

Obesidade: O Papel das Melanocortinas na regulação da Homeostasia Energética

Obesity: the role of melanocortins in the regulation of energy homeostasis

Adriana Rodrigues¹, Henrique Almeida¹, Alexandra Gouveia^{1,2}

¹ Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina e IBMC- Instituto de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Porto

² Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Correspondência: Alexandra Gouveia › Departamento de Biologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto › Alameda Prof. Hernâni Monteiro › 4200-319 PORTO › agouveia@med.up.pt

RESUMO

Nas últimas décadas a obesidade revelou-se um dos maiores problemas de saúde pública dos países desenvolvidos, sendo um factor de risco para várias doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro. Um dos mecanismos directamente relacionados com a regulação da homeostasia energética integra o sistema das melanocortinas¹, também envolvido noutros processos biológicos como pigmentação e esteroidogénese²⁻³. Ao nível do sistema nervoso central (SNC), o sistema das melanocortinas é um dos mecanismos neuropeptidérgicos melhor caracterizados no que diz respeito ao controlo da ingestão alimentar. Para além desta acção central, as melanocortinas actuam também numa variedade de tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo. O conhecimento da acção periférica das melanocortinas tem vindo a aumentar com novos dados promissores ao desenvolvimento de terapias eficazes no tratamento da obesidade. É nosso objectivo apresentar uma revisão detalhada sobre o papel das melanocortinas na regulação da homeostasia energética recorrendo a evidências e trabalhos científicos publicados nos últimos anos.

PALAVRAS-CHAVE

Melanocortinas; Obesidade; Adipócito; Homeostasia energética.

SUMMARY

Obesity is one of the greatest public health problems of the 21st century, with major consequences in diabetes, cardiovascular diseases and cancer. It is well known that the melanocortin system is an important regulator of body energy homeostasis¹. In fact, the role of the melanocortin system in the regulation of energy balance at the central nervous system has been extensively studied, although melanocortins are also involved in other biological processes such as pigmentation or steroidogenesis²⁻³. In addition, it has also been demonstrated that melanocortins act in a variety of peripheral tissues, including the adipose tissue. The study of peripheral melanocortin effects has been increased and challenges the MCRs as promising targets for the pharmacological treatment of obesity. The role of melanocortins on energy homeostasis is reviewed in this manuscript which describes up to date scientific data.

KEYWORDS

Melanocortins; Obesity; Adipocyte; Energy homeostasis.

INTRODUÇÃO

A obesidade é actualmente considerada um problema de saúde, endémico dos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos da América, em 2007-2008, verificou-se que 32% dos homens e 35% das mulheres apresentava obesidade (segundo o critério de índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$)⁴. Na Europa, a obesidade apresenta uma maior prevalência nos países do sul, centro e Europa oriental, sendo este valor genericamente mais baixo nos países Nórdicos e da Europa Ocidental^{3,5}. A Inglaterra manifestase como o país Europeu com maior prevalência de obesidade³.

Portugal não representa uma excepção a este cenário, tal como demonstrado em alguns trabalhos de estudo da prevalência da obesidade⁶⁻⁷. Determinou-se que a prevalência do excesso de peso (IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m^2) e da obesidade (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) em Portugal entre 2003 e 2005 era de 53,6%, valor superior ao obtido no estudo realizado entre 1995-1998 que a situava nos 49,6%⁶. Ao considerar apenas os casos de obesidade, este trabalho revelou que constituíam cerca de 14,2% da população.

Apesar de todos os alertas, a verdade é que a prevalência da obesidade tem vindo a aumentar. Torna-se assim fundamental o desenvolvimento de estratégias de prevenção e terapias mais eficazes. Neste campo, a

