (TAMi) | 35 | |
| 2.8.1 | Análise estereológica TABo | 35 | |
| 2.8.2 | Imuno-histoquímica | 36 | |
| 2.9 | Hipotálamo | 36 | |
| 2.10 | Reação da cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR) | 37 | |
| 2.11 | Western Blotting (WB) | 39 | |
| 2.12 | Análise estatística | 40 | |
| 3 | RESULTADOS | 41 | |
| 3.1 | Capítulo 1: A suplementação de melatonina mitiga o aumento da massa | | |
| | corporal, melhora o metabolismo de glicose e atenua a inflamação e o | | |

| | estresse do retículo endoplasmático no TABo e induz o escurecimento dos | |
|-------|---|----|
| | adipócitos no TABs nas mães obesas | 41 |
| 3.1.1 | Massa corporal, ingestão alimentar, ingestão energética, Metabolismo de glicose | |
| | <u>e análises plasmáticas</u> | 41 |
| 3.1.2 | Tecido adiposo das mães | 41 |
| 3.1.3 | RTq PCR e imuno-histoquímica mães TABo e TABs | 44 |
| 3.2 | Capítulo 2: Massa corporal, ingestão alimentar, ingestão energética e | |
| | metabolismo de glicose dos filhotes machos | 48 |
| 3.2.1 | Massa corporal e metabolismo de glicose dos filhotes machos | 48 |
| 3.2.2 | Análises plasmáticas dos filhotes machos | 50 |
| 3.3 | Capítulo 3: A suplementação de melatonina em mães com obesidade durante | |
| | a gestação e lactação melhora a composição celular das ilhotas pancreáticas | |
| | e a função das células beta dos filhotes machos | 52 |
| 3.3.1 | Análises histológicas do pâncreas | 52 |
| 3.3.2 | Teste de secreção de insulina | 53 |
| 3.3.3 | RTq-PCR: Ilhotas pancreáticas | 54 |
| 3.4 | Capítulo 4: A suplementação de melatonina em mães com obesidade reduz | |
| | a inflamação hipotalâmica e aumenta a termogênese nos filhotes machos | 58 |
| 3.4.1 | Imuno-histoquímica e RTq-PCR - Tecido adiposo branco subcutâneo | 58 |
| 3.4.2 | Imuno-histoquímica e RTq-PCR - Tecido adiposo marrom interescapular | 61 |
| 3.4.3 | <u>RTq-PCR e Western Blotting – Hipotálamo</u> | 64 |
| 3.4.4 | Análise dos componentes principais da prole de machos | 66 |
| 4 | DISCUSSÃO | 69 |
| | CONCLUSÃO | 79 |
| | REFERÊNCIAS | 80 |
| | ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa | 92 |
| | ANEXO B – Artigo publicado | 93 |
| | ANEXO C - Artigo publicado | 94 |
| | ANEXO D - Artigo submetido | 95 |

INTRODUÇÃO

De acordo com a linha de pesquisa das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença, do inglês Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), que associa as condições ambientais no início da vida, como o estado nutricional materno, à saúde metabólica da prole a longo prazo, a programação materna tem impactos significativos na predisposição às doenças de seus descendentes (Barker, 2004). Dado o crescimento global contínuo do sobrepeso e da obesidade (Afshin et al., 2017), especialmente entre mulheres em idade reprodutiva (Chu et al., 2007), o risco de problemas metabólicos e deficiências congênitas na prole aumenta significativamente, particularmente quando associado ao diabetes gestacional (Liu et al., 2024).

Além disso, a obesidade materna pode causar mudanças epigenéticas que afetam o armazenamento de gordura após o nascimento (Zhang et al., 2011) e está associada ao aumento do risco de obesidade infantil (Whitaker et al., 2010). Dessa forma, a transmissão do fenótipo obesogênico materno para a descendência pode envolver alterações na expressão de microRNAs ovarianos e nas vias de biogênese mitocondrial (Ramadan et al., 2023). A Figura 1 mostra como o ambiente intrauterino pode influenciar o desenvolvimento fetal. Figura 1. Efeitos da obesidade materna na descendência.



Legenda: O feto exposto ao ambiente intrauterino de mães alimentadas com dieta rica em gordura se desenvolve em um ambiente de hiperglicemia e inflamação. Essa exposição favorece alterações estruturais no pâncreas, resultando em remodelamento, assim como no tecido adiposo e no hipotálamo, levando a mudanças na ingestão alimentar.

Fonte: A autora, 2024

desequilíbrio nutricional 0 durante organogênese intrauterina pode afetar significativamente o pâncreas, um órgão particularmente sensível a essas alterações (Yu e Xu, 2020). Em humanos, as ilhotas pancreáticas começam a se desenvolver no início da gestação, por volta das 12 a 13 semanas pós-concepção, com células beta fetais potencialmente capazes de processar e secretar insulina (Piper et al., 2004). Em roedores, o desenvolvimento das ilhotas pancreáticas ocorre em dois períodos críticos: inicialmente entre os dias 17 e 19 do desenvolvimento embrionário (Miralles et al., 1998) e posteriormente na primeira semana de vida, quando a neogênese das ilhotas acontece (Kaung, 1994). Dessa forma, modelos em roedores têm sido amplamente utilizados para investigar os efeitos da obesidade materna no desenvolvimento e função das ilhotas pancreáticas, com o objetivo de elucidar os mecanismos de programação subjacentes.

Estudos anteriores demonstraram que a obesidade materna durante a gestação e lactação aumenta a massa de células beta devido à estimulação da proliferação celular (Gniuli et al., 2008), resultando em alterações adversas no pâncreas dos seus descendentes (Bringhenti et al., 2013). Além disso, observou-se uma diminuição na expressão de Pdx1, um gene crucial para a funcionalidade das células beta (Yokomizo et al., 2014). Esses achados destacam os prejuízos causados pela obesidade materna no pâncreas, conforme ilustrado na Figura 2.





As ilhotas pancreáticas apresentam maior plasticidade de diferenciação no início da vida, tornando a Legenda: programação durante o período fetal e de lactação mais potente. Em um ambiente com aumento de glicose, as células beta funcionantes têm a capacidade de compensar a hiperglicemia através da expansão das populações de células beta e do aumento de seu tamanho, suportando a maior secreção de insulina. Fisiologicamente, esses eventos compensatórios restauram a homeostase da glicose. No entanto, se a hiperglicemia persiste de forma crônica, a compensação torna-se ineficiente, resultando em comprometimento da função celular. Com o avanço da idade, há um declínio na integridade das células beta, tanto na arquitetura quanto no maquinário metabólico, levando à diminuição da função.

Fonte: A autora, 2024

Outro órgão significativamente afetado pelo desequilíbrio nutricional materno é o hipotálamo. Anatomicamente, o hipotálamo de camundongos é uma pequena região localizada na base do cérebro, ao redor do terceiro ventrículo, e histologicamente é composto por mais de 40 núcleos distintos, muitos dos quais podem ser subdivididos entre subnúcleos (Berthoud, 2002). Entre as estruturas envolvidas estão o núcleo paraventricular (PVN), o hipotálamo ventromedial (VMH), o hipotálamo dorsomedial (DMH), o hipotálamo lateral (LHA) e o núcleo arqueado (ARC) (Berthoud, 2002). No núcleo arqueado, ocorre a regulação hipotalâmica do apetite, envolvendo neurônios orexígenos, que estimulam o apetite, como o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), e neurônios anorexígenos, que suprimem o apetite, como o pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulador de cocaína e anfetamina (CART). Esses neurônios são responsáveis pela regulação da nutrição por meio de sinais centrais e periféricos (Ross e Desai, 2013, 2014). A Figura 3 demonstra como ocorre a regulação hipotalâmica dos neuropeptídeos.

Durante o período perinatal, ocorre uma fase crítica para a maturação cerebral, diferenciação neuronal e adipogênese, processos influenciados pela regulação epigenética (Breton, 2013). Nesse mesmo período, inicia-se a regulação do apetite fetal e da homeostase energética no hipotálamo. Alterações específicas no hipotálamo e nas vias reguladoras de energia podem, por essa razão, influenciar diretamente o apetite e a ingestão alimentar durante períodos críticos da vida (Ross e Desai, 2014). A nutrição e a obesidade materna durante os períodos fetal e/ou pós-natal podem programar permanentemente a estrutura e função do núcleo ARC, afetando o apetite (Morris, 2009). Em estudos experimentais, filhotes de mães obesas apresentaram hiperfagia e, consequentemente, rápido crescimento neonatal (Ornellas et al., 2016). Diante dos achados descritos previamente conseguimos estabelecer a relação entre a obesidade materna e a programação no hipotálamo.

A interrelação entre o hipotálamo e o tecido adiposo é crítica para a manutenção da homeostase energética. Através do sistema nervoso simpático (SNS), o hipotálamo influencia diretamente a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (TAM), modulando a eficiência com que o corpo gera calor e consome energia (Enriori et al., 2011). Neurônios hipotalâmicos que desempenham papéis significativos na termorregulação estão amplamente distribuídos entre seus núcleos (Contreras et al., 2016). Essa integração de sistemas não só assegura a resposta adaptativa a variações térmicas, mas também desempenha um papel essencial na regulação do peso corporal e no metabolismo geral, destacando a importância de um eixo hipotálamo-tecido adiposo eficiente para a saúde metabólica. Essa integração está sintetizada na Figura 3.

Figura 3. Desenho esquemático da interação entre os núcleos hipotalâmicos e os neuropeptídeos e a ativação da termogênese.



Legenda: A. Desenho esquemático de um corte sagital do encéfalo de roedor com a região do hipotálamo destacada em vermelho. B. Desenho esquemático de um corte coronal do encéfalo de roedor com a região do hipotálamo destacada em vermelho. C. Associação dos núcleos hipotalâmicos no controle de neuropeptídeos orexigênicos, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), e anorexigênicos pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulador de cocaína e anfetamina (CART), bem como na ativação da termogênese do tecido adiposo marrom (TAM) e do tecido adiposo branco (TAB) por meio da ativação do sistema nervoso simpático (SNS). DMH = hipotálamo dorsomedial; LHA = hipotálamo lateral; VMH = hipotálamo ventromedial; ARC = núcleo arqueado.

O tecido adiposo é o principal órgão envolvido nos mecanismos fisiopatológicos da obesidade (McGown et al., 2014). De acordo com as características embrionárias, morfológicas e funcionais, o tecido adiposo é dividido em pelo menos dois subtipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) (Cypess, 2022).

O TAB é caracterizado por uma gotícula de gordura central unilocular. Este tecido desempenha um papel crucial no metabolismo energético, envolvendo processos como a lipólise e a lipogênese, e atua como barreira física contra traumas, além de secretar proteínas bioativas, denominadas adipocinas, que têm efeitos locais e sistêmicos (Klöting e Blüher, 2014). O TAB está amplamente distribuído no organismo e possui dois subtipos principais: visceral (TABv) e subcutâneo (TABs) (Lecoutre et al., 2018). O TABv está relacionado ao aumento da inflamação e à gênese da obesidade, enquanto o TABs apresenta plasticidade metabólica e está associado ao aumento da sensibilidade à insulina e à redução da ocorrência de DM2 (Berry et al., 2013).

A formação de depósitos de TAB ao longo da vida ocorre durante janelas críticas de desenvolvimento. Em roedores, a adipogênese é particularmente ativa durante o período perinatal, principalmente na última semana de gestação, entre o 14º e o 18º dia, quando surgem as primeiras células de gordura. O TABs desenvolve-se durante o final da gestação e lactação, enquanto a formação do TABv é iniciada principalmente após o nascimento (Berry et al., 2016). Distúrbios metabólicos maternos, como a obesidade, criam um ambiente intrauterino que compromete a trajetória do desenvolvimento do TAB e desempenha um papel importante na programação metabólica da descendência (Yang et al., 2013).

Os adipócitos marrons têm origem em células progenitoras de miócitos (células musculares), chamadas de mioblastos, que expressam o fator miogênico 5 positivo (Myf5+). Em roedores, esses adipócitos formam-se no período embrionário a partir do 12º dia de gestação, com seu depósito mais estudado sendo o interescapular (Cypess et al., 2013). A coloração amarronzada do TAM deve-se ao seu elevado número de mitocôndrias. Além disso, possui uma densa vasculatura e inervação adrenérgica, com seu citoplasma preenchido por pequenas gotículas de gordura multilocular (Gavaldà-Navarro et al., 2022). Os adipócitos marrons têm uma alta concentração da proteína desacopladora 1 (UCP1) na membrana interna das mitocôndrias, responsável pela termogênese sem tremores em mamíferos, um importante mecanismo de produção de calor e gasto energético (Nedergaard et al., 2023). O aumento da função termogênica do TAM pode ser um fator protetivo contra doenças metabólicas, como obesidade e DM2 (Sacks e Symonds, 2013). No entanto, foi observado que a obesidade materna durante a gestação e lactação prejudica a função termogênica do TAM na prole (Liang et al., 2016b).

Sob certas condições específicas, como o uso de nutracêuticos e fármacos, os adipócitos brancos podem passar por adaptações, aumentando o número de mitocôndrias e adotando um fenótipo bege para induzir a termogênese, processo conhecido como amarronzamento (Bargut et al., 2017). Nesses adipócitos beges, há expressão de UCP1, um marcador termogênico semelhante ao TAM (Cousin et al., 1992). Além disso, o coativador-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 α), um fator regulador crítico do metabolismo energético e da biossíntese mitocondrial, é altamente expresso em adipócitos marrons e beges (Bostrom et al., 2012). O PGC1 α atua como um cofator que combina receptores γ ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) com a proteína contendo domínio PR 16 (PRDM16) para aumentar os níveis de UCP1 no TAB (Harms et al., 2014). Esses adipócitos geraram efeitos benéficos sobre o metabolismo, eduzindo o risco de doenças como DM2 e obesidade, embora as investigações translacionais ainda estejam em estágio inicial (Keipert e

Jastroch, 2014). Estudos recentes indicam que intervenções maternas podem induzir o aparecimento de adipócitos beges nos filhotes, associando-se a efeitos protetores como a diminuição do ganho de massa corporal (Xue et al., 2022; Xue et al., 2024).

Diante do exposto, a vida fetal é uma janela crítica que define a trajetória para o rápido acúmulo de gordura durante os períodos de desenvolvimento. Assim, o ponto de ajuste para adiposidade é programado no útero. No entanto, o desenvolvimento de disfunção metabólica em filhos de mães obesas é multifatorial, conforme mostrado anteriormente. A Figura 4 apresenta adipócitos e suas características estruturais.

Figura 4. Desenho esquemático dos tipos de adipócitos e suas características



Legenda: Desenho esquemático dos tipos de adipócitos e suas características estruturais. O adipócito branco possui uma única gotícula de gordura grande, sem marcadores termogênicos. O adipócito bege é multilocular, com presença de mitocôndrias e alguma capacidade termogênica devido aos marcadores presentes. O adipócito marrom apresenta intensa atividade termogênica, com numerosas mitocôndrias. PRDM16, domínio PR contendo 16; BMP8B, proteína morfogenética óssea 8b; UCP1, proteína de desacoplamento-1; PGC1A, receptor gama ativado proliferativo de peroxissoma coativador 1-alfa. Fonte: A autora, 2024

Devido aos impactos negativos da programação fetal na prole, a melatonina (N-acetil-5-metoxi triptamina) surge como uma estratégia promissora. Este hormônio, conhecido por regular o ritmo circadiano (Karamitri e Jockers, 2019), é uma indoleamina endógena secretada pela glândula pineal, e seu uso a curto prazo não apresenta efeitos adversos, mesmo em doses elevadas (Andersen et al., 2016). A melatonina tem o potencial de proteger contra o estresse oxidativo (Xu et al., 2020), ao facilitar processos antioxidantes na membrana mitocondrial (Tan et al., 2016) e estimular a síntese endógena de superóxido dismutase (Sod), glutationa peroxidase (Gpx) e glutationa redutase, enzimas com atividade antioxidante ou que metabolizam espécies reativas (Tamura et al., 2009). A Figura 5 ilustra alguns mecanismos propostos nos quais a melatonina atua como molécula antioxidante e mediadora da inflamação. Figura 5. Mecanismos propostos do papel anti-inflamatório e antioxidante da melatonina.



Legenda: Durante períodos de estresse, ocorre a geração de grandes quantidades de oxigênio reativo (EROS) e espécies reativas de nitrogênio. Esses agentes tóxicos causam danos às mitocôndrias, resultando na liberação do citocromo c, que ativa a cascata apoptótica. Esse insulto desencadeia inflamação e a liberação de NF-kB, que migra para o núcleo e estimula a síntese de quimosinas e citocinas, aumentando ainda mais a produção de ROS. A melatonina possui diversas ações que reduzem os danos causados pelas ROS, incluindo a eliminação direta de radicais livres e o estímulo de enzimas antioxidantes. Como resultado dessas ações, a melatonina atenua a apoptose celular e a perda tecidual, preservando a função dos órgãos. Cit C, citocromo C; IKK, quinase do inibidor do NF-κB; Il1b, interleucina 1b, Il6, interleucina 6; JNK, quinase c-Jun N-teminal; NFKB, Fator nuclear Kappa B; p38, proteínas quinases ativadas por mitógenos; p50, subunidade p50 do NFKB; p65, subunidade p60 do NFKB; Tnfa, fator de necrose tumoral alfa..

Fonte: A autora, 2024

Observa-se que a suplementação de melatonina resulta na redução na massa corporal (Delpino e Figueiredo, 2021) e na restauração da capacidade funcional vascular (Chivchibashi-Pavlova et al., 2023). Além disso, a melatonina pode modular atividades do TAB, metabolismo lipídico, atividade mitocondrial e homeostase glicêmica. Suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias também aumentam a atividade termogênica do TAM (Genario et al., 2021).

Dessa forma, a melatonina pode ser considerada uma biomolécula promissora para reprogramação fetal (Tain et al., 2017). Seu papel na gravidez tem sido cada vez mais reconhecido, embora os efeitos metabólicos da suplementação a longo prazo não sejam totalmente compreendidos (Feng et al., 2022). A melatonina tem impacto direto na placenta (Berbets et al., 2021) e regula processos como proliferação, apoptose e invasão de trofoblastos na pré-eclâmpsia, além de inibir o estresse do retículo endoplasmático (RE) (Zhou et al., 2022). Os tecidos fetais também apresentam receptores de melatonina, sugerindo um papel desta molécula no crescimento e desenvolvimento fetal, inclusive na regulação (Tain et al., 2014b) Embora a interação entre melatonina e os resultados de saúde a longo prazo delineados no conceito DOHaD seja complexa e não totalmente compreendida, estudos prévios mostram benefícios da melatonina em diferentes modelos de exposições maternas (Tain et al., 2017). A Figura 6 mostra os fatores que estão associado ao conceito DOHaD e como a melatonina pode atuar sobre eles.

Figura 6. Desenho esquemático do mecanismo que os insultos precoces impulsionam as doenças de origens desenvolvimentistas.