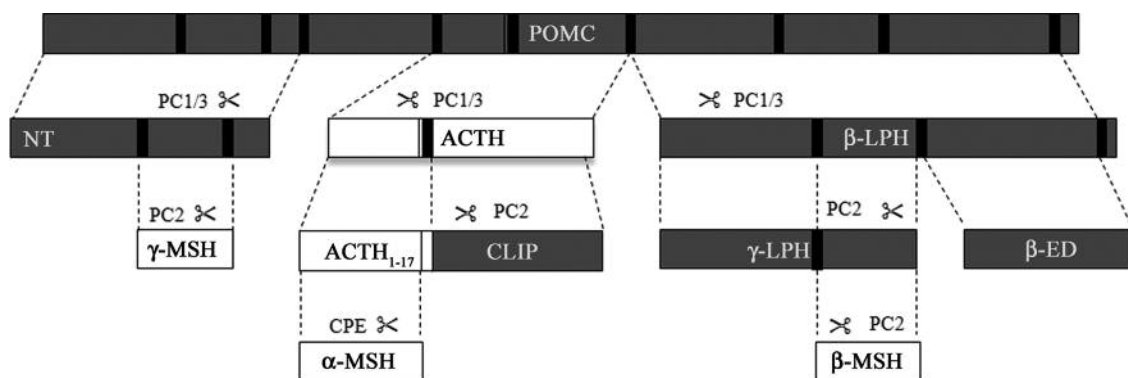
compreensão da regulação da homeostasia energética pelo sistema das melanocortinas poderá auxiliar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

CORPO DA REVISÃO

O SISTEMA DAS MELANOCORTINAS

As melanocortinas são neuropéptidos derivados da poliproteína pró-opiomelanocortina (POMC), expressa no núcleo arqueado do hipotálamo, núcleo do tracto solitário, hipófise e outros tecidos periféricos^{8,9}. Após clivagem proteolítica da POMC formam-se as várias melanocortinas, nomeadamente a hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e as hormonas alfa, beta e gama estimuladora de melanócitos (MSH) (Figura 1). O sistema das melanocortinas engloba ainda dois antagonistas endogenamente expressos, a Agouti e a Proteína Relacionada com a Agouti (AgRP)¹⁰⁻¹¹. Ao nível da periferia celular estes neuropéptidos são reconhecidos por cinco receptores das melanocortinas (MCRs), classificados de 1 até 5 (MC1R-MC5R). Os MCRs pertencem à família dos receptores com sete domínios membranares associados às proteínas Gs (GPCRs) e, topologicamente, possuem a extremidade amino com localização extracelular, sete regiões transmembranares e a

FIGURA 1



Processamento da POMC com conseqüente formação das diferentes melanocortinas (Indicadas nos rectângulos brancos). NT- Extremidade amino; CLIP- «corticotropin-like-intermediate lobe peptide»; ED- endorfina; LPH- Lipotropina; PC- Pro-hormona convertase. Adaptado de ^{41,91}.

TABELA I: Receptores das melanocortinas: afinidade para as diferentes melanocortinas e antagonistas, distribuição tecidual e funções (adaptado de^{13, 89-90}).

MCRs	Afinidade para as melanocortinas	Antagonista Endógeno	Locais de Expressão	Função
MC1R	α -MSH = ACTH = β -MSH > γ -MSH	Agouti	Melanócitos, células endoteliais, fibroblastos, monócitos, glia, queratinócitos	Pigmentação, anti-inflamatório, anti-pirético
MC2R	ACTH	Agouti	Glândula supra-renal, adipócitos de murganho	Esteroidogénese, lipólise induzida pelo stress
MC3R	γ -MSH = ACTH = β -MSH \geq α -MSH	AgRP	Sistema nervoso central, coração, macrófagos	Homeostasia energética, anti-inflamatório, cardiovascular
MC4R	α -MSH \geq ACTH > β -MSH > γ -MSH	AgRP, Agouti	Sistema Nervoso Central	Regulação da ingestão alimentar e homeostasia energética, disfunção eréctil, anti-pirético
MC5R	α -MSH \geq ACTH > β -MSH > γ -MSH	Agouti	Glândulas exócrinas, hipófise, pele, glândula supra-renal, adipócito, músculo liso e esquelético, medula óssea, baço, nódulos linfáticos, timo, gónadas, útero, pulmões, fígado, estômago, esófago, rim, glândulas mamárias, monócitos, granulócitos, linfócitos, cerebelo, medula	Regulação de secreção exócrina, função imunoreguladora, lipólise

extremidade carboxílica no citosol. É consensualmente aceite que os GPCRs são sintetizados no retículo endoplasmático e subsequentemente endereçados para a membrana citoplasmática. Após activação pelos agonistas específicos, a resposta mediada pelos GPCRs é rapidamente atenuada por um mecanismo de dessensitização que normalmente envolve a internalização dos receptores. Depois de internalizados, os GPCRs podem ser reciclados para a membrana plasmática ou podem ser degradados no lisossoma¹².

Os MCRs diferem entre si na distribuição tecidual e na afinidade de ligação às diferentes melanocortinas e antagonistas¹³ (Tabela I):

- O MC1R é expresso em diferentes tipos de células da pele, incluindo melanócitos, queratinócitos e células epiteliais e também em células de resposta inflamatória. Funcionalmente o MC1R é responsável pela regulação da melanogénese e apresenta efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios¹⁴.
- O MC2R tem a particularidade de interagir apenas com a ACTH, não respondendo às outras melanocortinas. Este receptor é expresso quase exclusivamente nas células do córtex da glândula supra-renal onde medeia a acção da ACTH na regulação da este-

roidogénese¹⁵. O MC2R foi também detectado na pele¹⁶ e em adipócitos¹⁷, onde exhibe um papel importante na regulação do processo de lipólise em resposta à ACTH¹⁸.

- O MC3R é predominantemente expresso no SNC, embora níveis mais baixos deste receptor sejam também detectados na placenta, estômago e pâncreas¹⁹. O MC3R parece apresentar um papel importante na regulação da homeostasia energética, uma vez que os murganhos «knockout» para o MC3R desenvolvem uma síndrome metabólica subtil sem aumento de peso e hiperinsulinemia, mas com aumento de massa gorda, hipofagia e hipoactividade²⁰⁻²¹. Estranhamente este receptor parece ter um papel duplo na regulação da homeostasia energética pois actua como um auto-inibidor em neurónios hipotalâmicos que também sintetizam POMC²². Ou seja, verificou-se que existe uma co-expressão de POMC e MC3R em alguns neurónios e que existe uma diminuição da actividade destes neurónios após a aplicação de um agonista específico do MC3R²³. O papel fisiológico do MC3R no controlo da homeostasia energética é assim, neste momento, ainda enigmático.

- O MC4R é vastamente expresso no SNC, nomeadamente no hipotálamo, hipocampo, tálamo e medula espinhal²⁴. O envolvimento directo do MC4R na regulação da homeostasia energética²⁵ é suportado pelo fenótipo de obesidade dos ratinhos «knockout» para este gene²⁶. Efectivamente, os ratinhos MC4R $-/-$ apresentam um aumento da ingestão alimentar, obesidade severa, hiperinsulinemia e hiperleptinemia²⁶. Outras funções têm sido atribuídas ao MC4R, nomeadamente regulação da função erétil²⁷ e dor²⁸.
- O último receptor a ser clonado foi o MC5R, uma proteína que exhibe baixos níveis de expressão em praticamente todos os tecidos periféricos (Tabela I)¹³. Os murganhos «knockout» para o MC5R apresentam alterações na termo-regulação e uma menor impermeabilização da pele à água, resultante de uma diminuta produção de lípidos sebáceos²⁹. Nestes animais, o MC5R parece também modular a síntese e /ou libertação de feromonas³⁰⁻³². No tecido muscular esquelético, o MC5R foi directamente implicado na regulação da oxidação em beta de ácidos gordos após um estímulo de alfa-MSH³³.