Legenda: Insultos maternos, como exposições a diferentes tipos de intervenções dietéticas ou medicamentos, podem aumentar o estresse oxidativo e causar alterações epigenéticas. A intervenção precoce com melatonina pode ser uma estratégia para prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas à DOHaD na vida adulta.

Fonte: A autora, 2024

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho foi investigar se a suplementação materna de melatonina, durante a gestação e lactação, em um modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos, pode mitigar os efeitos adversos da programação fetal relacionada à obesidade na saúde metabólica dos filhotes machos na vida adulta.

1 **OBJETIVOS**

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação de melatonina em mães com obesidade sobre as ilhotas pancreáticas, o tecido adiposo branco subcutâneo, o tecido adiposo marrom e o hipotálamo nos filhotes machos na idade adulta.

1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as alterações na massa corporal, ingestão alimentar e energética e o metabolismo de glicose em mães e filhotes machos adultos;
- b) Investigar os efeitos da suplementação de melatonina nos tecidos adiposos branco subcutâneo e ovariano das mães;
- c) Analisar a histologia do pâncreas e dos tecidos adiposos branco subcutâneo e marrom em filhotes machos adultos;
- d) Estudar a expressão gênica na ilhota pancreática, enfocando marcadores de estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo, inflamação, fatores de transcrição e marcadores de identidade das células beta e alfa em filhotes machos adultos;
- e) Investigar a expressão gênica nos tecidos adiposos branco subcutâneo e marrom, com foco em marcadores de termogênese e biogênese mitocondrial em filhotes machos adultos;
- f) Analisar a expressão gênica e proteica no hipotálamo, com ênfase em marcadores de inflamação e neuropeptídeos reguladores do apetite e da saciedade em filhotes machos adultos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e dietas

Os experimentos realizados seguiram as diretrizes estabelecidas pelo guia para experimentação animal (Publicação NIH Nº. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo CEUA nº 003/2021).

Camundongos isogênicos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, com um mês de idade, foram alojados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular (LMMC), em condições controladas de temperatura (21± 2°C), umidade (60±10%), ciclo claroescuro (12:12h), com livre acesso à alimentação e à água em estantes ventiladas com microisoladores para camundongos durante todo o experimento (sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA).

As camundongas fêmeas (mães) foram divididas aleatoriamente em dois grupos e receberam alimentação ad libitum. Um grupo recebeu ração controle para roedores (designado como grupo C, n=30), enquanto o outro grupo recebeu uma dieta hiperlipídica, high-fat (designado como grupo HF, n=30). Todos os camundongos machos receberam dieta controle para roedores (n=60).

Os animais do grupo C receberam uma dieta específica para roedores durante as fases de crescimento, gestação e lactação, sendo normoproteica (19% kJ proteína/Kg dieta) e normolipídica (17% kJ lipídeos/Kg dieta). Já o grupo HF recebeu uma dieta contendo alto teor de lipídeos (49% kJ lipídeos/Kg dieta, proveniente da adição de banha de porco, uma gordura essencialmente saturada), mantendo o percentual de proteínas (19% kJ) da dieta C. Vale ressaltar que o aumento no percentual de lipídeos na dieta HF foi compensado pela redução de carboidratos. Ambas as dietas tiveram o mesmo aporte de vitaminas e minerais, seguindo as normas recomendadas para roedores pelo "American Institute of Nutrition" (Reeves et al., 1993). As dietas experimentais foram confeccionadas pela empresa Pragsoluções (Jau, SP, Brasil, http://www.pragsolucoes.com.br), e a composição nutricional detalhada está na Tabela 1.

| Ter and diseases | Dietas experimentais | |
|------------------------|----------------------|---------|
| Ingredientes | С | HF |
| Caseína | 190,0 | 230,0 |
| Maisena | 539,486 | 299,475 |
| Sacarose | 100,0 | 100,0 |
| Óleo de soja | 70,0 | 70,0 |
| Banha de porco | - | 200,0 |
| Fibra | 50,0 | 50,0 |
| Mistura de vitaminas * | 10,0 | 10,0 |
| Mistura de minerais | 35,0 | 35,0 |
| Cistina | 3,0 | 3,0 |
| Colina | 2,5 | 2,5 |
| Antioxidante | 0,014 | 0,028 |
| Energia (kJ/g) | 16,38 | 20,58 |
| Carboidratos (%) | 64 | 32 |
| Proteínas (%) | 19 | 19 |
| Lipídeos (%) | 17 | 17 |

Tabela 1. Composição das dietas experimentais segundo a recomendação da AIN-93G.

As fêmeas foram mantidas agrupadas em C e HF até a semana experimental 10. Duas semanas antes do acasalamento, o tratamento com melatonina foi iniciado, resultando na redivisão das fêmeas em quatro grupos experimentais. Os grupos tratados foram designados com o sufixo "Mel", enquanto as dietas anteriores de cada grupo experimental foram mantidas.

Aos três meses de idade, um macho e uma fêmea de cada grupo foram acasalados. Neste experimento, apenas as dietas e os tratamentos maternos foram considerados, com os machos (pais) sendo retirados imediatamente após o aparecimento do *plug vaginal* nas fêmeas.

Ao nascer, o gênero dos filhotes foi identificado pela distância ano-genital. Em seguida, os filhotes foram pesados individualmente e o tamanho da ninhada foi ajustado para seis animais (três machos e três fêmeas, quando possível) por lactante, garantindo assim uma nutrição adequada (Langley-Evans *et al.*, 1996).

Os pais e as mães foram sacrificados após o desmame dos filhotes. Um macho de cada ninhada foi selecionado aleatoriamente para formar os grupos experimentais, identificados de acordo com a dieta e tratamento da mãe. Todos os grupos experimentais das proles foram alimentados com dieta C/AIN-93G até atingirem a idade de 12 semanas, momento em que foram sacrificados. É importante destacar que apenas as mães receberam suplementação com melatonina. O desenho experimental do trabalho é mostrado na Figura 7.

Legenda: C, dieta controle; HF, dieta high-fat. * Vitaminas e Minerais presentes na mistura estão de acordo com a AIN-93G (Reeves et al., 1993).

Figura 7 - Linha do tempo experimental.



Legenda:

Fêmeas C57BL/6 de 4 semanas de idade (futuras mães) foram agrupadas conforme a dieta atribuída, sendo controle (C) ou hiperlipídica (HF). A suplementação de melatonina (Mel) teve início na 10^a semana, resultando nos grupos C, CMel, HF e HFMel (com suplementação de melatonina durante os períodos de preconcepção, gestação e lactação). Na 12^a semana, as fêmeas foram acasaladas com machos não consanguíneos da mesma idade. Os filhotes machos no desmame foram de acordo com a dieta e suplementação materna, entretanto, receberam apenas dieta C e, na 12^a semana de idade, foram sacrificados.

Fonte: A autora, 2024.

2.2 Suplementação com Melatonina

As mães dos grupos Mel receberam uma dose de 10mg de melatonina por kg de peso do animal por dia, via subcutânea.

A melatonina (M5250, Sigma) foi dissolvida diariamente em solução salina e etanol 100%, na proporção de 19:1 (v/v) (Song *et al.*, 2005), e posteriormente diluída em solução salina para alcançar um volume diário de 0,5ml de solução em *eppendorf* envolto com papel alumínio, devido à sensibilidade da melatonina à luz (Baydas *et al.*, 2008). A suplementação com melatonina foi mantida por oito semanas, abrangendo duas semanas de pré-acasalamento e o período de gestação e lactação, cada um com aproximadamente 21 dias.

Para padronizar os procedimentos entre os grupos, as mães designadas para o grupo sem suplementação de melatonina receberam 0,5ml de solução alcoólica-salina como veículo.

A administração da melatonina ocorreu uma hora após o início do ciclo escuro do biotério (13:00h BRT) (Baydas *et al.*, 2002).

2.3 Massa corporal, ingestão alimentar e energética

A massa corporal dos progenitores e filhotes foi medida semanalmente utilizando uma balança digital de precisão. Além disso, a massa corporal das mães e a ingestão alimentar foram monitoradas diariamente. Essas informações foram obtidas subtraindo a quantidade total de ração da quantidade remanescente na caixa. As dietas experimentais foram renovadas diariamente, e a ração não consumida foi descartada. A ingestão energética diária foi calculada multiplicando a quantidade de ração ingerida pelo valor energético da dieta em quilojoules.

2.4 Glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose (TOTG), índice de resistência à insulina em jejum (FIRi) e índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina (QUICKi)

O TOTG foi realizado em dois momentos específicos nas mães: dois dias antes do acasalamento e após o desmame dos filhotes, e nos filhotes quando completaram três meses de idade. Para isso, os animais foram submetidos a um período de jejum de seis horas. Em seguida, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril - 0,9% NaCl) na dosagem de 2g/kg foi administrada por gavagem orogástrica. Após a administração, o sangue foi coletado da veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Os níveis de glicose sanguínea (expressos em mgl/dL) foram determinados utilizando um glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). Os valores de glicose no tempo 0 foram considerados como níveis de glicose, utilizando o software Prisma (GraphPad Prism, v. 10.2.3 para Windows, Graphpad Software, Boston, MA, EUA).

Além disso, foram realizados o índice de resistência à insulina em jejum (FIRi) e o índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina (QUICKi) nas mães e nos filhotes para avaliar a resistência à insulina e a sensibilidade à insulina, respectivamente. O FIRi foi calculado pela fórmula (glicemia de jejum x insulina de jejum)/25) (Pang et al., 2016), enquanto o QUICKI foi calculado como 1/[log(insulina de jejum (μ U/mL) + log(glicemia de jejum (mg/dL) (Katz et al., 2000).

2.5 Sacrifício

Os pais e as mães foram sacrificados após o desmame dos filhotes, enquanto os filhotes foram sacrificados na 12^a semana de idade. Todos os animais foram submetidos a um jejum de seis horas antes dos procedimentos. No momento da eutanásia, receberam heparina (200mg/kg) e foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Cetamina (240mg/kg) e Xilazina (15mg/Kg). Em seguida, o tórax foi aberto para expor o coração, e amostras de sangue foram rapidamente obtidas por punção cardíaca. Os órgãos-alvos deste estudo foram:

- Nas mães: os depósitos de tecido adiposo branco ovariano e subcutâneo.
- Na prole de machos adultos: o pâncreas, os depósitos de tecido adiposo subcutâneo e marrom e hipotálamo.

2.6 Análises plasmáticas

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no momento do sacrifício. Logo após a coleta, o plasma foi separado por centrifugação a 712 *xg* (*3500 rpm* por 15 minutos) em temperatura ambiente e armazenado a -80°C até a realização da análise bioquímica.

No plasma das mães, foram dosadas as concentrações de adiponectina (kit Mouse adiponectina ELISA #EZMADP-60K, Millipore, Missouri, EUA) e insulina (Rat/mouse Insulin ELISA Kit #EZRMI-13K, Millipore, Missouri, EUA).

Nos filhotes, além de adiponectina, foram avaliadas as concentrações de peptídeo C, grelina, polipeptídeo inibidor gástrico (GIP), interleucina 6 (IL-6), glucagon, insulina, leptina, polipeptídeo pancreático (PP), polipeptídeo intestinal Y (PPY), resistina e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) usando o imunoensaio Multiplex Biomarker com a tecnologia Luminex xMAP (Millipore, Billerica, MA, EUA; cat.# MMHMAG-44 K-08).

2.7 Pâncreas

Os pâncreas dos filhotes machos de cada grupo experimental foram cuidadosamente dissecados e fixados em formaldeído 4% para análise por microscopia de luz (n=5/grupo). Outra parte dos animais foi direcionada para o isolamento do pâncreas (n=5/grupo) para obtenção das ilhotas e subsequente análise da expressão gênica.

2.7.1 Análise estereológica do pâncreas

O pâncreas foi processado para microscopia de luz, sendo embebido em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e seccionado em 5 µm de espessura. Os cortes resultantes foram corados com Hematoxilina e Eosina ou submetidos à incubação com anticorpos anti-insulina e anti-glucagon para análise imuno-histoquímica. As observações e fotomicrografias digitais foram realizadas utilizando um microscópio Nikon (modelo 80i) equipado com câmera digital DS-Ri1 (Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

Para a análise, foram avaliadas 15 seções aleatórias não consecutivas em cada animal. Inicialmente, foi estimada a densidade do volume da ilhota (Vv [ilhota, pâncreas]) por meio de contagem de pontos, e a massa da ilhota (M [ilhota, pâncreas]) foi calculada como o produto de Vv [ilhota, pâncreas] e a massa do pâncreas. Em seguida, foi determinado a densidade numérica por área das ilhotas (QA [ilhota, pâncreas]) considerando a quantidade de ilhotas em uma área conhecida. Posteriormente, a área da seção transversal da ilhota foi calculada como A [ilhota, pâncreas] = Vv [ilhotas, pâncreas] /2*QA [ilhotas, pâncreas] (Mandarim-de-Lacerda e Del-Sol, 2017; Marinho et al., 2019).

Também utilizamos a análise de imagem em cortes incubados com anti-glucagon (CSB-PA002654, Cusabio, diluição 1:100) e anti-insulina (sc-9168, Santa Cruz Biotech, CA, EUA; diluição 1:100) para calcular a densidade de volume de células alfa e beta. Resumidamente, os cortes foram incubados com anticorpos secundários biotinilados e conjugados de estreptavidina-peroxidase, seguidos por lavagem em PBS, revelação com diaminobenzidina líquida (DAB, Histostain Plus Kit, Invitrogen, CA, EUA) e contracoloração com Hematoxilina. Posteriormente, utilizando o software ImagePro Plus 7.1 para Windows (Media Cybernetics Corp., Rockville, MD, EUA), as ilhotas foram delimitadas e segmentadas para análise de imagem (indicativa de áreas positivas para glucagon e insulina), medida em unidades de intensidade e convertida em densidade óptica. Por fim, a massa das células alfa e beta foi estimada como o produto de [Vv [célula alfa] (ou Vv [célula beta]) e M [ilhota] (Mandarim-de-Lacerda e Del-Sol, 2017; Marinho et al., 2019).

2.7.2 Isolamento do pâncreas para obtenção das ilhotas

Nos animais designados para obtenção das ilhotas pancreáticas, as ilhotas foram isoladas por meio digestão do tecido pancreático com solução de colagenase. Esse processo envolve a destruição seletiva do parênquima exócrino do pâncreas. Após uma incisão abdominal, o fígado foi deslocado para expor a vesícula biliar. O ducto biliar foi então localizado e suas porções cranial (envolvendo o fígado e a vesícula biliar) e caudal (envolvendo o duodeno) foram clampeadas para evitar o vazamento da solução de colagenase. Uma cânula foi inserida no ducto biliar para permitir a inflação do pâncreas com uma solução de Hanks (com suplementação de albumina sérica bovina – BSA a 1,0 mg/mL) contendo colagenase tipo V a 0,8 mg/mL (C9263, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Inicialmente, foram injetados 3 mL da solução, completando-se para um volume final de 5 mL.

Em seguida, o pâncreas foi removido e colocado em um tubo Falcon de 15 mL, imerso em um banho-maria a 37 °C por 15 minutos para permitir a digestão do tecido exócrino pela colagenase. Após esse período, o tubo foi agitado vigorosamente por 20 segundos para facilitar a desagregação do tecido pancreático e, imediatamente após, foram adicionadas 14 mL de solução de Hanks resfriada a 4 °C para interromper a ação da colagenase na digestão. O tecido digerido foi então lavado com solução de Hanks resfriada e centrifugado três vezes para remover o tecido exócrino. As ilhotas foram contadas e coletadas em uma placa de Petri com fundo preto, com o auxílio de um microscópio estereoscópico com câmera (Luxeo 4D, LABOMED, CA, EUA) e pipeta manual. Posteriormente, foram congeladas a -80°C para análises posteriores. A Figura 8 mostra o passo a passo dessa técnica descrita acima.
Figura 8. Procedimento de isolamento do pâncreas para obtenção das ilhotas pancreáticas



Legenda: Este esquema detalha o processo de isolamento das ilhotas pancreáticas por meio da digestão do tecido pancreático com solução de colagenase, seguido pela contagem e coleta das ilhotas para análises posteriores. A. Canulação do pâncreas através do ducto colédoco; B. Pâncreas insuflado até a cauda com solução de colagenase; C. Imagem representativa do pâncreas completamente inflado; D-E. Condicionamento subsequente dos tecidos em tubo com colagenase; F. Tubo Falcon colocado em banho-maria a 37°C para iniciar o processo de digestão da porção exócrina do pâncreas; G. O homegenato é centrifugado; H-I. No final do processo de digestão, o homogenato é observado ao microscópio; J. As ilhotas são obtidas por contagem com pipeta.

Fonte: A autora, 2024.

2.7.3 Teste de secreção de insulina in vitro

Durante a contagem das ilhotas, cinco unidades em triplicata por grupo foram incubadas por 30 minutos a 37°C em meio de cultura específico para o seu crescimento. Esse meio consiste em um tampão de bicarbonato de Krebs-Ringer (KRB) contendo 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10mM de NaHCO3, 2,56 mM de CaCl2, 1 mM de MgCl2 e 15 mM HEPES, suplementado com 5,6mM de glicose e BSA a 0,3% (pH 7,4, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), e foi continuamente gaseificado com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Em seguida, o meio de cultura foi substituído por um novo tampão fresco, e as ilhotas foram incubadas por mais uma hora em três diferentes concentrações de glicose: 2,8 mM, 11,1

mM e 22,2 mM. A secreção de insulina foi quantificada por meio de imunoensaio utilizando o kit ELISA de Insulina para Ratos/Camundongos (Kit #EZRMI-13K, Millipore, Missouri, EUA).

2.8 Tecido adiposo branco ovariano (TABo), epididimário (TABe), subcutâneo (TABs) e tecido adiposo marrom interescapular (TAMi)

A gordura intra-abdominal localizada na região inferior do abdômen, associada aos ovários e tubas uterinas (em fêmeas) e aos epidídimos (em machos), foi identificada como tecido adiposo branco genital ovariano (TABo) e epididimária (TABe), respectivamente. O tecido adiposo branco subcutâneo (TABs), encontrado entre a parte inferior da caixa torácica e a coxa, foi classificado como gordura subcutânea, enquanto o tecido adiposo marrom interescapular (TAMi) foi obtido na região interescapular por meio de dissecção cuidadosa.

Após a dissecção e separação dos tecidos, os depósitos de gordura foram então denominados como TABo, TABs, TAMi. É importante ressaltar que a gordura epididimária na prole masculina não foi analisada neste estudo.

2.8.1 Análise estereológica TABo

Uma amostra de pelo menos 50 adipócitos aleatórios por grupo foi fotografada utilizando um microscópio Nikon (80i) e uma câmera digital (DS-Ri1, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA) para estimar a área média da seção transversal dos adipócitos (ā [adipócitos]) (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2021). A área média dos adipócitos (ā [adipócito]) é calculada como a razão entre a densidade de volume dos adipócitos (Vv [adipócito], determinada por contagem de pontos e a densidade numérica por área dos adipócitos (NA [adipócito]), contada em uma área conhecida (Mandarim-de-Lacerda, 2003; Mandarim-de-Lacerda e Del-Sol, 2017).