Como referido anteriormente, o sistema das melanocortinas compreende ainda dois antagonistas, a Agouti e a AgRP. A Agouti é sintetizada nos folículos pilosos e, de uma forma parácrina, antagoniza a acção da alfa-MSH sobre o MC1R expresso nos melanócitos¹¹. A AgRP é sintetizada no hipotálamo e actua como um antagonista do MC3R e MC4R¹⁰. Os ratinhos com uma sobre-expressão constitutiva das proteínas Agouti ou AgRP desenvolvem aumento do peso corporal e hiperinsulinemia³⁴⁻³⁵. No entanto, os ratinhos «knockout» para a AgRP apresentam peso corporal e adiposidade normais, fenótipo que levantou algumas dúvidas acerca da importância dessa proteína na

regulação da homeostasia energética³⁶. Dados mais conclusivos surgiram de vários estudos independentes que, recorrendo a abordagens experimentais diferentes, inativaram apenas pós-natal os neurónios que expressam a AgRP. Nestes animais verificou-se hipofagia, diminuição do peso e da adiposidade, o que levou a atribuir a ausência de fenótipo nos «knockouts» a um fenómeno de compensação durante o desenvolvimento embrionário^{3, 37}.

Em conclusão, o sistema das melanocortinas inclui vários MCRs que, in vivo, apresentam a propriedade única de, em adição a uma variedade de agonistas, ainda interagirem com dois antagonistas. Este mecanismo provavelmente constitui uma forma de regulação precisa da actividade dos MCRs e, conseqüentemente, do funcionamento do sistema melanocortínico.

VARIANTES GENÉTICAS DO SISTEMA DAS MELANOCORTINAS

Em humanos, a primeira evidência do envolvimento das melanocortinas no controlo da ingestão alimentar surgiu na descrição de dois doentes que desenvolveram uma obesidade muito precoce e que se revelaram possuir mutações no gene que codifica a POMC³⁸⁻⁴¹. Igualmente, os murganhos «knockout» do *Pomc* também são obesos, hiperfágicos e apresentam ainda deficiências na pigmentação e função da glândula supra-renal, o que demonstra alterações adicionais na função dos MC1R e MC2R, respectivamente⁴²⁻⁴³. Relativamente às enzimas que clivam a POMC de modo a se formarem as diversas melanocortinas (Figura 1), verificou-se que indivíduos com mutações no gene que codifica a PC1 (pro-hormona convertase 1) desenvolvem obesidade⁴⁴, facto consonante com o fenótipo similar exibido pelos murganhos *Pc1* $-/-$ ⁴⁵.

Foram também descritos polimorfismos nas regiões codificante e promotora do gene que codifica a AgRP^{46,47}, mais frequentes

entre indivíduos com anorexia nervosa⁴⁸. Os indivíduos com estas alterações apresentam baixo peso e uma preferência por comida com baixo teor em gordura⁴⁹.

Ao nível dos receptores das melanocortinas, nos indivíduos com mutações no MC3R e MC4R observam-se efeitos na desregulação da homeostasia energética. De facto foram encontradas alterações no gene que codifica o MC3R em alguns indivíduos obesos⁵⁰⁻⁵¹. No entanto, estudos com um elevado número de indivíduos mostraram não existir diferença na prevalência de mutações no MC3R em obesos versus controlos não-obesos⁵². Assim, não existe evidência suficiente para considerar que o MC3R exibe um papel directo na incidência da obesidade humana.

Relativamente ao MC4R os dados são muito mais concretos e neste momento não existem dúvidas quanto ao seu envolvimento directo na obesidade humana. Verificou-se que mutações no MC4R representam a causa mais frequente (entre 3 a 6%) de obesidade monogénica⁵³⁻⁵⁴ e, depois de realizados estudos em diferentes populações, estão neste momento descritas mais de 150 mutações distintas no gene que codifica o MC4R²⁵. Uma análise particular na população do Quebec mostrou uma associação entre o fenótipo de obesidade e alterações não só no gene que codifica o MC4R mas também o MC5R⁵⁵.

Recentemente foi descrita a presença de auto-anticorpos anti-MC4R em indivíduos obesos⁵⁶⁻⁵⁷. Verificou-se também que após purificação destes auto-anticorpos e administração em ratos ocorria um aumento da ingestão alimentar em 48 horas⁵⁶. Estes auto-anticorpos poderão assim perturbar o normal funcionamento do MC4R e provocar obesidade. Por todos estes dados, a indústria farmacêutica tem revelado grande interesse no estudo do papel do MC4R no controlo da ingestão alimentar e do dispêndio energético, como um potencial alvo no tratamento da obesidade.

REGULAÇÃO CENTRAL DA HOMEOSTASIA ENERGÉTICA

O papel das melanocortinas ao nível da regulação central do balanço energético tem sido intensamente estudado através de ensaios farmacológicos, modelos animais com mutações espontâneas ou induzidas e analisando dados genéticos em patologias humanas.

Em neurónios hipotalâmicos, a expressão da POMC é regulada por diversas hormonas (leptina, grelina, insulina), nutrientes (glicose, leucina) e citocinas (Il-18)¹. Um dos mecanismos melhor estudados compreende a regulação mediada pela leptina, segregada pelos adipócitos proporcionalmente à percentagem de massa gorda armazenada nestas células. Nas duas classes distintas de neurónios do núcleo arqueado que expressam isoladamente POMC e AgRP também existem os receptores da leptina^{10,58}. De uma forma sucinta, a leptina libertada pelos adipócitos vai inibir a expressão de AgRP e estimular a síntese de POMC e, conseqüentemente, promover a libertação de alfa-MSH pelos neurónios melanocortinérgicos no hipotálamo^{22,59-60}. Conseqüentemente o alfa-MSH actua sobre o MC3R e MC4R expressos nestes neurónios inibindo a ingestão alimentar e aumentando o dispêndio energético.

Nos anos 80, o papel das melanocortinas ao nível do SNC foi intensamente estudado e relacionado com o controlo da ingestão alimentar e da massa corporal. Administrações intracerebroventriculares de alfa-MSH e MTII (análogo do alfa-MSH) em roedores e primatas resultam numa redução significativa nos níveis de ingestão alimentar e do peso corporal⁶¹⁻⁶³. No entanto, estes efeitos não são observados nos ratinhos «knockout» para o MC4R⁶⁴. Por outro lado, injeções centrais de AgRP ou SHU9119, um antagonista dos MC3R e MC4R, contrariam o efeito hipofágico do alfa-MSH/MTII, aumentando a ingestão ali-

mentar e diminuindo o dispêndio energético e a termogénese⁶⁵⁻⁶⁷.

A acção das melanocortinas na regulação da ingestão alimentar é indiscutível, mas os efeitos podem ocorrer a diversos níveis: selecção da comida e duração ou frequência da refeição⁶⁸. De facto verificou-se que o tratamento de ratos com MTII reduz o tamanho e a duração da refeição e não a frequência ou intervalos entre as refeições⁶⁹. Este tratamento induz também uma preferência palativa, uma vez que os animais diminuem mais a ingestão de gordura relativamente a carboidratos e proteínas⁷⁰. Igualmente, os ratinhos com sobre-expressão de AgRP ou «knockouts» MC4R e POMC apresentam uma preferência por ingestão de uma dieta rica em gordura^{41, 71}.

ACÇÃO DAS MELANOCORTINAS NO TECIDO ADIPOSE

A regulação da ingestão alimentar assim como do dispêndio energético envolvem processos de sinalização celular tanto ao nível do SNC como a nível periférico, embora o mecanismo de acção e a função das melanocortinas em tecidos periféricos permanecem largamente desconhecidos. Sabe-se que a administração periférica de análogos das melanocortinas em ratinhos obesos e «knockout» POMC conduz a uma redução do peso destes animais, através de um efeito directo nos adipócitos^{61,72-73}. Em humanos também se mostrou que os níveis plasmáticos de alfa-MSH se encontram elevados em indivíduos obesos quando comparados com indivíduos controlo, o que sugere algum envolvimento das melanocortinas a nível periférico na regulação do balanço energético⁷⁴⁻⁷⁵. No entanto, existem outros dados na literatura, mostrando uma falta de correlação entre os níveis plasmáticos de alfa-MSH e marcadores de obesidade⁷⁶⁻⁷⁸.