2.8.2 Imuno-histoquímica

Fragmentos fixados de TABs das mães e dos filhotes e de TAMi dos filhotes com um total de 5 amostras para cada tipo, foram fixados em tampão fosfato formaldeído 0,1 M a pH 7,2 por 48h e posteriormente incorporados em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA). Os blocos resultantes foram seccionados em lâminas silanizadas com uma espessura de 5 μm e submetidos à recuperação antigênica utilizando Epitope Retrieval (pH 6,0 a 60°C por 15 minutos), seguido pelo bloqueio da atividade da peroxidase endógena com Peróxido Block (RE7157).

As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários específicos: receptor beta-3 adrenérgico (B3AR, SC1473; Santa Cruz) e proteína desacopladora-1 (UCP1, CSB-PA025554ESR2Hu; Cusabio). Após essa etapa, os cortes foram incubados com um polímero pós-primário (contendo 0,01% de 2-metilisotiazol-3(2H)-ona, RE7159) e Novolink (RE7161), e revelados com Cromógeno DAB (incluindo 10% de Bifenil-3,3', quatro 4-tetrailtetraamina, RE7162) utilizando o tampão de substrato Novolink DAB (RE7163, Novolink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, RE7280-K). Finalmente, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina.

2.9 Hipotálamo

O hipotálamo dos filhotes foi delimitado dorsalmente pelo tálamo, rostralmente pelo quiasma óptico e caudalmente pelos corpos mamilares. Foi retirado utilizando um *punch* para biópsia com diâmetro de 3 mm, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a - 80°C para análise da expressão gênica e proteica.

2.10 Reação da cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão do RNAm foi avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR). O RNA total foi extraído dos tecidos-alvo utilizando TRIzol (Invitrogen, CA, EUA), e a concentração de RNA foi determinada utilizando espectroscopia Nanovue (GE Life Sciences). Em seguida, 1µg de RNA foi tratado com DNAse I (Invitrogen), e a síntese do cDNA da primeira cadeia foi realizada utilizando Primers Oligo (dT) e enzima trasncriptase reversa (Superscript III) para mRNA (ambos Invitrogen). O RT-qPCR foi realizado utilizando termociclador BioRad CFX96 e mix SYBRGreen (Invitrogen, CA, EUA). As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase a 95°C por 4 minutos, seguidos por 44 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos e extensão a 60°C por 15 segundos. A especificidade da amplificação foi verificada por meio de curvas de fusão (60 a 95°C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s).

A expressão gênica do TATA-box binding protein (Tbp) foi analisada em todas as amostras e utilizada como controle endógeno para a normalização do RNAm. Os controles negativos foram incluídos em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão do mRNA foi calculada pela equação $2-\Delta\Delta$ CT, onde - Δ CT representa a diferença entre o número de ciclos (CT) dos genes-alvo e o controle endógeno. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

No grupo de mães, foram analisados os tecidos adiposos brancos subcutâneo e ovariano.

Nos filhotes machos, foram analisados as ilhotas pancreáticas isoladas, o tecido adiposo branco subcutâneo, o tecido adiposo marrom e o hipotálamo.

| GENE | (5' - 3') | (3' - 5') |
|-------------|-------------------------|----------------------|
| Hipotálamo | | |
| 116 | TTCTTGGGACTGATGCTGGT | CAGGTCTGTTGGGAGTGGT |
| Bmp8b | CTATGCAGGCCCTGGTACAT | AGGCCTGGACTACCATGTTC |
| 1110 | GCCTTATCGGAAATGATCCA | TCCTGAGGGTCTTCAGCTTC |
| Npy | TCGCTCTATCTCTGCTCGTG | AGAGCGGAGTAGTATCTGG |
| Pomc | GCTTGCAAACTCGACCTCTC | TGACCCATGACGTACTTCCG |
| Tnfa | CCACCACGCTCTTCTGTCTA | CTGATGAGAGGGAGGCCAT |
| TABs | | |
| Adrb3 | TGGTAGTGGGACTCCTCGTA | TTACACAGAGCACGTCCACI |
| Bmp8b | CTATGCAGGCCCTGGTACAT | AGGCCTGGACTACCATGTT |
| Cpt1b | ATCTGGGCTATCTGTGTCCG | CGCACAGAATCCAAGTACCO |
| Mt2 | CTGAGACCGAGTGATTTGCG | GCAAGGCCGATACAGTTGA |
| Ppara | TCGGACTCGGTCTTCTTGAT | TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA |
| Pparg | ACGATCTGCCTGAGGTCTGT | CATCGAGGACATCCAAGAC |
| Ppargc1a | GCACCAGAAAACAGCTCCAA | ACACAGCTTGACAGGGATG |
| Prdm16 | AGGGCAAGAACCATTACACG | GGAGGGTTTTGTCTTGTCCA |
| Tfam | AGGAAAATTGCAGCCCTGTG | TCTCCATACCCATCAGCTGA |
| Ucp1 | TCTCAGCCGGCTTAATGACT | TGCATTCTGACCTTCACGAC |
| TAMi | | |
| Adrb3 | TGGTAGTGGGACTCCTCGTA | TTACACAGAGCACGTCCACI |
| Bmp8b | CTATGCAGGCCCTGGTACAT | AGGCCTGGACTACCATGTT |
| Cidea | TGGTGGACACAGAGGAGTTC | GTGACTCTGGCTATTCCCG/ |
| Fgf21 | CTGGGGGTCTACCAAGCATA | ATCCTCCCTGATCTCCAGGT |
| Mt2 | CTGAGACCGAGTGATTTGCG | GCAAGGCCGATACAGTTGA |
| Nrf1 | GTTGGTACAGGGGCAACAGT | GTAACGTGGCCCAGTTTTG1 |
| Ucp1 | TCTCAGCCGGCTTAATGACT | TGCATTCTGACCTTCACGAC |
| Vegfa | CACGACAGAAGGAGAGCAGA | CACAGGACGGCTTGAAGAT |
| llhota | | |
| pancreática | | |
| ll1b | TGTAATGAAAGACGGCACACC | TCTTCTTTGGGTATTGCTTG |
| 116 | TTCTTGGGACTGATGCTGGT | CAGGTCTGTTGGGAGTGGT |
| Sirt1 | TCCACGGTGCTGAGGTATAC | GCCACTGTCACTGTTACTGC |
| Tnfa | CCACCACGCTCTTCTGTCTA | CTGATGAGAGGGAGGCCAT |
| Atf4 | CCGAGATGAGCTTCCTGAAC | ACCCATGAGGTTTCAAGTG |
| Chop | CTGCCTTTCACCTTGGAGAC | CGTTTCCTGGGGATGAGAT |
| Gadd45 | GCGAGAACGACATCAACATC | GTTCGTCACCAGCACACAG |
| Cat | ACATGGTCTGGGACTTCTGG | CAAGTTTTTGATGCCCTGGT |
| Gnx | GTCCACCGTGTATGCCTTCT | TCTGCAGATCGTTCATCTCG |
| Sod | AACCATCCACTTCGAGCAGA | GGTCTCCAACATGCCTCTC |
| Arx | CACCCTAAGCCTACCCAGAG | TTGGCCCATACGATGCAATG |
| Mafa | CTTCAGCAAGGAGGAGGTCA | GCACTTCTCGCTCTCCAGAA |
| Neurod1 | GGTGCATCCCTACTCCTACC | GGCTTTCAAAGAAGGGCTC |
| Pax4 | GATCCAACACCAGCTTTGCA | GTTGAGTCCAGTGCAAGCT |
| Pax6 | CGGAGTGAATCAGCTTGGTG | CATGGGTCTGCAGAATTCG |
| Pdx1 | AGGAAAACAAGAGGACCCGT | GTTCAACATCACTGCCAGCT |
| Ppara | TCGGACTCGGTCTTCTTGAT | TCTTCCCAAAGCTCCTTCAA |
| Pparg | GCTGGTCGATATCACTGGAGATC | GCAAAGCCAGAGTTCCTGA |
| - | | CTGCGGTACAATTCCAGAG |

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados no estudo

(CONSTITUTIVO)

Legenda: Adipoq, Adiponectina; Adrb3, Receptor adrenérgico, beta 3; Arx, Gene responsável pela codificação da proteína aristaless-related homeobox; Atf4, Fator de transcrição ativador 4; Bmp8b, Proteína morfogenética óssea 8b; Chop, Transcrito induzível por danos ao DNA 3; Cidea, Fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efetor semelhante à subunidade alfa A; Cpt1b, Carnitina palmitoil transferase 1b; Fgf21, Fator de crescimento de fibroblastos 21; Gadd45, Parada de crescimento e danos ao DNA induzíveis 45; Gpx, Glutationa peroxidase; Il1b, Interleucina 1 beta; Il6, Interleucina 6; Mafa, Família de oncogenes de fibrossarcoma musculoaponeurótico v-maf; Mt2, Receptor de Melatonina 1B 4; Neurod1, Diferenciação neurogênica 1; Nrf1, Fator respiratório nuclear 1; Pax4, Paired box 4; Pax6, Paired box 6; Pdx 1, homeobox duodenal pancreático 1; Ppara, Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; Pparg, Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama; Ppargc1a, Receptor ativado proliferativo de peroxissomo gama coativador 1 alfa; Prdm16, Domínio PR contendo 16; Sod, superóxido dismutase; Tbp, TATA-box binding protein; Tmem26, Proteína transmembrana 26; Tfam, Fator de transcrição A, mitocondrial; Tnfa, Fator de necrose tumoral alfa; Ucp1, Proteína desacopladora 1; Vegfa, Fator de crescimento endotelial vascular A.

Fonte: A autora, 2024

2.11 Western Blotting (WB)

A extração da proteína total do hipotálamo dos filhotes machos foi realizada utilizando um tampão de lise (HEPES, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, NaF 1 nM, Na3 VO4 1 mM e PMSF 1 mM) contendo protease (P8340, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e coquetéis inibidores de fosfatase (P0044, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As quantidades equivalentes de proteína total foram aquecidas em tampão de amostra contendo SDS (Laemmli, Biorad; azul de bromofenol e beta-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 100 °C por 5 minutos e separadas por SDS-PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de transferência de difluoreto de polivinila (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). A membrana foi bloqueada com BSA e incubada com os anticorpos primários: beta-actina como proteína constitutiva (antimouse, sc5274, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); NPY (anti-rabbit, sc-28943, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); POMC (anti-rabbit, sc-20148, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), AMPKa1/2 (anti-rabbit, sc-25792, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), NFKB (anti-rabbit, sc-109, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), MTNR1A (anti-rabbit, Cloud-Clone Corp, EUA). Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário por uma hora à temperatura ambiente. A expressão proteica foi avaliada por quimioluminescência com ECL, e as imagens das bandas foram capturadas utilizando o ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade de quimioluminescência das bandas foi quantificada utilizando o programa ImageJ, v.1.54h (NIH, EUA: imagej.nih.gov/ij), sendo a beta-actina utilizada como controle de carga proteica. A expressão proteica da AMPKp foi corrigida pela relação com AMPKt.

2.12 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade de variâncias (Bartlett) e apresentados como média e desvio padrão. Posteriormente, dependendo das amostras, foram aplicados o teste t de Welch ou a *two-way* ANOVA, seguidos por um teste de Tukey de comparações múltiplas. Além disso, os dados de expressão gênica foram explorados separadamente por meio de uma matriz de correlação e Análise de Componentes Principais (ACP). Os componentes com autovalores \geq 1,0, que capturam a variação compartilhada da população, foram utilizados na análise (critério de Kaiser-Guttman). As pontuações dos componentes principais (CP) foram representadas em um gráfico utilizando os eixos CP1 e CP2 após confirmação de que esses componentes possuem a maior variação de dados (Peres-Neto *et al.*, 2005). Um valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo (utilizando o software GraphPad Prism versão 10.1.2 para Windows, GraphPad Software, Boston, MA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Capítulo 1: A suplementação de melatonina mitiga o aumento da massa corporal, melhora o metabolismo de glicose e atenua a inflamação e o estresse do retículo endoplasmático no TABo e induz o escurecimento dos adipócitos no TABs nas mães obesas

3.1.1 <u>Massa corporal (MC), ingestão alimentar (IA), ingestão energética (IE), Metabolismo de glicose e análises plasmáticas</u>

Antes do acasalamento, após oito semanas de dietas experimentais, as mães alimentadas com dieta HF apresentaram uma massa corporal maior do que as mães do grupo C, e a suplementação de melatonina não teve efeito sobre a massa corporal. No entanto, ao avaliar a área sob a curva (A.S.C) do TOTG, as mães do grupo HF demonstraram intolerância oral à glicose, com um aumento de 20% em comparação com as mães do grupo C. Por outro lado, as mães do grupo HFMel apresentaram uma diminuição de 12% nesse mesmo parâmetro em comparação com as mães do grupo HF (Tabela 3).

Após o desmame dos filhotes, a massa corporal das mães foi novamente medida. Observou-se um aumento de 14% na massa corporal das mães do grupo HF em relação às mães do grupo C, enquanto houve uma diminuição de 12% na massa corporal das mães do grupo HFMel, em comparação com as mães do grupo HF. Não foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar (IA) entre os grupos, porém a ingestão energética (IE) foi maior nas mães do grupo HF em comparação com as mães do grupo C (Tabela 3).

No mesmo período, as mães do grupo HF apresentaram hiperinsulinemia (+130%), resistência à insulina (FIRi +236%) e diminuição da sensibilidade à insulina (QUICKi -21%) em comparação com as mães do grupo C. Além disso, as mães do grupo HF apresentaram níveis mais baixos de adiponectina plasmática (-34%) em comparação com as mães do grupo C. A suplementação de melatonina nas mães do grupo HFMel melhorou o metabolismo da glicose com diminuição em 27% da A.S.C, -55% do FIRi e aumento de 25% do QUICKi e resultou em um aumento de 50% nos níveis de adiponectina plasmática em comparação com as mães do grupo HF (Tabela 3).

| L | | | | |
|-------------------------------|-------------|--------------|-----------------|----------------|
| Dados | С | CMel | HF | HFMel |
| MC (g, n=20) | 12,70±1,09 | | 13,1±1,6 | |
| Antes do acasalamento | | | | |
| MC (g, n=10) | 19,40±0,71 | 20,10±0,57 | 22,0±0,4† | 21,3±0,7 |
| TOTG (A.S.C, mmol/L/min, n=5) | 1047,1±49,6 | 1053,0±49,4 | 1246,20±32,15† | 1099,10±90,54# |
| Após desmame | | | | |
| MC (g, n=10) | 21,10±0,55 | 20,9±1,1 | 24,20±0,54† | 21,40±1,32# |
| IA (g/dia/animal, n=10) | 1,50±0,08 | 1,50±0,06 | 1,4±0,2 | 1,4±0,2 |
| IE (KJ/dia/animal, n=10) | 22,50±3,19 | 22,70±2,75 | 28,70±3,88† | 27,50±3,77 |
| TOTG (A.S.C, mmol/L/min, n=5) | 827,1±5,7 | 789,20±47,53 | 1150,0±111,62† | 844,10±43,75# |
| Adiponectina (106 pg/mL, n=5) | 14,00±1,75 | 13,40±0,69 | 9,20±0,95† | 14,4±1,8# |
| Insulina (pg/mL, n=5) | 606,0±90,0 | 660,0±79,0 | 1388,00±193,46† | 711,00±68,27# |
| FIRi (n=5) | 3,3±0,4 | 3,8±0,5 | 11,1±1,6† | 5,0±0,6# |
| QUIKi (n=5) | 0,50±0,01 | 0,50±0,01 | 0,40±0,01† | 0,50±0,01# |
| TABo, (g, n=5) | 0,20±0,07 | 0,30±0,08 | 0,50±0,05† | 0,30±0,04# |
| TABs, (g, n=5) | 0,20±0,04 | 0,20±0,02 | 0,32±0,04† | 0,26±0,02# |

Tabela 3. Biometria e bioquímica das mães.

Legenda: C, Controle; HF, High-fat; Mel, melatonina. Dados apresentados como média±desvio padrão, analisados pelo teste t de Welch ou ANOVA de dois fatores e post-hoc teste de Tukey (P<0,05, onde † ≠ C; # ≠ HF; § ≠ CMel). Abreviações: A.S.C, área sob a curva; FIRi, Índice de resistência à insulina em jejum; IA, ingestão alimentar; IE, ingestão energética; MC, massa corporal; QUICKi, Índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina; TABo, tecido adiposo branco ovariano; TABs, tecido adiposo branco subcutâneo

Fonte: A autora, 2024

3.1.2 Tecido adiposo das mães

Os coxins de gordura foram maiores nas mães do grupo HF em comparação com as mães do grupo C (TABo, +83%; TABs, +53%), porém foram menores nas mães do grupo HFMel em relação às mães do grupo HF (TABo, -27%; TABs, -18%) (Tabela 3). Além disso, as mães do grupo HF mostraram adipócitos no TABo hipertrofiados em comparação com as mães do grupo C (+38%). Já as mães do grupo HFMel apresentaram a área seccional média dos adipócitos menor em comparação com as mães do grupo HF (-45%) (Figura 9A-B).



Figura 9. Tecido adiposo branco ovariano (TABo) das mães.

 Legenda: A. Fotomicrografias representativas do TABo das mães com cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina (HE) no mesmo aumento; B. Medição do diâmetro e área seccional média dos adipócitos.
 Fonte: A autora, 2024

A Figura 10 mostra o TABs das mães dos grupos estudados. É perceptível que as mães do grupo HFMel exibem adipócitos com características multiloculares, acompanhadas por evidências de imunomarcação positiva para B3AR e UCP1. Essas alterações não foram vistas nas das mães HF, que apresentaram as gotículas de gordura uniloculadas e imunomarcação negativa de B3AR e UCP1.



Figura 10. Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) das mães.

Legenda: Fotomicrografias de cortes histológicos. Na primeira linha, cortes histológicos representativos corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Na segunda e terceira linha, cortes histológicos com imunomarcação para proteínas termogênicas: receptor beta-3 adrenérgico (beta3AR) e proteína desacopladora-1 (UCP1) e contra corados com hematoxilina (mesmo aumento em todas as imagens). Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

Fonte: A autora, 2024

3.1.3 RTq PCR e imuno-histoquímica mães TABo e TABs

Em relação aos marcadores pró-inflamatórios, observou-se uma expressão elevada nas mães do grupo HF em comparação com as mães do grupo C no TABo (Tnfa, +78%; Resistina, +5246%; Leptina, +160%, II6, +188%, e II1b, +74%) (Figura 11A, 11C, 11D, 11E e 11F, respectivamente). No entanto, a suplementação de melatonina demonstrou eficácia na redução do estado inflamatório nas mães do grupo HFMel em comparação com as mães do grupo HF diminuindo a expressão gênica de todos os marcadores demostrados anteriormente (Tnfa, -48%; Resistina, -48%; Leptina, -84%, II6, -49%, e II1b, -45%). Além disso, nos grupos que receberam suplementação de melatonina, houve um aumento na expressão gênica de Adipoq (envolvido na regulação dos níveis de glicose e na degradação de ácidos graxos) (C vs. CMel, +1416%; HF vs. HFMel, +176%) (Figura 11B).

As mães do grupo HF apresentaram um aumento na expressão dos marcadores relacionados ao estresse do retículo em comparação com as mães do grupo C (Atf4, +573%; Chop, +1680%; Gadd45, +85%), porém esses marcadores foram menos expressos nas mães do grupo HFMel em comparação com as mães do grupo HF (Atf4, -73%; Chop, -32%; Gadd45, -59%) (Figura 11G, 11H, 11I, respectivamente).

Figura 11. Expressão de genes relacionados à inflamação e estresse do retículo (ER) no tecido adiposo branco ovariano (TABo) das mães.



Legenda: A. Tnfa, fator de necrose tumoral alfa; B. Adipoq, Adiponectina; C. Resistina; D. Leptina; E. Il6, Interleucina 6; F. Il1b, Interleucina1 beta; G. Atf4, Fator de transcrição ativador 4; H. Chop, transcrito induzível por danos ao DNA 3; I. Gadd45, Parada de crescimento e danos ao DNA induzíveis 45. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc test de Tukey, considerando *P< 0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

Os resultados das análises gênicas reforçaram as observações das fotomicrografias, demonstrando que as expressões gênicas de Adrb3 (envolvido na regulação da lipólise e da termogênese) (-25%), *Bmp8b* (uma batocina que sensibiliza o TAMi à estimulação simpática) (-42%), *Ppargc1a* (principal regulador da biogênese mitocondrial) (-64%) e *Prdm16* (gene encontrado na manutenção do fenótipo bege) (-75%) foram menores nas mães do grupo HF em comparação com as mães do grupo C. No entanto, esses genes apresentaram aumento de expressão nas mães do grupo HFMel em comparação com as mães do grupo HF, exceto para o Prdm16 (sensível apenas à melatonina nas mães do grupo CMel em comparação com as mães do grupo C, +60%). Além disso, as mães do grupo HFMel apresentaram um aumento na expressão dos genes para Mt2 (receptor de melatonina) (+474%), Tmem26 (envolvido na regulação do metabolismo e na resposta ao armazenamento de gordura) (+305%), Ppargcla (+170%), Ucp1 (+107%) e Ppara (regula a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos) (+193%) em comparação com as mães do grupo HF. As mães do grupo CMel também apresentaram um aumento na expressão dos genes para Mt2 (+188%), Tmem26 (+237%), Prdm16 (+60%), Ucp1 (+78%) e Ppara (+928%) em comparação com as mães do grupo C (Figura 12).



Figura 12. Expressão de genes relacionados à termogênese no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) das mães.

Legenda: A. Adrb3, Receptor adrenérgico, beta 3; B. Mt2, Receptor de Melatonina 1B 4; C. Bmp8b, Proteína morfogenética óssea 8b; D. Ppargc1a, Receptor ativado proliferativo de peroxissomo gama coativador 1 alfa; E. Tmem26, Proteína transmembrana 26; F. Prdm16, Domínio PR contendo 16; G. Ucp1, Proteína desacopladora 1; H. Ppara, Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomo. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc teste de Tukey, considerando *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina</p>

3.2. Capítulo 2: Massa corporal (MC), ingestão alimentar (IA), ingestão energética (IE) e metabolismo de glicose dos filhotes machos

3.2.1 Massa corporal e metabolismo de glicose dos filhotes machos

Ao nascer, os filhotes HF apresentaram uma massa corporal 16% maior, enquanto os filhotes CMel estavam 8% mais pesados do que os filhotes C (Figura 13B). No entanto, essa diferença inicial observada entre os filhotes dos grupos controles não se manteve nas semanas seguintes. Os filhotes HF continuaram a ter uma massa corporal maior em comparação com os filhotes C ao longo do experimento. A partir da quarta semana, os filhotes HFMel começaram a mostrar uma massa corporal menor do que os filhotes HF. Ao final das doze semanas de experimento, os filhotes HF apresentaram um aumento da massa corporal de 9% em relação aos filhotes C, enquanto os filhotes HFMel mostraram uma diminuição de cerca de 7% em comparação com os filhotes HF (Figura 13A). O aumento da massa corporal nos filhotes HF foi acompanhada por um aumento na ingestão alimentar e na ingestão energética em comparação com os filhotes C. Por outro lado, os filhotes HFMel apresentaram uma ingestão alimentar e energética menor em comparação aos filhotes HF (Tabela 4).



Figura 13. Evolução da massa corporal dos filhotes machos e teste oral de tolerância a glicose.

Legenda: A. Evolução de massa corporal, B. Massa corporal ao nascimento C. Curva do teste oral de tolerância a glicose, D. Área sob a curva. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc test de Tukey, considerando *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina, TOTG, Teste oral de tolerância à glicose
 Fonte: A autora, 2024

A dieta rica em gordura (HF) das mães comprometeu o metabolismo de glicose nos filhotes, como evidenciado pelo aumento da Área Sob a Curva (A.S.C) no Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG, +15%, Figuras 13C-D), hiperinsulinemia (+30%), resistência à insulina (FIRi +46%) e redução da sensibilidade à insulina (QUICKi -8%) (Tabela 4). No entanto, essas alterações no metabolismo da glicose não foram observadas nos filhotes HFMel, onde houve uma diminuição da A.S.C (-8%, Figuras 13C-D), da insulina plasmática (-40%) e do FIRi (-50%). Além disso, os filhotes HFMel apresentaram um aumento do QUICKi (+18%) em comparação com os filhotes HF (Tabela 4).

| Dados | С | CMel | HF | HFMel |
|---|--------------|--------------|----------------|---------------------|
| IA (g/dia/animal, n=10) | 1,5±0,1 | 1,50±0,04 | 1,80±0,02† | 1,50±0,06# |
| IE (kJ/dia/animal, n=10) | 24,30±2,15 | 25,0±0,7 | 29,0±0,3† | 25,3±0,9# |
| Pâncreas (g, n=10) | 0,10±0,02 | 0,10±0,02 | 0,11±0,01 | 0,11±0,01 |
| TABs, (g, n=10) | 0,15±0,009 | 0,17±0,02 | 0,28 ± 0,03† | $0,16 \pm 0,009 \#$ |
| TAMi, (g, n=10) | 0,92±0,009 | 0,11±0,01† | 0,12± 0,01† | 0,09 ± 0,01#§ |
| Insulina (pg/mL, n=5) | 619,0±93,0 | 565,0±87,2 | 804,30±106,37† | 488,00±54,66# |
| FIRi (n=5) | 2,80±0,44 | 2,70±0,45 | 4,10±0,46† | 2,10±0,43# |
| QUIKi (n=5) | 0,54±0,02 | 0,55±0,02 | 0,50±0,01† | 0,60±0,03# |
| Adiponectina (10 ⁶ pg/mL, n=5) | 8,5±0,4 | 9,80±0,71† | 6,40±0,45† | 7,60±0,16 #§ |
| C-Peptideo (pg/mL, n=5) | 282,90±38,68 | 256,50±26,94 | 413,0±25,9† | 215,1±14,3# |
| GIP (pg/mL, n=5) | 590,20±33,73 | 578,80±37,48 | 236,40±35,45† | 412,80±35,53#§ |
| Glucagon (pg/mL, n=5) | 51,20±5,52 | 40,70±12,61 | 48,60±6,62 | 40,1±15,9 |
| IL-6 (pg/mL, n=5) | 6,50±0,47 | 7,70±0,49 | 12,10±0,73† | 8,4±1,4# |
| Leptina (pg/mL, n=5) | 417,40±52,99 | 391,40±58,38 | 529,70±32,28† | 324,10±20,37# |
| PYY (pg/mL, n=5) | 323,3±51,2 | 348,50±28,87 | 177,80±29,82† | 243,20±32,89§ |
| TNFa (pg/mL, n=5) | 6,10±0,32 | 5,5±0,3 | 7,2±0,5† | 4,80±0,57# |

Tabela 4. Biometria e bioquímica dos filhotes.

Legenda: C, Controle; HF, High-fat; Mel, melatonina. Dados apresentados como média±desvio padrão, analisados por ANOVA de dois fatores e post-hoc teste de Tukey (P<0,05, onde † ≠ C; # ≠ HF; § ≠ CMel). Abreviações: FIRi, Índice de resistência à insulina em jejum; GIP, peptídeo insulinotrópico dependente de glicose; IA, Ingestão alimentar; IE, Ingestão energética; IL, interleucina; MC, Massa corporal; MP, Massa do pâncreas; PYY, peptídeo YY; QUICKi, Índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina; TAMi, Tecido adiposo marrom interescapular; TABs, Tecido adiposo subcutâneo; TNFα, fator de necrose tumoral-alfa.

Fonte: A autora, 2024

3.2.2 Análises plasmáticas dos filhotes machos

Os filhotes HF apresentaram um perfil inflamatório, com valores diminuídos de adiponectina (-15%) e níveis aumentados de IL-6 (+88%) e TNFa (+18%) em comparação com os filhotes C. Por outro lado, os filhotes HFMel apresentaram um perfil não inflamatório, com aumento de adiponectina em 18% e redução de cerca de 30% nos níveis de IL-6 e TNFa. Além disso, os filhotes CMel apresentaram níveis mais elevados de adiponectina (+16%) em comparação com os filhotes C e a prole HFMel apresentou níveis plasmáticos de adiponectina diminuído em 22% quando comparados a prole CMel (Tabela 4).

Além das alterações inflamatórias, os filhotes HF apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de peptídeo C (sua concentração no plasma reflete diretamente a quantidade de insulina produzida pelo pâncreas) (+46%), leptina (hormônio peptídico produzido principalmente pelo tecido adiposo) (+27%) e diminuição de GIP (que tem a função de estimular a liberação de insulina pelas células beta do pâncreas em resposta ao aumento da glicose sanguínea) (-60%) e PYY (-45%) em comparação com os filhotes C.

Os filhotes HFMel quando comparados os filhotes HF, apresentaram diminuição da concentração plasmática de peptídeo C (-48%) e leptina (-39%). Além do aumento da concentração plasmática de GIP em 75%.

Comparando com os filhotes CMel, os filhotes HFMel apresentaram níveis plasmáticos cerca de 30% menores de GIP e PYY. Não foram observadas diferenças nos níveis de glucagon plasmático entre os grupos, nem de PYY entre os filhotes HFMel quando comparada os HF (Tabela 4).

3.3. Capítulo 3: A suplementação de melatonina em mães com obesidade durante a gestação e lactação melhora a composição celular das ilhotas pancreáticas e a função das células beta dos filhotes machos

3.3.1 Análises histológicas do pâncreas

As ilhotas pancreáticas dos filhotes C e CMel mostraram distribuições típicas de células alfa e beta, conforme ilustrado nas duas primeiras linhas das fotomicrografias na Figura 14. No entanto, as ilhotas pancreáticas dos filhotes HF estavam hipertrofiadas em comparação com as ilhotas dos filhotes C com aumento de 193% da área da ilhota. Por outro lado, as ilhotas pancreáticas dos filhotes HFMel apresentaram uma redução de 46% da sua área em comparação com as ilhotas dos filhotes HF (Figura 10A). Como consequência, os filhotes HF apresentaram uma maior massa de células alfa (+160%) e beta (+229%) pancreática em comparação com os filhotes C. Entretanto, houve uma redução de 62% tanto na massa de células alfa quanto de célula beta nas ilhotas pancreáticas nos filhotes HFMel em comparação com os filhotes HF (Figura 14B-C).



Figura 14. Ilhotas pancreáticas dos filhotes machos adultos.

Legenda: As duas linhas mostram ilhotas pancreáticas imunomarcadas por anti-glucagon (células-alfa) e anti-insulina (células-beta) (mesmo aumento em todas as imagens). A. Área da seção transversal da ilhota, B. Massa de células alfa, C. Massa de células beta. Os dados são média ± DP, n=5/grupo, *P<0,05, **P<0,01. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.
Fonte: A autora, 2024

3.3.2 Teste de secreção de insulina

A Figura 15 ilustra a secreção de insulina *in vitro* em concentrações crescentes de glicose. Na concentração 2,8mM, os filhotes HF apresentaram um aumento na secreção de insulina de 531% em comparação com os filhotes C. No entanto, nesta mesma concentração, os filhotes HFMel reduziram a secreção de insulina em 84% em comparação com os filhotes HF. Esse padrão de resultados foi mantido nas concentrações de glicose de 11,1 mM e 22,2 mM. Além disso, na concentração de 22,2mM de glicose, os filhotes CMel apresentaram uma secreção de insulina 50% menor do que os filhotes C.



Figura 15. Secreção de insulina nas ilhotas isoladas dos filhotes machos adultos.

Legenda: Os dados são média ± DP, n=5/grupo, *P<0,05, **P<0,01. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo highfat; Mel, melatonina Fonte: A autora, 2024

3.3.3 <u>RTq-PCR: Ilhotas pancreáticas</u>

Foram quantificados os níveis de expressão gênica na ilhota pancreática de marcadores da inflamação, corroborando os achados plasmáticos. Os genes marcadores de inflamação Il6, Il1b e Tnfa apresentaram aumento significativo (Il6+70%, Il1b+315% e Tnfa+89%), enquanto o gene Sirt1 mostrou diminuição acentuada (-63%) nos filhotes HF em comparação com os filhotes C (Figura 16A-D).

Uma atenuação desse perfil inflamatório foi observada nos filhotes HFMel, com reduções expressivas na expressão de Il6 (-58%), Il1b (-52%) e Tnfa (-86%), além do aumento na expressão de Sirt1 (+157%) em comparação com os filhotes HF (Figura 16A-D). Sabe-se que as Sirtuinas podem influenciar a secreção de insulina pelas células beta do pâncreas, têm propriedades antioxidantes e podem proteger as células beta contra o estresse oxidativo.

Além disso, nos filhotes HFMel houve um aumento significativo na expressão de II1b (+814%) e diminuição na expressão de Sirt1 (-73%) em comparação com os filhotes CMel (Figura 16B e D).



Figura 16. Marcadores pró-inflamatórios na ilhota pancreática dos filhotes machos adultos.

Legenda: A. Il6, Interleucina 6; B. Il1b, Interleucina 1 beta; C. Tnfa, Fator de necrose tumoral-alfa; D. Sirt1, Sirtuína 1. Os dados são média ± DP, n=5/grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.Fonte: A autora, 2024

A expressão gênica de marcadores de estresse oxidativo e do RE foi quantificada na ilhota pancreática dos filhotes adultos. As enzimas antioxidantes Sod, Catalase e GPx desempenham uma função crucial na proteção das células contra o estresse oxidativo, incluindo as células da ilhota pancreática.

Os filhotes HF em comparação com os filhotes C apresentaram diminuição no painel das enzimas antioxidantes com expressão gênica diminuída de Sod (-38%) e Catalase (-75%) (Figura 17A e 17B).

Além disso, os marcadores do estresse do RE, os genes Chop, Gadd45 e Atf4, envolvidos na morte celular e na regulação de genes relacionados à inflamação e ao estresse do retículo, tiveram sua expressão gênica aumentada nos filhotes HF quando comparada aos filhotes C Chop (+110%), Gadd45 (+127%) e Atf4 (+239%) (Figura 17D e 17F).

No entanto, os filhotes HFMel mostraram aumento da expressão de Sod (+142%), Catalase (+219%) e Gpx (+238%) e menor expressão de Chop (-48%), Gadd45 (-45%) e Atf4 (-45%) em comparação com os filhotes HF. Adicionalmente, os genes Chop (-1733%) e Atf4 (-6133%) foram regulados negativamente nos filhotes CMel em comparação com os filhotes HFMel (Figura 17D e 17F). Foi observado também que a expressão de Sod aumentou em 37% e de Gpx em 135% nos filhotes CMel em comparação com os filhotes C (Figura 17A e 17C).

Figura 17. Marcadores de estresse oxidativo e do retículo endoplasmático na ilhota pancreática dos filhotes machos adultos.



Legenda: A. Sod, Superóxido dismutase; B. Catalase; C. Gpx, Glutationa peroxidase. D. Chop, transcrição induzível por dano de DNA 3; E. Gadd45, Interrupção do crescimento e indução de dano ao DNA 45; F. Atf4, Fator de transcrição ativador 4. Os dados são média ± DP, n=5/grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.
 Fonte: A autora, 2024

Foram quantificadas as expressões gênicas de marcadores de fatores de transcrição (Pdx1, Mafa, Neurodl, Pax4, Pax6, Pparg, Ppara, Arx) importantes para a formação e função adequada das células beta, garantindo sua capacidade de produzir e secretar insulina na ilhota pancreática dos filhotes adultos.

Os filhotes HF mostraram expressão gênica diminuída de Pdx1 (-36%), Mafa (-60%), Neurod1 (-65%), Pax6 (-31%) e Pparg (-75%) em comparação com os filhotes C. Por outro lado, os filhotes HFMel apresentaram a expressão desses genes restaurada, exceto para o Pax6, quando comparados aos filhotes HF (Pdx1: +107%; Mafa: +194%; Neurod1: +355%; Pparg: +565%) (Figura 18A, 18B, 18C, 18F e 18H). Além disso, nos filhotes CMel, foi observado um aumento na expressão de Pdx1 (+30%) e Neurod1 (+144%) em comparação com os filhotes C (Figura 18A e 18C).

A administração de melatonina tanto em mães HF quanto em mães C foi capaz de aumentar a expressão gênica de Arx (+86%) no grupo CMel e no grupo HFMel (+70%), em

comparação com os grupos C e HF, respectivamente (Figura 18D). Essa mesma ação foi evidenciada na expressão de Ppara (um fator transcricional que transcreve genes termogênicos), onde os filhotes CMel apresentaram um aumento de 613% em relação aos filhotes C, enquanto a expressão nos filhotes HFMel foi 2800% maior do que nos filhotes HF (Figura 18G).

O marcador gênico Pax4 é altamente específica para as células beta pancreáticas e está envolvido principalmente na regulação da secreção de insulina e na manutenção da homeostase glicêmica. Nesse contexto, os filhotes HF apresentaram aumento na expressão de Pax4 (+275%) em comparação com os filhotes C, enquanto essa expressão foi reduzida nos filhotes HFMel em comparação com os filhotes HF (-31%) (Figura 18E).

Figura 18. Fatores de transcrição e marcadores de identificação de células beta dos filhotes machos adultos.



Legenda: A. Pdx 1, homeobox duodenal pancreático 1; B. Mafa, família de oncogenes de fibrossarcoma musculoaponeurótico v-maf; C. Neurod1, diferenciação neurogênica 1; D. Arx, fator de transcrição aristaless-related homeobox gene; E. Pax4, paired box 4; F. Pax6, paired box 6; G. Ppara, receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; H. Pparg, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama. Os dados são média ± DP, n=5/grupo, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.</p>

3.4 Capítulo 4: A suplementação de melatonina em mães com obesidade reduz a inflamação hipotalâmica e aumenta a termogênese nos filhotes machos

3.4.1 Imuno-histoquímica e RTq-PCR - Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs)

Os filhotes C exibiram adipócitos uniloculares de tamanho normal. Em contraste, os filhotes HF apresentaram adipócitos uniloculares hipertrofiados. No entanto, nos filhotes CMel e HFMel, foram observadas a presença de adipócitos beges multiloculares entremeados aos adipócitos brancos, além da imunomarcação positiva das proteínas termogênicas B3AR e UCP1, caracterizando o processo de amarronzamento no TABs (Figura 19).

Figura 19. Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo branco subcutâneo dos filhotes machos adultos.



Legenda: Na primeira linha, cortes histológicos representativos corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Na segunda e terceira linha, cortes histológicos com imunomarcação de proteínas termogênicas: receptor beta-3 adrenérgico (beta3AR) e proteína desacopladora-1 (UCP1) e contra corados com hematoxilina (mesmo aumento em todas as imagens). Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

Os resultados da análise da expressão gênica relacionada ao amarronzamento e da atividade e biogênese mitocondrial no TABs dos filhotes, conforme previsto, demonstraram que os filhotes HF apresentaram uma diminuição significativa na expressão dos genes relacionados ao amarronzamento em comparação com os filhotes C: Adrb3 (-77x%), Tfam (-68%), Prdm16 (-65%), Bmp8b (uma batocina que sensibiliza o TAMi à estimulação simpática) (-92%) e Ucp1 (um transcrito do Ppara e efetor da termogênese) (-72%). Além disso, os genes marcadores da atividade e biogênese mitocondrial também mostraram uma diminuição em sua expressão nos filhotes HF em comparação com os filhotes C: Cpt1b (-54%), Ppargc1a (um regulador essencial da biogênese mitocondrial e um regulador transcricional de Pparα e Ucp1) (-60%) e Pparg (-93%) (Figura 20A, 20C, 20D, 20E e 20F).

Por outro lado, os filhotes HFMel, cujas mães receberam suplementação de melatonina, apresentaram um aumento significativo na expressão dos genes relacionados ao amarronzamento em comparação com os filhotes HF: Adrb3 (+252%), Tfam (+240%), Prdm16 (gene encontrado na manutenção do fenótipo bege) (+168%), Bmp8b (+911%) e Ucp1 (+224%). Além disso, os genes marcadores da atividade e biogênese mitocondrial, característicos do tecido adiposo bege, também tiveram um aumento em sua expressão nos filhotes HFMel em comparação com os filhotes HF, incluindo Cpt1b (+102%), Ppargc1a (+137%), Pparg (+545%) e Ppara (+713%) (Figura 20G, 20H e 20J).

A expressão gênica do Mt2, que é essencial para a proteção celular contra danos causados por estresse oxidativo, apoptose e processos inflamatórios, foi maior nos filhotes CMel (+176%) e HFMel (+407%) em comparação com os filhotes C e HF, respectivamente (Figura 20B).

Além disso, os filhotes CMel apresentaram um aumento na expressão dos genes Ucp1 (+27%), Ppargc1a (+35%) e Ppara (+877%) em comparação com os filhotes C. No entanto, ao comparar os filhotes CMel e HFMel, observou-se uma diminuição na expressão dos genes Ucp1 (-27%), Ppargc1a (-31%) e Pparg (-40%) (Figura 20F, 20H, 20J).



Figura 20. Expressão gênica no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs) dos filhotes machos adultos.

Legenda: A. Adrb3, receptor adrenérgico beta 3; B. Mt2, receptor de melatonina 1B; C. Tfam, fator de transcrição A mitocondrial; D. Prdm16, domínio PR contendo 16; E: Bmp8b, proteína morfogenética óssea 8b; F. Ucp1, proteína de desacoplamento-1; G. Cpt1b, carnitina palmitoil transferase 1b; H. Ppargc1a, receptor gama ativado proliferativo de peroxissoma coativador 1-alfa; I. Pparg, receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; J. Ppara, receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc teste de Tukey, considerando *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

3.4.2 Imuno-histoquímica e RTq-PCR - Tecido adiposo marrom interescapular (TAMi)

Foram quantificadas as expressões gênicas no TAMi dos filhotes adultos: Adrb3 (relacionada com a termogênese e lipólise no tecido adiposo marrom), Mt2 (receptor de melatonina e um antioxidante), Bmp8b (relacionado à termogênese), Vegfa (relacionado à angiogênese e a regulação do suprimento de sangue para o tecido adiposo marrom), Cidea (relacionado à regulação da lipólise e a formação de gotículas lipídicas no TAM), Nrf1 (relacionado à regulação da biogênese mitocondrial e a resposta ao estresse oxidativo no TAM), Fgf21 (regulação do metabolismo energético, à termogênese e à resposta ao estresse metabólico no tecido adiposo marrom) e Ucp1 (proteína chave na regulação da termogênese no TAM). Os resultados da análise da expressão gênica relacionada aos biomarcadores termogênicos no TAMi demonstraram que os filhotes HF apresentaram uma diminuição significativa em comparação com os filhotes C: Adrb3 (-52%), Bmp8b (-63%), Vegfa (-61%), Cidea (-89%) e Ucp1 (-70%) (Figura 21A, 21C, 21D, 21E e 21H).

A expressão gênica do Mt2 foi maior nos filhotes CMel (+180%) e HFMel (+425%) em comparação com os filhotes C e HF, respectivamente (Figura 21B).

Por outro lado, a expressão gênica dos biomarcadores termogênicos foi aumentada nos filhotes HFMel em comparação com os filhotes HF: Adrb3 (+84%), Bmp8b (+114%), Vegfa (+152%), Cidea (+660%), Nrf1(+78%) e Ucp1 (+51%) (Figura 21A, 21C, 21D, 21E, 21F e 21H).

A expressão gênica do Fgf21 foi aumentada nos filhotes CMel em comparação com os filhotes C (+91%), entretanto foi diminuída nos filhotes HF em comparação com os filhotes C (-77%) e nos filhotes HFMel em comparação com os filhotes CMel (-61%) (Figura 21G).



Figura 21. Expressões gênicas no tecido adiposo marrom interescapular (TAMi) dos filhotes machos adultos

Legenda: A. Adrb3, receptor adrenérgico beta 3; B. Mt2, receptor de melatonina 1B; C. Bmp8b, proteína morfogenética óssea 8b; D. Vegfa, fator de crescimento endotelial vascular A; E: Cidea, fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular efetor semelhante à subunidade alfa A; F. Nrf1, fator respiratório nuclear 1; G. Fgf21, fator de crescimento de fibroblastos 21; H. Ucp1, proteína de desacoplamento-1. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc teste de Tukey, considerando *P< 0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.</p>

Fonte: A autora, 2024

A imunomarcação das proteínas típicas de TAMi - beta3AR e UCP, ilustrada na Figura 22, revelou diferenças marcantes entre os grupos estudados. Nos filhotes HF, houve um aumento pronunciado de gotículas de gordura, indicando um fenótipo de adipócito branco, um fenômeno conhecido como embranquecimento. Esse fenômeno representa a transformação do tecido adiposo marrom para branco, o que foi corroborado pela redução na imunomarcação das proteínas beta3AR e UCP1.

Por outro lado, nos filhotes HFMel, observou-se a preservação da distribuição tecidual, com a presença de gotículas de gordura marrom multiloculares e funcionais. Esses achados sugerem um efeito protetor da melatonina materna na preservação do TAMi nos filhotes HFMel, impedindo o processo de embranquecimento e mantendo a funcionalidade do TAMi.

Figura 22. Fotomicrografias do tecido adiposo marrom interescapular dos filhotes machos adultos.



Legenda: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos. Na primeira linha, cortes histológicos representativos corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Na segunda e terceira linha, cortes histológicos marcados para ativação de proteínas termogênicas: receptor beta-3 adrenérgico (beta3AR) e proteína desacopladora-1 (UCP1) e contra corados com hematoxilina (mesmo aumento em todas as imagens). Nos filhotes HF, observa-se invasão do TAMi por gotículas de gordura (setas abertas), acompanhada pela diminuição na imunomarcação das proteínas no TAMi. No entanto, a suplementação materna com melatonina preservou o tecido adiposo marrom, apresentando gotículas de gordura marrom multiloculares e funcionais nos filhotes HFMel (setas pretas). Os valores são apresentados em média \pm DP (n=5/grupo). Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

3.4.3 <u>RTq-PCR e Western Blotting (WB) – Hipotálamo</u>

Os marcadores gênicos no hipotálamo desempenham papéis específicos na regulação do metabolismo, da resposta imunológica e do comportamento alimentar. Os genes Tnfa, Il6 e Il10, por exemplo, estão associados à modulação da resposta inflamatória e podem influenciar a regulação do apetite e do metabolismo em situações inflamatórias.

Nos filhotes HF, em comparação com os filhotes C, houve um aumento na expressão gênica do Tnfa (+239%) e Il6 (+204%), mas a expressão gênica da Il10 não foi afetada. Entretanto, nos filhotes HFMel, comparados aos filhotes HF, houve uma redução na expressão gênica dos marcadores de inflamação Tnfa (-56%) e Il6 (-80%), e um aumento na Il10 (+238%). Além disso, a expressão gênica da Il10 também aumentou nos filhotes CMel em comparação com os filhotes C (+305%) (Figura 23A, 23B e 23C).

A expressão gênica do Bmp8b, essencial para a regulação do metabolismo energético, incluindo o balanço energético e a termogênese, foi maior nos filhotes CMel (+228%) e HFMel (+143%) em comparação com os filhotes C e HF, respectivamente 23D.

Além disso, foram avaliadas a expressão gênica dos genes Pomc, precursor de peptídeos envolvidos no controle do apetite e da saciedade, e Npy, que estimula o apetite e regula o balanço energético, sendo considerado um neuropeptídeo orexigênico. Nos filhotes HF, houve uma redução na expressão gênica do Pomc (-97%) e um aumento da expressão gênica do Npy (+368%) em comparação com os filhotes C. Nos filhotes HFMel, observou-se um aumento significativo na expressão gênica do Pomc (+4320%) e um diminuição na expressão gênica do Npy (-68%) em relação aos filhotes HF. Além disso, os filhotes CMel apresentaram um aumento na expressão gênica do Pomc (+132%) em comparação com os filhotes C. No entanto, ao comparar os filhotes CMel e HFMel, houve uma diminuição na expressão do Pomc (-41%) (Figura 23E e 23F).



Figura 23. Expressões gênicas hipotalâmicas dos filhotes machos adultos

Legenda: A. Tnfa, Fator de necrose tumoral alfa; B. Il6, Interleucina-6; C. Il10, Interleucina-10; D: Bmp8b, Proteína morfogenética óssea-8; E: Pomc, Pró-opiomelanocortina-alfa; F: Npy, neuropeptídeo Y. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc teste de Tukey, considerando *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

Fonte: A autora, 2024

Os marcadores proteicos no hipotálamo desempenham funções específicas na regulação de processos fisiológicos e comportamentais. A expressão proteica do MT1, essencial para a regulação do ritmo circadiano, metabolismo e resposta ao estresse oxidativo, foi maior nos filhotes HFMel (+65%) em comparação aos filhotes CMel e, acentuadamente maior nos filhotes HFMel (+133%) em comparação com os filhotes HF (Figura 24A).

Além disso, foram avaliadas as expressões proteicas do NFKB, um fator de transcrição crucial na regulação da resposta inflamatória e ativação de genes relacionados à resposta imune e apoptose; a razão entre AMPKp/AMPKt, que reflete a atividade da AMPK na regulação do metabolismo energético, incluindo glicose e síntese de lipídios; o NPY, um neuropeptídeo orexigênico que estimula o apetite e regula o balanço energético e comportamento alimentar; e o POMC, precursor de peptídeos envolvidos no controle do apetite e da saciedade.

Nos filhotes HF, em comparação com os filhotes C, houve um aumento na expressão proteica do NFKB (+137%), da razão AMPKp/AMPKt (+85%) e do NPY (+57%), mas a

expressão proteica do POMC não foi afetada em nenhum grupo. No entanto, nos filhotes HFMel, em comparação com os filhotes HF, houve uma redução na expressão proteica do NFKB (-57%), da razão AMPKp/AMPKt (-52%) e uma diminuição na expressão proteica do NPY (-45%) (Figura 24B, 24C, 24D, 24E, 24F).



Figura 24. Expressões de proteínas hipotalâmicas dos filhotes machos adultos.

Legenda: A. MT1, receptor 1 de melatonina; B. NFKB, fator nuclear kappa B; C. razão AMPKp/AMPKt, proteína quinase ativada por AMP; D. NPY, neuropeptídeo Y; E. POMC, pró-opiomelanocortina-alfa; F. Blotting representativo. Os valores são apresentados em média ± DP (n=5/grupo), Two-way ANOVA e post-hoc teste de Tukey, considerando *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina.

Fonte: A autora, 2024

3.4.4 Análise dos componentes principais (ACP) da prole de machos

O mapa de calor é uma ferramenta útil para identificar as variáveis mais influentes na matriz de correlação. Neste contexto, as variáveis com os maiores coeficientes são representadas em azul escuro, enquanto aquelas com coeficientes menores são representadas em vermelho (Figuras 25A e 26A). A variação cumulativa dos dois primeiros Componentes Principais (CPs) foi de 71,71% no estudo da termogênese e 73,33% no estudo da inflamação hipotalâmica (Figuras 25B e 26D), justificando assim a inclusão dos CPs 1 e 2 na análise.

O gráfico biplot da Análise dos Componentes Principais (ACP) para o tecido adiposo revelou que todos os genes relacionados à termogênese se deslocaram em direção aos filhotes C, CMel e HFMel (nenhum gene migrou para os filhotes HF) (Figura 25C). Além disso, o gráfico biplot do hipotálamo evidenciou uma mudança nos genes inflamatórios (IL6 e TNFa) e anabólicos (NPY) para os filhotes HF, enquanto ocorreu uma transição para genes antiinflamatórios (IL10) e catabólicos (POMC) nos filhotes C, CMel e HFMel (Figura 26C). Por fim, a disposição dos grupos estudados evidenciou a separação dos filhotes HF dos demais grupos (incluindo os filhotes HFMel), uma distinção válida tanto para o tecido adiposo quanto para o hipotálamo (Figuras 25D e 26D).

Figura 25. Matriz de Correlação (coeficientes r de Pearson) e Análise de Componentes Principais (ACP) dos marcadores termogênicos do tecido adiposo dos filhotes machos adultos.



Legenda: A. O Heatmap ilustra a matriz de correlação das expressões gênicas; B. Variância acumulada; C. Biplot indica a direção da expressão gênica em sobreposição com os grupos; D. As pontuações do PC separam os grupos. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina; PC, componentes principais..



Figura 26. Matriz de Correlação (coeficientes r de Pearson) e Análise de Componentes Principais dos marcadores pró-inflamatórios hipotalâmicos dos filhotes machos adultos.

Legenda: A. O Heatmap ilustra a matriz de correlação das expressões gênicas; B. Variância acumulada; C. Biplot indica a direção da expressão gênica em sobreposição com os grupos; D. As pontuações do PC separam os grupos. Siglas: C, grupo controle; HF, grupo high-fat; Mel, melatonina; PC, componentes principais.

4 DISCUSSÃO

As mães do grupo que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo na massa corporal, disfunção no metabolismo da glicose resultando em resistência à insulina, e um perfil pró-inflamatório, o que caracteriza a condição de obesidade. No entanto, a suplementação de melatonina durante a gestação e lactação reduziu o ganho de peso, melhorou o metabolismo da glicose, restaurou os níveis de adiponectina e reduziu os marcadores próinflamatórios e o estresse de RE no TABo. Além disso, a melatonina potencializou os mediadores do amarronzamento no TABs. Estes resultados sugerem que a melatonina pode beneficiar a regulação do metabolismo energético e o controle da glicose, destacando seu potencial como alvo terapêutico para resistência à insulina e obesidade.

Os resultados deste trabalho indicam que a melatonina pode reduzir a glicose plasmática (Sartori et al., 2009), aumentando sua utilização, captação ou síntese de glicogênio(Albreiki et al., 2021), como indicado em estudos anteriores. A melhora no metabolismo glicídico observada nas mães do grupo HFMel pode ser explicada pelo aumento da expressão gênica e dos níveis plasmáticos de adiponectina, uma vez que essa proteína é uma potente sensibilizadora de insulina (Prieto-Hontoria et al., 2013).

Na literatura, a dosagem de melatonina para adultos varia de 1 a 100 mg/dia (Szewczyk-Golec et al., 2015; Karamitri e Jockers, 2019). Em um estudo com camundongos C57BL6, foi utilizada a dose de 10 mg/kg/dia para avaliar desfechos metabólicos (Sun et al., 2016), justificando a escolha desta dose para este estudo.

A hipótese de que a melatonina poderia influenciar positivamente a expressão gênica das citocinas no TABo e melhorar os distúrbios glicêmicos em fêmeas com obesidade, mesmo mantendo uma dieta rica em gordura foi comprovada. No contexto da obesidade, com aumento na deposição de gordura visceral, é importante destacar a produção de citocinas próinflamatórias, como o TNF-alfa, Il1b e IL6, e resistina. Essas substâncias podem atuar através de mecanismos parácrinos, inibindo diretamente a ação da insulina nas células-alvo e resultando em resistência sistêmica à insulina (Fève e Bastard, 2009).

As alterações metabólicas nas mães com obesidade estavam associadas ao aumento do estresse de RE. O estresse do RE desempenha um papel importante na patogênese da obesidade e na resistência à insulina, contribuindo para o acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas, o que pode levar ao aumento da adiposidade e à redução do gasto energético (Ajoolabady et al., 2022). A disfunção do RE é característica de doenças metabólicas associadas
à obesidade e à regulação imunológica (Hummasti e Hotamisligil, 2010). Dietas obesogênicas favorecem o estresse no RE e comprometem a maturação proteica, levando ao acúmulo de proteínas mal dobradas e ativando a resposta ao estresse (Diehl et al., 2011). A ativação prolongada da Resposta ao Desdobramento de Proteínas (UPR) está associada ao desenvolvimento de doenças como resistência à insulina, DM2 e inflamação (Sozen et al., 2015), conforme observado nas mães com obesidade (grupo HF).

A suplementação de melatonina em mães com obesidade reduziu a expressão de genes relacionados ao estresse de RE. Um componente importante nessa via de apoptose mediada pelo estresse no RE é a proteína homóloga C/EBP (Chop), reguladora da parada de crescimento e genes induzidos por danos ao DNA, como Gadd45 (Oyadomari e Mori, 2004). O estresse do RE também leva à expressão de Atf4, aumentando a transcrição de Chop e relacionando-se à apoptose por meio da modulação de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas (Fernández et al., 2015). Desta forma, a suplementação de melatonina parece reduzir essa expressão gênica, atenuando o estresse do RE e indicando um possível mecanismo para seus efeitos protetores.

A administração de melatonina resultou em uma mudança nos adipócitos do TABs das mães do grupo HFMel, fazendo com que eles se tornassem multiloculados, indicando uma transição para um fenótipo bege. A multiloculação de adipócitos, característica do TAM, está associada ao aumento da capacidade termogênica e do gasto energético (Bargut et al., 2017). Esta transição está associada ao aumento da capacidade termogênica e do gasto energético, o que pode proteger contra os efeitos prejudiciais da obesidade (Montanari et al., 2017). Esses efeitos podem ser atribuídos à ativação dos receptores Adrb3 e do MT1b (Saarela e Reiter, 1994; Montanari et al., 2017), sugerindo um mecanismo potencialmente importante para os efeitos protetores da melatonina nesse contexto.

Estudos em modelos animais e em cultura de células 3T3-L1 mostraram que a melatonina induziu o amarronzamento no TABs, aumentando a expressão de PGC-1a e UCP-1 (Jiménez-Aranda et al., 2013; Kato et al., 2015). Além disso, observamos um aumento na expressão do gene Prdm16 nas mães do grupo CMel. Sabe-se que o Prdm16 desempenha um papel essencial na manutenção do escurecimento do tecido adiposo (Harms et al., 2014). Esses resultados são relevantes, pois além da melatonina estar associada à redução da inflamação e à ativação da termogênese adaptativa, o presente estudo investigou esses efeitos em fêmeas, diferentemente da maioria dos outros estudos experimentais que se concentraram apenas em machos.

A obesidade materna desencadeia processos inflamatórios (Kretschmer et al., 2020; Enstad et al., 2021), que resultam em estresse oxidativo (Napso et al., 2022) e estresse do RE (Park et al., 2020). Em contrapartida, a melatonina restaura a função fisiológica durante a gravidez, reduzindo o dano oxidativo na placenta (Chuffa et al., 2019), melhorando a transferência de nutrientes e otimizando a dinâmica vascular (Saat et al., 2019). É importante salientar que a capacidade da melatonina de atravessar a placenta, influencia diretamente o desenvolvimento dos filhotes, influenciando suas funções neurais, cerebrais, energéticas e glicídicas (Gomes et al., 2021a).

A epigenética desempenha um papel fundamental na regulação da saúde metabólica a longo prazo, envolvendo a metilação do DNA e modificações das histonas (Portela e Esteller, 2010; Oger et al., 2014). Esses processos atuam como uma "memória" das exposições precoces, influenciando diretamente a expressão gênica no TAB dos filhotes e, consequentemente, sua saúde metabólica (Hanson et al., 2011). Intervenções nutricionais durante a gestação podem modular esses mecanismos epigenéticos, proporcionando impactos significativos na saúde metabólica futura dos filhotes(Liang et al., 2016a).

A melatonina desempenha um papel crucial na regulação de processos epigenéticos, atuando na inibição da DNA metiltransferases e histonas desacetilases (Korkmaz e Reiter, 2008; Tain et al., 2014a). Sua capacidade de modular a metilação do DNA e participar da desmetilação durante o desenvolvimento do tecido adiposo mostra seu potencial em atenuar doenças na idade adulta, influenciando diretamente a programação epigenética (Lui et al., 2015; Tain e Hsu, 2022).

Os níveis plasmáticos de melatonina materna apresentam ritmicidade diurna, e aumentam no final da gestação (Nakamura et al., 2001). Sua ação direta sobre as células musculares lisas miometriais é sinérgica com a ocitocina, facilitando as contrações uterinas durante a noite (Olcese et al., 2013). A melatonina atravessa a placenta livremente (Schenker et al., 1998; Berbets et al., 2021), promovendo a vascularização placentária ao remodelar as artérias espirais uterinas (Redman e Sargent, 2005) e se ligando aos seus receptores nos tecidos fetais (Williams et al., 1991). Ela também é um componente do leite materno (Reppert e Klein, 1978; Illnerová et al., 1993).

Em estudos com animais, a melatonina exógena reduziu a resposta inflamatória, diminuindo as citocinas inflamatórias como a II1b e o Tnfa (El-Shenawy et al., 2002; Carrascal et al., 2018), e atenuou a inflamação no sistema nervoso central (Cho et al., 2021). Suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes melhoram a saúde dos ovócitos, sugerindo seu efeito protetor para atenuar o impacto da obesidade materna nos filhotes (Yong et al., 2021).

Além disso, a melatonina atenua insultos precoces que podem levar a doenças crônicas nas gerações seguintes (Tain et al., 2014b). Seus efeitos incluem a regulação da hipertensão arterial sistêmica (Tain et al., 2014c) e o remodelamento benéfico da estrutura hepática (Ajackson et al., 2023). A Figura 27 resume os achados encontrados nas mães obesas tratadas com melatonina.

Figura 27. Resumo gráfico dos resultados da suplementação de melatonina obtidos nas mães com obesidade.



Legenda: A A suplementação de melatonina em mães com obesidade demonstrou efeitos benéficos na redução da inflamação no tecido adiposo branco ovariano (TABo) e no tecido adiposo branco subcutâneo (TABs). A seta para cima indica um aumento e a seta para baixo indica uma diminuição nos níveis de expressão ou atividade dos seguintes genes e proteínas: Adrb3, receptor adrenérgico beta 3; Mt2, receptor de melatonina 1B 4; Bmp8b, proteína morfogenética óssea 8b; Ppargc1a, receptor ativado proliferativo de peroxissomo gama coativador 1 alfa; Tmem26, proteína transmembrana 26; Prdm16, domínio PR contendo 16; Ucp1, proteína desacopladora 1; Ppara, receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomo.

Fonte: A autora, 2024

No contexto dos filhotes, a obesidade materna tem impactos adversos no remodelamento das ilhotas pancreáticas e no metabolismo dos filhotes machos, levando a uma menor produção de insulina e a problemas no controle glicêmico (Mandarim-de-Lacerda, 2019a, b; Ornellas et al., 2020). Essas mudanças resultam em desregulação de marcadores próinflamatórios, estresse oxidativo e do RE, comprometendo a função das células beta e afetando a homeostase glicêmica (Cerf, 2011, 2015). No entanto, essas alterações foram amenizadas nos filhotes HFMel, confirmando a hipótese de que a suplementação de melatonina materna melhora a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose, concordando com os resultados de outro estudo (Sartori et al., 2009). Esses achados indicam um efeito protetor da melatonina contra os impactos negativos da obesidade materna no metabolismo e na função das ilhotas pancreáticas dos filhotes.

A melatonina tem efeito antioxidante e protege contra a resistência à insulina associada à obesidade (Xu et al., 2022), ao impedir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e regular o estado redox nas células beta (Zephy e Ahmad, 2015). Ela aumenta a expressão e atividade de enzimas antioxidantes (Mayo et al., 2002) e reduz a acetilação da SODK68 em cultura de ovócitos (Han et al., 2017). Os resultados da presente pesquisa mostraram melhora nas enzimas Sod, catalase e Gpx, e redução de citocinas pró-inflamatórias na ilhota pancreática dos filhotes HFMel, destacando a interação entre inflamação e estresse oxidativo (Dandekar et al., 2015).

A melatonina também regula a expressão e o deslocamento do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) por meio de seus receptores de membrana acoplados à proteína G, e a fosforilação do receptor de insulina e substratos intracelulares que ativam a via de sinalização da insulina (Cipolla-Neto et al., 2014). No estudo em questão, a suplementação de melatonina foi associada à perda de peso nas mães com obesidade e em seus filhotes, resultado que concorda com um trabalho prévio que mostrou que a melatonina contribui para um balanço energético adequado ao regular o fluxo de energia (Cipolla-Neto et al., 2014). A suplementação materna de melatonina também melhorou a intolerância à glicose e a resistência à insulina nos filhotes, aumentando a expressão gênica de Pparg na ilhota pancreática, um sensibilizador de insulina.

No presente estudo, observou-se nos filhotes de mãe obesas suplementadas com melatonina, o aumento da expressão gênica das enzimas do estresse oxidativo e de Sirt1 nas ilhotas pancreáticas. Esses resultados associados podem sugerir a redução tanto do estresse oxidativo quanto do estresse do RE (Xu et al., 2020). Esses dados estão de acordo com um estudo, no qual os autores utilizaram células beta pancreáticas in vitro. O estudo demonstrou

que a melatonina exerce uma forte inibição do estresse oxidativo e uma inibição parcial do estresse do RE (Park et al., 2014).

É sabido que a obesidade materna prejudica a função das células beta em roedores (Cerf et al., 2005) e em humanos (Black et al., 2013). Neste estudo, observou-se um impacto negativo da obesidade materna na regulação gênica relacionada à diferenciação, maturação e metabolismo da glicose das células beta dos filhotes. Os resultados mostraram que houve um aumento da expressão dos genes Pdx1, Mafa, e Neurod1 nos filhotes de mãe obesas suplementadas com melatonina

Fatores de transcrição como Pdx1 são essenciais em vários estágios do desenvolvimento pancreático e da diferenciação das células beta (Offield et al., 1996), com expressão diminuída na resistência à insulina e no DM2 (Lin e Vuguin, 2012; Yang et al., 2012). Em um ambiente de resistência à insulina, há hiperglicemia, hiperinsulinemia, aumento do FIRi e diminuição do QUICKi. Nos filhotes de mães obesas, a insulina não reduziu a glicemia como esperado, mesmo com as ilhotas pancreáticas secretando insulina em resposta à diferentes concentrações de glicose. Isso pode ter ocorrido pela deficiência de Pdx1, que torna as células beta mais vulneráveis ao estresse do RE. O Pdx1 regula genes relacionados à formação de pontes dissulfeto, enovelamento de proteínas e resposta às proteínas mal dobradas. A redução na expressão de Pdx1 nos filhotes de mães obesas pode ter contribuído para a falha das células beta em compensar a resistência à insulina, devido à incapacidade de realizar funções essenciais no RE (Sachdeva et al., 2009).

O Mafa presente em células beta adultas, é essencial para a produção de insulina (Matsuoka et al., 2004) e para a regeneração das células beta a partir de células-tronco pluripotentes (Rezania et al., 2014). O gene Neurod1 é identificado no pâncreas em desenvolvimento na fase embrionária (Naya et al., 1997) e desempenha um papel crucial na preservação das células beta funcionais na vida adulta (Gasa et al., 2008).

Nesse trabalho, a obesidade materna diminuiu a expressão de Pax6 nos filhotes, e essa redução não foi afetada pela suplementação materna de melatonina. O Pax6 é detectado no final do período embrionário e atua como regulador transcricional crítico na função das células beta adultas (Lorberbaum et al., 2020) e sua expressão reduzida pode estar ligada à falência das células beta no diabetes (Swisa et al., 2017).

A suplementação materna de melatonina aumentou a expressão gênica de Arx e diminuiu a de Pax4 em filhotes de mães obesas. Entretanto não houve diferença na expressão gênica de glucagon. O Pax4, expresso em células progenitoras endócrinas durante o desenvolvimento do pâncreas (Lin e Vuguin, 2012), tem um papel essencial na diferenciação

das células beta (Sosa-Pineda, 2004; Collombat et al., 2005). Já expressão de Arx tem início durante o desenvolvimento do pâncreas em camundongos e persiste nas células alfa maduras (Collombat et al., 2003). Embora Arx seja essencial para a especificação e manutenção precoce das células alfa (Bramswig e Kaestner, 2011), não está diretamente envolvido na expressão de glucagon (Gosmain et al., 2011). Portanto, o efeito da melatonina sobre a secreção de glucagon é controverso (Peschke et al., 2010; Bähr et al., 2011). Neste contexto, o impacto da suplementação materna de melatonina nos filhotes foi indireto (administrado às mães), o que pode explicar a ausência de alterações programadas na secreção de glucagon nos filhotes. O equilíbrio entre Pax4 e Arx é crucial nas ilhotas pancreáticas (Collombat et al., 2005).

Os resultados deste trabalho mostraram que mães com obesidade suplementadas com melatonina promovem o remodelamento celular nas ilhotas pancreáticas dos filhotes adultos, preservando a secreção de insulina estimulada por glicose. Esses achados concordam com o estudo que demonstrou que em ratas pinealectomizadas, o metabolismo de glicose ficou prejudicado, incluindo a desregulação na secreção de insulina (Gomes et al., 2021b).

A desdiferenciação das células beta, caracterizada pela redução da expressão gênica relacionada à função das células beta maduras e pelo aumento das células precursoras endócrinas (Wang e Zhang, 2021), foi observada nos filhotes de mães obesas, indicando maior suscetibilidade à falência das células beta. A suplementação materna de melatonina parece beneficiar a função das células beta dos filhotes adultos.

Além das alterações no pâncreas e no metabolismo de glicose, a obesidade materna influenciou o tecido adiposo e o hipotálamo dos filhotes. A administração de melatonina resultou em uma redução nos marcadores de neuroinflamação e regulou neuropeptídeos hipotalâmicos, promovendo o amarronzamento do TABs e ativando o TAMi, levando à termogênese nos filhotes. Esses efeitos podem explicar a redução na massa corporal observada nos filhotes de mães obesas suplementadas com melatonina.

Embora a suplementação de melatonina em mães com obesidade não tenha afetado sua ingestão alimentar, seus filhotes mostraram redução na ingestão de alimentos e na massa corporal, além de restaurar a concentração plasmática de leptina. A diminuição da inflamação hipotalâmica nos filhotes HFMel pode ser explicada pela redução na sinalização da via do NFKB, que desempenha um papel patogênico em várias doenças inflamatórias (Liu et al., 2017) e pelo aumento na expressão gênica de Il10, suprimindo citocinas inflamatórias (Steen et al., 2020).

A obesidade materna não apenas prejudica a sinalização hipotalâmica, levando à hiperfagia (Ornellas et al., 2016), mas também afeta a expressão de Pomc, um neuropeptídeo

catabólico, Npy, anabólico, ambos cruciais para o controle da ingestão alimentar. Nesse estudo, a melatonina administrada às mães com obesidade regulou a expressão desses neuropeptídeos na prole de mães obesas suplementadas com melatonina, o que pode explicar a redução na ingestão alimentar e a perda de peso observadas nesse grupo. Esses achados sugerem que a melatonina pode contrabalançar os efeitos adversos da neuroinflamação e dos padrões alimentares prejudiciais nos filhotes (Sagrillo-Fagundes et al., 2016).

Além da redução da neuroinflamação hipotalâmica, os filhotes que as mães com obesidade receberam melatonina também apresentaram diminuição na atividade da AMPK. Estudos anteriores mostraram que o agonista GLP1 reduz a atividade da AMPK hipotalâmica, levando ao amarronzamento do TABs e à ativação do TAMi (Beiroa et al., 2014; Contreras et al., 2016). Essa diminuição da AMPK também está associada à redução da expressão de NPY e ao aumento de POMC, resultando em menor ingestão alimentar e perda de peso (Minokoshi et al., 2004; López, 2018), o que está em concordância com os achados deste estudo. Inclusive, evidências demonstraram que o elevado consumo materno de gordura pode programar permanentemente o sistema de apetite hipotalâmico, favorecendo as vias orexígenas nos filhotes e predispondo-os a distúrbios metabólicos (Breton, 2013; Ornellas et al., 2016).

Em estudos in vitro, o tratamento com melatonina em adipócitos 3T3-L1 mostrou aumentar a atividade mitocondrial, a expressão de UCP1 e Pgc1a (Kato et al., 2015). Além disso, a melatonina induziu a conversão de adipócitos brancos para bege em ratos Zucker (Jiménez-Aranda et al., 2013), concordando nossos resultados em camundongos. Um estudo com células-tronco mesenquimais de gordura inguinal de ratos e lipoaspirados humanos, também observou um aumento na transdiferenciação de adipócitos, resultando no aparecimento de adipócitos bege (Salagre et al., 2022), o que está relacionado ao aumento dos marcadores de termogênese observados no TABs dos filhotes de mães obesas suplementadas com melatonina.

Neste estudo, foi observado que a obesidade materna programou negativamente o TAMi com diminuição da expressão gênicas dos marcadores característicos da termogênese e o aparecimento de adipócitos maiores e semelhantes ao branco. Alguns estudos já relataram o potencial da dieta rica em gordura nesse remodelamento do TAMi (Shimizu et al., 2014). Aqui, trazemos a contribuição da programação materna neste desfecho.

Alguns mecanismos podem explicar a mudança do fenótipo desse tecido como por baixa atividade do SNS, onde a sinalização noradrenérgica é essencial para a manutenção do fenótipo marrom (Cannon e Nedergaard, 2004). O Bmp8b atua de maneira central para aumentar a produção simpática e amplia a resposta termogênica ao estímulo adrenérgico (Whittle et al., 2012). Além disso, a sinalização adrenérgica é reconhecida como um ativador central da

expressão de Vegfa em adipócitos marrons que é altamente vascularizado e esse marcador tem se mostrado importante para a resposta termogênica (Sun et al., 2014).

Nesse contexto da termogênese, a UCP1, localizada na membrana mitocondrial interna, é um marcador chave para identificar o TAM, especializado na geração de calor (Saito et al., 2016). Estudos mostraram que a melatonina aumenta a massa e a função do TAMi (Fernández Vázquez et al., 2018), possivelmente através da ativação dos receptores MT1 no hipotálamo e MT1 e MT2 no TAM, induzindo a expressão de UCP1(Cipolla-Neto et al., 2014). Em conjunto com a UCP1, a termogênese necessita do aumento do conteúdo mitocondrial, o NRF1 regula a expressão de vários genes envolvidos na função e na biogênese mitocondrial (Bartelt et al., 2018) e do Cidea é um gene que mostra expressão aumentada em adipócitos marrons funcionantes (Fischer et al., 2017). Os filhotes de mães obesas apresentaram uma diminuição na expressão dos marcadores do TAMi, enquanto os filhotes de mães obesas suplementadas com melatonina apresentaram um aumento na capacidade termogênica do TAMi com manutenção dos marcadores característicos desse tecido, trazendo a melatonina materna como fator protetor na manutenção de um adipócito marrom competente.

A análise de componentes principais (ACP) revelou os benefícios nos filhotes de mães obesas suplementadas com melatonina, especialmente em marcadores termogênicos no tecido adiposo e pró-inflamatórios no hipotálamo. A separação dos filhotes do grupo HF dos demais grupos na ACP foi notável, evidenciando a influência da melatonina. A proximidade do grupo HFMel dos grupos C e CMEL na ACP reforça o efeito da melatonina. Essa abordagem multivariada considera todo o conjunto de genes pró-inflamatórios e termogênicos analisados, aumentando a robustez dos resultados (Manly e Navarro-Alberto, 2017).

É importante reconhecer algumas limitações deste estudo, como a falta de avaliação da placenta ou do leite materno, e o fato de que apenas os filhotes machos foram analisados. Essa escolha foi feita para evitar possíveis interferências endócrinas das fêmeas nesta abordagem inicial. Futuras adições ao estudo poderiam esclarecer o efeito da suplementação de melatonina em mães com obesidade nos filhotes fêmeas, bem como os benefícios para o leite materno e a placenta. A Figura 28 resume os achados encontrados nos filhotes de mães obesas e de mães obesas suplementadas com melatonina.



Figura 28. Resumo gráfico dos resultados obtidos neste trabalho

Legenda: A suplementação de melatonina para mães com obesidade beneficia seus filhotes do sexo masculino, como indicado pelas setas: atenuando as citocinas pró-inflamatórias hipotalâmicas, ativando o amarronzamento no tecido adiposo subcutâneo e reduzindo o enbranquecimento no tecido adiposo marrom interescapular. Além disso, os filhotes HFMel apresentaram diminuição da massa corporal e melhora da resistência à insulina. Na ilhota pancreática, as citocinas pró-inflamatórias e os marcadores de estresse de retículo endoplasmático foram atenuados, enquanto as enzimas relacionadas ao estresse oxidativo aumentaram. As ilhotas hipertrofiadas devido à obesidade materna foram também atenuadas pela suplementação de melatonina às mães.

Abreviações: Adrb3, receptor adrenérgico beta 3; Bmp8b, proteína morfogenética óssea 8b; Cidea, fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular, efetor semelhante à subunidade alfa A; Cpt1b, carnitina palmitoil transferase 1b; TAMi, tecido adiposo marrom interescapular; MT1, receptor de melatonina 1; MT2, receptor de melatonina 1B; NFKB, fator Nuclear-kappa B; NPY, neuropeptídeo Y; Nrf1, fator respiratório nuclear 1; POMC, pró-opiomelanocortina-alfa; Ppara, receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomo. Pparg, receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomo; Ppargc1a, receptor ativado proliferativo de peroxissomo,-gama, coativador 1-alfa; Prdm16, domínio PR contendo 16; TABs, tecido adiposo branco subcutâneo; Tfam, fator de transcrição A mitocondrial; Ucp1, proteína desacopladora-1; Vegfa, fator de crescimento endotelial vascular A. Atf4, ativador de fator de transcrição 4; Catalase; Chop, transcrição induzível por danos ao DNA; Gadd45, parada de crescimento e dano ao DNA induzível 45; Gpx, glutationa peroxidase.; Il1b, interleucina1 beta; Il6, interleucina6; Mafa, família dos oncogenes do fibrossarcoma musculoaponeurótico v-maf; Neurod1, diferenciação neurogênica 1; Pax4, paired Box 4; Pdx1, homeobox duodenal pancreático 1; Sirt1, sirtuína 1; Sod, superóxido dismutase; Tnfa, fator de necrose tumoral alfa

Fonte: A autora, 2024

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a dieta rica hiperlipídica levou a várias alterações metabólicas e fisiológicas adversas nas mães, incluindo aumento da massa corporal, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, resistência à insulina, redução nos níveis de adiponectina, aumento do tecido adiposo com expressão elevada de marcadores pró-inflamatórios e estresse do retículo endoplasmático. Por outro lado, as mães com obesidade que receberam melatonina apresentaram melhora no metabolismo da glicose, maior sensibilidade à insulina, níveis elevados de adiponectina, além de redução da inflamação e do estresse do retículo endoplasmático no TABo. A suplementação de melatonina também promoveu a expressão de genes associados à regulação do metabolismo e da termogênese no TABs. Esses resultados destacam o potencial terapêutico da melatonina na prevenção e tratamento de distúrbios metabólicos associados à obesidade.

Nos filhotes de mães com obesidade, observou-se maior massa corporal e alterações metabólicas e inflamatórias, incluindo comprometimento do metabolismo da glicose, resistência à insulina e inflamação sistêmica, associadas a mudanças na expressão gênica e proteica no tecido adiposo e no hipotálamo.

Nos filhotes de mães com obesidade suplementadas com melatonina, houve melhora na regulação do metabolismo da glicose, redução da inflamação sistêmica, preservação da função do TAMi e ativação da termogênese no TABs. Isso foi evidenciado por mudanças moleculares associadas à inflamação hipotalâmica e à resposta dos neuropeptídeos POMC e NPY, bem como pela manutenção da morfologia e funcionalidade do TAMi e a presença de um fenótipo bege no TABs.

De maneira geral, este estudo destaca a importância da dieta materna na programação metabólica da prole e sugere a melatonina como uma possível intervenção para atenuar os efeitos adversos da exposição à dieta rica em gordura durante a gestação e lactação. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente os mecanismos subjacentes e validar esses achados em contextos clínicos.

REFERÊNCIAS

Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. N Engl J Med 2017; 377: 13-27 (doi: 10.1056/NEJMoa1614362)

Ajackson M, Nagagata BA, Marcondes-de-Castro IA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adult mice offspring of obese mothers supplemented with melatonin show lessened liver steatosis, inflammation, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress. Life Sci 2023; 312: 121253 (doi: 10.1016/j.lfs.2022.121253)

Ajoolabady A, Liu S, Klionsky DJ, Lip GYH, Tuomilehto J, Kavalakatt S et al. ER stress in obesity pathogenesis and management. Trends Pharmacol Sci 2022; 43: 97-109 (doi: 10.1016/j.tips.2021.11.011)

Albreiki MS, Middleton B, Hampton SM. The effect of melatonin on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid profiles after a late evening meal in healthy young males. J Pineal Res 2021; 71: e12770 (doi: 10.1111/jpi.12770)

Andersen LPH, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The Safety of Melatonin in Humans. Clinical Drug Investigation 2016; 36: 169-175 (doi: 10.1007/s40261-015-0368-5)

Bähr I, Mühlbauer E, Schucht H, Peschke E. Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. J Pineal Res 2011; 50: 336-344 (doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00848.x)

Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation 2017; 31: (doi: doi:10.1515/hmbci-2016-0051)

Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. J Epidemiol Community Health 2004; 58: 114-115 (doi: 10.1136/jech.58.2.114)

Bartelt A, Widenmaier SB, Schlein C, Johann K, Goncalves RLS, Eguchi K et al. Brown adipose tissue thermogenic adaptation requires Nrf1-mediated proteasomal activity. Nat Med 2018; 24: 292-303 (doi: 10.1038/nm.4481)

Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetsky VS. Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. J Pineal Res 2008; 44: 181-188 (doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00506.x)

Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko HM, Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. Neurosci Lett 2002; 326: 109-112 (doi: 10.1016/s0304-3940(02)00328-2)

Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. Diabetes 2014; 63: 3346-3358 (doi: 10.2337/db14-0302)

Berbets AM, Davydenko IS, Barbe AM, Konkov DH, Albota OM, Yuzko OM. Melatonin 1A and 1B Receptors' Expression Decreases in the Placenta of Women with Fetal Growth Restriction. Reprod Sci 2021; 28: 197-206 (doi: 10.1007/s43032-020-00285-5)

Berry DC, Jiang Y, Graff JM. Emerging Roles of Adipose Progenitor Cells in Tissue Development, Homeostasis, Expansion and Thermogenesis. Trends Endocrinol Metab 2016; 27: 574-585 (doi: 10.1016/j.tem.2016.05.001)

Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM. The developmental origins of adipose tissue. Development 2013; 140: 3939-3949 (doi: 10.1242/dev.080549)

Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neurosci Biobehav Rev 2002; 26: 393-428 (doi: 10.1016/s0149-7634(02)00014-3)

Black MH, Watanabe RM, Trigo E, Takayanagi M, Lawrence JM, Buchanan TA, Xiang AH. High-Fat Diet Is Associated with Obesity-Mediated Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction in Mexican Americans. The Journal of Nutrition 2013; 143: 479-485 (doi: 10.3945/jn.112.170449)

Bramswig NC, Kaestner KH. Transcriptional regulation of α-cell differentiation. Diabetes Obes Metab 2011; 13 Suppl 1: 13-20 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01440.x)

Breton C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. J Endocrinol 2013; 216: R19-31 (doi: 10.1530/JOE-12-0157)

Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. PLoS One 2013; 8: e55711 (doi: 10.1371/journal.pone.0055711)

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev 2004; 84: 277-359 (doi: 10.1152/physrev.00015.2003)

Carrascal L, Nunez-Abades P, Ayala A, Cano M. Role of Melatonin in the Inflammatory Process and its Therapeutic Potential. Curr Pharm Des 2018; 24: 1563-1588 (doi: 10.2174/1381612824666180426112832)

Cerf ME. Parental high-fat programming of offspring development, health and beta-cells. Islets 2011; 3: 118-120 (doi: 10.4161/isl.3.3.15420)

Cerf ME. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. Pediatr Diabetes 2015; 16: 71-78 (doi: 10.1111/pedi.12137)

Cerf ME, Williams K, Nkomo XI, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA. Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005; 288: R1122-1128 (doi: 10.1152/ajpregu.00335.2004)

Chivchibashi-Pavlova D, Stoyanov GS, Bratoeva K. Effects of Melatonin Supplementation on the Aortic Wall in a Diet-Induced Obesity Rat Model. Cureus 2023; 15: e33333 (doi: 10.7759/cureus.33333)

Cho JH, Bhutani S, Kim CH, Irwin MR. Anti-inflammatory effects of melatonin: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Brain Behav Immun 2021; 93: 245-253 (doi: 10.1016/j.bbi.2021.01.034)

Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, Dietz PM. Maternal Obesity and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2007; 30: 2070-2076 (doi: 10.2337/dc06-2559a)

Chuffa LGA, Lupi LA, Cucielo MS, Silveira HS, Reiter RJ, Seiva FRF. Melatonin Promotes Uterine and Placental Health: Potential Molecular Mechanisms. Int J Mol Sci 2019; 21: (doi: 10.3390/ijms21010300)

Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. J Pineal Res 2014; 56: 371-381 (doi: 10.1111/jpi.12137)

Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T et al. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. Development 2005; 132: 2969-2980 (doi: 10.1242/dev.01870)

Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. Genes Dev 2003; 17: 2591-2603 (doi: 10.1101/gad.269003)

Contreras C, Nogueiras R, Dieguez C, Medina-Gomez G, Lopez M. Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. Mol Cell Endocrinol 2016; 438: 107-115 (doi: 10.1016/j.mce.2016.08.002)

Cypess AM. Reassessing Human Adipose Tissue. N Engl J Med 2022; 386: 768-779 (doi: 10.1056/NEJMra2032804)

Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. Nat Med 2013; 19: 635-639 (doi: 10.1038/nm.3112)

Dandekar A, Mendez R, Zhang K. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. Methods Mol Biol 2015; 1292: 205-214 (doi: 10.1007/978-1-4939-2522-3_15)

Delpino FM, Figueiredo LM. Melatonin supplementation and anthropometric indicators of obesity: A systematic review and meta-analysis. Nutrition 2021; 91-92: 111399 (doi: 10.1016/j.nut.2021.111399)

Diehl JA, Fuchs SY, Koumenis C. The cell biology of the unfolded protein response. Gastroenterology 2011; 141: 38-41, 41.e31-32 (doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.018)

El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the antiinflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. Pharmacol Res 2002; 46: 235-243 (doi: 10.1016/s1043-6618(02)00094-4)

Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. J Neurosci 2011; 31: 12189-12197 (doi: 10.1523/jneurosci.2336-11.2011)

Enstad S, Cheema S, Thomas R, Fichorova RN, Martin CR, O'Tierney-Ginn P et al. The impact of maternal obesity and breast milk inflammation on developmental programming of infant growth. Eur J Clin Nutr 2021; 75: 180-188 (doi: 10.1038/s41430-020-00720-5)

Feng X, Zhang Y, Li N, Zhang Y, Zheng Q, Sun M et al. Melatonin in Reproductive Medicine: A Promising Therapeutic Target? Curr Med Chem 2022: (doi: 10.2174/0929867329666221005101031)

Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. J Pineal Res 2015; 59: 292-307 (doi: 10.1111/jpi.12264)

Fève B, Bastard JP. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol 2009; 5: 305-311 (doi: 10.1038/nrendo.2009.62)

Fischer AW, Shabalina IG, Mattsson CL, Abreu-Vieira G, Cannon B, Nedergaard J, Petrovic N. UCP1 inhibition in Cidea-overexpressing mice is physiologically counteracted by brown adipose tissue hyperrecruitment. Am J Physiol Endocrinol Metab 2017; 312: E72-E87 (doi: 10.1152/ajpendo.00284.2016)

Gasa R, Mrejen C, Lynn FC, Skewes-Cox P, Sanchez L, Yang KY et al. Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade. Differentiation 2008; 76: 381-391 (doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00228.x)

Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Cereijo R, Giralt M, Villarroya F. The endocrine role of brown adipose tissue: An update on actors and actions. Rev Endocr Metab Disord 2022; 23: 31-41 (doi: 10.1007/s11154-021-09640-6)

Genario R, Cipolla-Neto J, Bueno AA, Santos HO. Melatonin supplementation in the management of obesity and obesity-associated disorders: A review of physiological mechanisms and clinical applications. Pharmacol Res 2021; 163: 105254 (doi: 10.1016/j.phrs.2020.105254)

Gniuli D, Calcagno A, Caristo ME, Mancuso A, Macchi V, Mingrone G, Vettor R. Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. J Lipid Res 2008; 49: 1936-1945 (doi: 10.1194/jlr.M800033-JLR200)

Gomes PRL, Motta-Teixeira LC, Gallo CC, Carmo Buonfiglio DD, Camargo LS, Quintela T et al. Maternal pineal melatonin in gestation and lactation physiology, and in fetal development and programming. Gen Comp Endocrinol 2021a; 300: 113633 (doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113633)

Gomes PRL, Vilas-Boas EA, Leite EA, Munhoz AC, Lucena CF, Amaral FGD et al. Melatonin regulates maternal pancreatic remodeling and B-cell function during pregnancy and lactation. J Pineal Res 2021b; 71: e12717 (doi: 10.1111/jpi.12717)

Gosmain Y, Cheyssac C, Heddad Masson M, Dibner C, Philippe J. Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in α -cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. Diabetes Obes Metab 2011; 13 Suppl 1: 31-38 (doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01445.x)

Han L, Wang H, Li L, Li X, Ge J, Reiter RJ, Wang Q. Melatonin protects against maternal obesity-associated oxidative stress and meiotic defects in oocytes via the SIRT3-SOD2-dependent pathway. J Pineal Res 2017; 63: (doi: 10.1111/jpi.12431)

Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. Prog Biophys Mol Biol 2011; 106: 272-280 (doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.008)

Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. Cell Metab 2014; 19: 593-604 (doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.007)

Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. Circ Res 2010; 107: 579-591 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225698)

Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. J Pineal Res 2013; 55: 416-423 (doi: 10.1111/jpi.12089)

Karamitri A, Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. Nat Rev Endocrinol 2019; 15: 105-125 (doi: 10.1038/s41574-018-0130-1)

Kato H, Tanaka G, Masuda S, Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T et al. Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. J Pineal Res 2015; 59: 267-275 (doi: 10.1111/jpi.12259)

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2000; 85: 2402-2410 (doi: 10.1210/jcem.85.7.6661)

Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. Dev Dyn 1994; 200: 163-175 (doi: 10.1002/aja.1002000208)

Klöting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. Rev Endocr Metab Disord 2014; 15: 277-287 (doi: 10.1007/s11154-014-9301-0)

Korkmaz A, Reiter RJ. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? J Pineal Res 2008; 44: 41-44 (doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00509.x)

Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald EM, Janoschek R, Bae-Gartz I, Zentis P et al. Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis. Nutrients 2020; 12: (doi: 10.3390/nu12020296)

Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. J Nutr 1996; 126: 1578-1585 (doi: 10.1093/jn/126.6.1578)

Lecoutre S, Petrus P, Rydén M, Breton C. Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. Trends Endocrinol Metab 2018; 29: 675-685 (doi: 10.1016/j.tem.2018.07.004)

Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Wang B, Pan H et al. Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell properties in male offspring mice. J Physiol 2016a; 594: 4453-4466 (doi: 10.1113/JP272123)

Liang X, Yang Q, Zhang L, Maricelli JW, Rodgers BD, Zhu MJ, Du M. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. Sci Rep 2016b; 6: 34345 (doi: 10.1038/srep34345)

Lin CL, Vuguin PM. Determinants of pancreatic islet development in mice and men: a focus on the role of transcription factors. Horm Res Paediatr 2012; 77: 205-213 (doi: 10.1159/000337219)

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy 2017; 2: 17023 (doi: 10.1038/sigtrans.2017.23)

Liu W, Ren L, Fang F, Chen R. Maternal pre-pregnancy overweight or obesity and risk of birth defects in offspring: Population-based cohort study. Acta Obstet Gynecol Scand 2024: (doi: 10.1111/aogs.14786)

López M. Hypothalamic AMPK and energy balance. Eur J Clin Invest 2018; 48: e12996 (doi: 10.1111/eci.12996)

Lorberbaum DS, Docherty FM, Sussel L. Animal Models of Pancreas Development, Developmental Disorders, and Disease. Adv Exp Med Biol 2020; 1236: 65-85 (doi: 10.1007/978-981-15-2389-2_3)

Lui CC, Hsu MH, Kuo HC, Chen CC, Sheen JM, Yu HR et al. Effects of melatonin on prenatal dexamethasone-induced epigenetic alterations in hippocampal morphology and reelin and glutamic acid decarboxylase 67 levels. Dev Neurosci 2015; 37: 105-114 (doi: 10.1159/000368768)

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc 2003; 75: 469-486 (doi: 10.1590/S0001-37652003000400006)

Mandarim-de-Lacerda CA. L'îlot pancréatique : ce que nous savons 150 ans après Langerhans. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 2019a; 203: 670-682 (doi: 10.1016/j.banm.2019.06.015) Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic islet (of Langerhans) revisited. Histol Histopathol 2019b; 34: 985-993 (doi: 10.14670/HH-18-118)

Mandarim-de-Lacerda CA, Del-Sol M. Tips for Studies with Quantitative Morphology (Morphometry and Stereology). Int J Morphol 2017; 35: 1482-1494 (doi: 10.4067/s0717-95022017000401482)

Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M, Vazquez B, Aguila MB. Mice as an animal model for the study of adipose tissue and obesity. Int J Morphol 2021; 39: 1521-1528 (doi: 10.4067/S0717-95022021000601521)

Manly BFJ, Navarro-Alberto JA. Multivariate statistical methods: a primer., 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2017: 247 p.

Marinho T, S., Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic Islet Stereology: Estimation of Beta Cells Mass. Int J Morphol 2019; 37: 1331-1334 (doi: 10.4067/s0717-95022019000401331)

Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M, Stein R. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 2930-2933 (doi: 10.1073/pnas.0306233101)

Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 1706-1713 (doi: 10.1007/pl00012498)

McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. Clinics in Liver Disease 2014; 18: 41-58 (doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.012</u>)

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. Nature 2004; 428: 569-574 (doi: 10.1038/nature02440)

Miralles F, Battelino T, Czernichow P, Scharfmann R. TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. J Cell Biol 1998; 143: 827-836 (doi: 10.1083/jcb.143.3.827)

Montanari T, Pošćić N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. Obes Rev 2017; 18: 495-513 (doi: 10.1111/obr.12520)

Morris MJ. Early life influences on obesity risk: maternal overnutrition and programming of obesity. Expert Rev Endocrinol Metab 2009; 4: 625-637 (doi: 10.1586/eem.09.45)

Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube A et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. J Pineal Res 2001; 30: 29-33 (doi: 10.1034/j.1600-079x.2001.300104.x)

Napso T, Lean SC, Lu M, Mort EJ, Desforges M, Moghimi A et al. Diet-induced maternal obesity impacts feto-placental growth and induces sex-specific alterations in placental

morphology, mitochondrial bioenergetics, dynamics, lipid metabolism and oxidative stress in mice. Acta Physiol (Oxf) 2022; 234: e13795 (doi: 10.1111/apha.13795)

Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. Genes Dev 1997; 11: 2323-2334 (doi: 10.1101/gad.11.18.2323)

Nedergaard J, von Essen G, Cannon B. Brown adipose tissue: can it keep us slim? A discussion of the evidence for and against the existence of diet-induced thermogenesis in mice and men. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2023; 378: 20220220 (doi: 10.1098/rstb.2022.0220)

Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. Development 1996; 122: 983-995 (doi: 10.1242/dev.122.3.983)

Oger F, Dubois-Chevalier J, Gheeraert C, Avner S, Durand E, Froguel P et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates genes involved in insulin/insulin-like growth factor signaling and lipid metabolism during adipogenesis through functionally distinct enhancer classes. J Biol Chem 2014; 289: 708-722 (doi: 10.1074/jbc.M113.526996)

Olcese J, Lozier S, Paradise C. Melatonin and the circadian timing of human parturition. Reprod Sci 2013; 20: 168-174 (doi: 10.1177/1933719112442244)

Ornellas F, Karise I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2020. Pancreatic Islets of Langerhans: Adapting Cell and Molecular Biology to Changes of Metabolism. In: Faintuch J, Faintuch S, editors. Obesity and Diabetes. Cham: Springer International Publishing. p 175-190

Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. Physiol Behav 2016; 153: 47-55 (doi: 10.1016/j.physbeh.2015.10.019)

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death & Differentiation 2004; 11: 381-389 (doi: 10.1038/sj.cdd.4401373)

Pang J, Xi C, Huang X, Cui J, Gong H, Zhang T. Effects of Excess Energy Intake on Glucose and Lipid Metabolism in C57BL/6 Mice. PLoS One 2016; 11: e0146675 (doi: 10.1371/journal.pone.0146675)

Park JH, Shim HM, Na AY, Bae KC, Bae JH, Im SS et al. Melatonin prevents pancreatic β -cell loss due to glucotoxicity: the relationship between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. J Pineal Res 2014; 56: 143-153 (doi: 10.1111/jpi.12106)

Park S, Jang A, Bouret SG. Maternal obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes metabolic alterations and abnormal hypothalamic development in the offspring. PLoS Biol 2020; 18: e3000296 (doi: 10.1371/journal.pbio.3000296)

Peres-Neto PR, Jackson DA, Somers KM. How many principal components? stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited. Computational Statistics & Data Analysis 2005; 49: 974-997 (doi: https://doi.org/10.1016/j.csda.2004.06.015)

Peschke E, Schucht H, Mühlbauer E. Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. J Pineal Res 2010; 49: 373-381 (doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00804.x)

Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, Hanley NA. Beta cell differentiation during early human pancreas development. J Endocrinol 2004; 181: 11-23 (doi: 10.1677/joe.0.1810011)

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnol 2010; 28: 1057-1068 (doi: 10.1038/nbt.1685)

Prieto-Hontoria PL, Pérez-Matute P, Fernández-Galilea M, Alfredo Martínez J, Moreno-Aliaga MJ. Effects of lipoic acid on AMPK and adiponectin in adipose tissue of low- and high-fat-fed rats. Eur J Nutr 2013; 52: 779-787 (doi: 10.1007/s00394-012-0384-7)

Ramadan AG, Abdel-Rehim WM, El-Tahan RA, Elblehi SS, Kamel MA, Shaker SA. Maternal and paternal obesity differentially reprogram the ovarian mitochondrial biogenesis of F1 female rats. Sci Rep 2023; 13: 15480 (doi: 10.1038/s41598-023-42468-5)

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science 2005; 308: 1592-1594 (doi: 10.1126/science.1111726)

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993; 123: 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)

Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. Nature Biotechnology 2014; 32: 1121-1133 (doi: 10.1038/nbt.3033)

Ross MG, Desai M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. Clin Obstet Gynecol 2013; 56: 529-536 (doi: 10.1097/GRF.0b013e318299c39d)

Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/satiety. Ann Nutr Metab 2014; 64 Suppl 1: 36-44 (doi: 10.1159/000360508)

Saarela S, Reiter RJ. Function of melatonin in thermoregulatory processes. Life Sci 1994; 54: 295-311 (doi: 10.1016/0024-3205(94)00786-1)

Saat N, Risvanli A, Dogan H, Onalan E, Akpolat N, Seker I, Sahna E. Effect of melatonin on torsion and reperfusion induced pathogenesis of rat uterus. Biotech Histochem 2019; 94: 533-539 (doi: 10.1080/10520295.2019.1605456)

Sachdeva MM, Claiborn KC, Khoo C, Yang J, Groff DN, Mirmira RG, Stoffers DA. Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 19090-19095 (doi: 10.1073/pnas.0904849106)

Sacks H, Symonds ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. Diabetes 2013; 62: 1783-1790 (doi: 10.2337/db12-1430)

Sagrillo-Fagundes L, Assuncao Salustiano EM, Yen PW, Soliman A, Vaillancourt C. Melatonin in Pregnancy: Effects on Brain Development and CNS Programming Disorders. Curr Pharm Des 2016; 22: 978-986 (doi: 10.2174/1381612822666151214104624)

Salagre D, Chayah M, Molina-Carballo A, Oliveras-López MJ, Munoz-Hoyos A, Navarro-Alarcón M et al. Melatonin induces fat browning by transdifferentiation of white adipocytes and de novo differentiation of mesenchymal stem cells. Food Funct 2022; 13: 3760-3775 (doi: 10.1039/d1fo04360a)

Sartori C, Dessen P, Mathieu C, Monney A, Bloch J, Nicod P et al. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. Endocrinology 2009; 150: 5311-5317 (doi: 10.1210/en.2009-0425)

Schenker S, Yang Y, Perez A, Acuff RV, Papas AM, Henderson G, Lee MP. Antioxidant transport by the human placenta. Clin Nutr 1998; 17: 159-167 (doi: 10.1016/s0261-5614(98)80052-6)

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. J Clin Invest 2014; 124: 2099-2112 (doi: 10.1172/JCI71643)

Song GH, Gwee KA, Moochhala SM, Ho KY. Melatonin attenuates stress-induced defecation: lesson from a rat model of stress-induced gut dysfunction. Neurogastroenterol Motil 2005; 17: 744-750 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00653.x)

Sosa-Pineda B. The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development. Mol Cells 2004; 18: 289-294 (doi,

Sozen E, Karademir B, Ozer NK. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med 2015; 78: 30-41 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.031)

Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. Adv Wound Care (New Rochelle) 2020; 9: 184-198 (doi: 10.1089/wound.2019.1032)

Sun H, Wang X, Chen J, Song K, Gusdon AM, Li L et al. Melatonin improves non-alcoholic fatty liver disease via MAPK-JNK/P38 signaling in high-fat-diet-induced obese mice. Lipids Health Dis 2016; 15: 202 (doi: 10.1186/s12944-016-0370-9)

Sun K, Kusminski CM, Luby-Phelps K, Spurgin SB, An YA, Wang QA et al. Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. Mol Metab 2014; 3: 474-483 (doi: 10.1016/j.molmet.2014.03.010)

Swisa A, Avrahami D, Eden N, Zhang J, Feleke E, Dahan T et al. PAX6 maintains β cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. J Clin Invest 2017; 127: 230-243 (doi: 10.1172/jci88015)

Szewczyk-Golec K, Wozniak A, Reiter RJ. Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity. J Pineal Res 2015; 59: 277-291 (doi: 10.1111/jpi.12257)

Tain YL, Chen CC, Sheen JM, Yu HR, Tiao MM, Kuo HC, Huang LT. Melatonin attenuates prenatal dexamethasone-induced blood pressure increase in a rat model. J Am Soc Hypertens 2014a; 8: 216-226 (doi: 10.1016/j.jash.2014.01.009)

Tain YL, Hsu CN. Developmental and Early Life Origins of Hypertension: Preventive Aspects of Melatonin. Antioxidants (Basel) 2022; 11: (doi: 10.3390/antiox11050924)

Tain YL, Huang LT, Chan JY. Transcriptional regulation of programmed hypertension by melatonin: an epigenetic perspective. Int J Mol Sci 2014b; 15: 18484-18495 (doi: 10.3390/ijms151018484)

Tain YL, Huang LT, Hsu CN. Developmental Programming of Adult Disease: Reprogramming by Melatonin? Int J Mol Sci 2017; 18: (doi: 10.3390/ijms18020426)

Tain YL, Huang LT, Hsu CN, Lee CT. Melatonin therapy prevents programmed hypertension and nitric oxide deficiency in offspring exposed to maternal caloric restriction. Oxid Med Cell Longev 2014c; 2014: 283180 (doi: 10.1155/2014/283180)

Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. Fertil Steril 2009; 92: 328-343 (doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.016)

Tan DX, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. Int J Mol Sci 2016; 17: (doi: 10.3390/ijms17122124)

Wang W, Zhang C. Targeting β -cell dedifferentiation and transdifferentiation: opportunities and challenges. Endocr Connect 2021; 10: R213-r228 (doi: 10.1530/ec-21-0260)

Whitaker KL, Jarvis MJ, Beeken RJ, Boniface D, Wardle J. Comparing maternal and paternal intergenerational transmission of obesity risk in a large population-based sample. Am J Clin Nutr 2010; 91: 1560-1567 (doi: 10.3945/ajcn.2009.28838)

Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. Cell 2012; 149: 871-885 (doi: 10.1016/j.cell.2012.02.066)

Williams LM, Martinoli MG, Titchener LT, Pelletier G. The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. Endocrinology 1991; 128: 2083-2090 (doi: 10.1210/endo-128-4-2083)

Xu D, Liu L, Zhao Y, Yang L, Cheng J, Hua R et al. Melatonin protects mouse testes from palmitic acid-induced lipotoxicity by attenuating oxidative stress and DNA damage in a SIRT1-dependent manner. J Pineal Res 2020; 69: e12690 (doi: 10.1111/jpi.12690)

Xu L, Li D, Li H, Zhang O, Huang Y, Shao H et al. Suppression of obesity by melatonin through increasing energy expenditure and accelerating lipolysis in mice fed a high-fat diet. Nutr Diabetes 2022; 12: 42 (doi: 10.1038/s41387-022-00222-2)

Xue L, Sun J, Liu J, Hu C, Wu D, Nie C et al. Maternal secretin ameliorates obesity by promoting white adipose tissue browning in offspring. EMBO Rep 2022; 23: e54132 (doi: 10.15252/embr.202154132)

Xue L, Sun J, Sun Y, Wang Y, Zhang K, Fan M et al. Maternal Brown Rice Diet during Pregnancy Promotes Adipose Tissue Browning in Offspring via Reprogramming PKA Signaling and DNA Methylation. Mol Nutr Food Res 2024; 68: e2300861 (doi: 10.1002/mnfr.202300861)

Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. Mol Endocrinol 2012; 26: 1203-1212 (doi: 10.1210/me.2012-1004)

Yang Q-Y, Liang J-F, Rogers CJ, Zhao J-X, Zhu M-J, Du M. Maternal Obesity Induces Epigenetic Modifications to Facilitate Zfp423 Expression and Enhance Adipogenic Differentiation in Fetal Mice. Diabetes 2013; 62: 3727-3735 (doi: 10.2337/db13-0433)

Yokomizo H, Inoguchi T, Sonoda N, Sakaki Y, Maeda Y, Inoue T et al. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β -cell function in adult offspring with sex differences in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 2014; 306: E1163-1175 (doi: 10.1152/ajpendo.00688.2013)

Yong W, Ma H, Na M, Gao T, Zhang Y, Hao L et al. Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. Biomed Pharmacother 2021; 144: 112001 (doi: 10.1016/j.biopha.2021.112001)

Yu XX, Xu CR. Understanding generation and regeneration of pancreatic β cells from a singlecell perspective. Development 2020; 147: (doi: 10.1242/dev.179051)

Zephy D, Ahmad J. Type 2 diabetes mellitus: Role of melatonin and oxidative stress. Diabetes Metab Syndr 2015; 9: 127-131 (doi: 10.1016/j.dsx.2014.09.018)

Zhang S, Rattanatray L, Morrison JL, Nicholas LM, Lie S, McMillen IC. Maternal obesity and the early origins of childhood obesity: weighing up the benefits and costs of maternal weight loss in the periconceptional period for the offspring. Exp Diabetes Res 2011; 2011: 585749 (doi: 10.1155/2011/585749)

Zhou C, Ding Y, Yu L, Nie Y, Yang M. Melatonin regulates proliferation, apoptosis and invasion of trophoblasts in preeclampsia by inhibiting endoplasmic reticulum stress. Am J Reprod Immunol 2022; 88: e13585 (doi: 10.1111/aji.13585).

ANEXO A – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa.

Universidade do Estado do Rio de Janeiro Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



CERTIFICADO

Cortificamos que o projeto intitulado "Programação fetal, obesidade e melatonina", registrado com o nº 003/2021, sob a responsabilidade de Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 02/02/2021.

| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
|---------------------------|------------------------------------|
| Vigencia da autorização | 02/02/2025 |
| Espécie / linhagem / raça | Camundongo C57BL/6 |
| N° de animais | 320 |
| Peso / Idade | 20 gramas / 3 meses |
| Sexo | Macho e fémea |
| Origem | Biotério setorial |

Rio de Janeiro, 02 de fevereiro de 2021.

CAL

Dr. Alex C. Manhães Professor Associado Matr. 33303-9 Coordenador CEUA/IBRAG/UERJ

Batrieiq Gaustoa

Dra. Patricia C. Lisboa Professora Associada Matr. 34765-8 Vice-Coordenadora CEUAIBRAG/UERJ

http://www.ibrag.uerj.br/index.php/comissao-de-etica.html E-mail: ceua.ibrag/@yahoo.com.br

ANEXO B – Artigo publicado

Journal of Developmental Origins of Health and Disease

www.cambridge.org/doh

Original Article

Cite this article: Nagagata BA, Ajackson M, Ornellas F, Mandarim-de-Lacentia CA, and Aguila MB. (2023) Obese mothers supplemented with melatonin during gestation and lactation ameliorate the male offspring's pancreatic islet cellular composition and betacell function. Journal of Developmental Origins of Health and Disease doi: 10.1017/ S2040174423000168

Received: 15 November 2022 Revised: 23 May 2023 Accepted: 29 May 2023

Keywords:

Pancreatic islet: DOHaD: Maternal obesity: Beta-cell; Molecul ar biology

Corresponding author:

Marcia Barbosa Aguila; Emails: mbaguila@uerj.br, mandarim.ca@gmail.com

Obese mothers supplemented with melatonin during gestation and lactation ameliorate the male offspring's pancreatic islet cellular composition and beta-cell function

Brenda A. Nagagata¹⁽ⁱ⁾, Matheus Ajackson¹⁽ⁱ⁾, Fernanda Ornellas²⁽ⁱ⁾, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda¹ and Marcia Barbosa Aguila¹

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil and ²Faculty of Nutrition, A Motta University, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Melatonin supplementation to obese mothers during gestation and lactation might benefit the pancreatic islet cellular composition and beta-cell function in male offspring adulthood. C57 BL/6 females (mothers) were assigned to two groups (n = 20/each) based on their consumption in control (C 17% kJ as fat) or high-fat diet (HF 49% kJ as fat). Mothers were supplemented with melatonin (Mel) (10 mg/kg daily) during gestation and lactation, or vehicle, forming the groups (n = 10/each): C, CMel, HF, and HFMel. The male offspring were studied, considering they only received the C diet after weaning until three months old. The HF mothers and their offspring showed higher body weight, glucose intolerance, insulin resistance, and low insulin sensitivity than the C ones. However, HFMel mothers and their offspring showed improved glucose metabolism and weight loss than the HF ones. Also, the offspring's higher expressions of pro-inflammatory markers and endoplasmic reticulum (ER) stress were observed in HF but reduced in HFMel. Contrarily, antioxidant enzymes were less expressed in HF but improved in HFMel. In addition, HF showed increased beta-cell mass and hyperinsulinemia but diminished in HFMel. Besides, the beta-cell maturity and identity gene expressions diminished in HF but enhanced in HFMel. In conclusion, obese mothers supplemented with melatonin benefit their offspring's islet cell remodeling and function. In addition, improving pro-inflammatory markers, oxidative stress, and ER stress resulted in better glucose and insulin levels control. Consequently, pancreatic islets and functioning beta cells were preserved in the offspring of obese mothers supplemented with melatonin.

U

ANEXO C - Artigo publicado



ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry

Journal of Nutritional Biochemistry 128 (2024) 109625

Available online at www.sciencedirect.com

RESEARCH PAPER

Melatonin supplementation in obese mothers reduces hypothalamic inflammation and enhances thermogenesis in mice progeny

Brenda A. Nagagata^{b,c}, Gabrielle Brito^b, Fernanda Ornellas^d, Carlos A. Mandarim-de-Lacerda^{a,*}, Marcia Barbosa Aguila^a

^aLaboratory of Morphometry. Metabolism and Cardiovascular Disease, Biomedical Center, Institute of Biology. The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil ^b Metabolism section, Laboratory of Morphometry. Metabolism and Cardiovascular Disease, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil ^c Nutrition section, Laboratory of Morphometry. Metabolism and Cardiovascular Disease, The University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil ^d Faculty of Nutrition, A Motta University. Rio de Janeiro, Brazil

Received 18 January 2024; received in revised form 7 March 2024; accepted 18 March 2024

.. . .

ANEXO D – Artigo submetido

This is a new submission-tracking service.

Thank you, could you tell us more?

Peer review status

Diet-induced obese female mice lose weight, improve linked comorbidities, and show browning in white adipocytes when supplemented with melatonin.

- Reviews completed: 0
- Review invitations accepted: 2
- · Review invitations sent: 2+

Journal: Biochemical Pharmacology

Corresponding author: Carlos Mandarim-de-Lacerda

First author: Brenda Nagagata

Date of submission: 6th February 2024 Manuscript number:

Under Review

Last review activity: 11th

April 2024 ①

Watch to learn what we're doing behind

the scenes 7

BP-D-24-00549

Need more help?

Please visit our Journal Article Publishing Support Center