O conhecimento sobre os receptores que especificamente medeiam o efeito das melanocortinas nos tecidos periféricos é bastante

diminuto. No tecido adiposo de pacientes obesos, estudos quantitativos de PCR em tempo real mostraram que os níveis de mRNA do MC1R estavam aumentados na gordura subcutânea, mas não na gordura abdominal⁷⁹. Neste estudo, os autores referiram que o tecido adiposo humano possui níveis baixos de MC4R e MC5R mas não possui quantidade detectável de MC2R e MC3R. Contudo a expressão dos diferentes MCRs no tecido adiposo humano é uma matéria não consensual, uma vez que na literatura surgem resultados muito diversos, em oposição aos descritos anteriormente: Chhajlani *et al* reportou a presença de MC5R e MC1R na gordura abdominal⁸⁰; Chagnon *et al* descreve adicionalmente a presença de MC4R⁵⁵; Smith *et al* apenas detectou MC1R e MC2R⁸¹. Para esta divergência de resultados certamente contribuem as diferenças no tipo de tecido adiposo recolhido na amostragem e sensibilidade das metodologias utilizadas. Há por conseguinte muito espaço de conhecimento por preencher nos mecanismos de acção das melanocortinas no tecido adiposo.

Contrariamente à divergência de resultados em tecido adiposo humano, os receptores das melanocortinas expressos em roedores reúnem consenso, estando apenas descrita a presença de MC4R e MC5R em adipócitos de rato⁸² e MC2R e MC5R em adipócitos de murganho¹⁷⁻¹⁸. Nos adipócitos de murganho 3T3-L1 verificou-se que tratamentos com alfa-MSH promovem aumento dos níveis de lipólise⁸³. Uma vez que dos dois receptores expressos nesta linhagem (MC2R e MC5R) apenas o MC5R apresenta afinidade para o alfa-MSH, surge a hipótese que este receptor poderá mediar os efeitos desta melanocortina no tecido adiposo. Cho *et al*⁸³ demonstrou também que o aumento da lipólise provocado pelo alfa-MSH era dependente das vias de sinalização cAMP-PKA e ERK1/2, as quais caracterizamos recentemente como vias mediadoras da acção específica do MC5R em células humanas

HEK293 com expressão estável do MC5R-GFP⁸⁴. Apesar de não existirem evidências directas, estes dados favorecem o envolvimento do MC5R na regulação do metabolismo lipídico no tecido adiposo.

ENSAIOS CLÍNICOS

Vários estudos estão a ser desenvolvidos com o intuito de promover a síntese de compostos selectivos para o sistema das melanocortinas, direccionados para o uso clínico na terapêutica da obesidade (e também de condições de caquexia e anorexia). O alvo mais comum tem sido o MC4R mas a indústria farmacêutica tem encontrado uma grande dificuldade em obter compostos com afinidade exclusiva para o MC4R, que muitas vezes exibem interacções cruzadas com outros MCRs². Até ao presente, os compostos desenvolvidos foram apenas utilizados em ensaios clínicos para tratamento de disfunção eréctil⁸⁵⁻⁸⁶ e disfunção sexual feminina⁸⁷. Os ensaios de fase II com bremelatonide, um derivado do MT-II, mostraram benefícios em homens com disfunção eréctil que não respondiam à terapia com sildenafil⁸⁵ e também em mulheres com disfunção sexual⁸⁷. Embora os efeitos secundários reportados não fossem muito relevantes verificaram-se alterações cardiovasculares de modo que a fase III dos ensaios clínicos foi atrasada e aguarda autorização da “Food and Drug Administration” (consultar <http://www.palatin.com/products/bremelatonide.asp>). Sendo estes efeitos secundários toleráveis com uma utilização ocasional da bremelanotide, a preceder actividade sexual, a administração crónica, necessária ao tratamento da obesidade, não é aceitável, razão porque esta droga não constitui uma opção na terapia da obesidade. Recentemente foi descrito um agonista selectivo do MC4R, o MK-0493, mas da sua administração a indivíduos obesos resultou uma ligeira diminuição, não significativa, do peso corporal⁸⁸. Os autores concluíram que a utilização deste

agonista do MC4R também não constitui uma abordagem eficaz como terapia anti-obesidade. De uma forma geral, os ensaios clínicos efectuados até agora envolveram sempre compostos que afectam ou interagem com o sistema central das melanocortinas, o que implica uma amplitude grande de efeitos secundários. A utilização de compostos que actuem a nível periférico poderá por isso constituir uma alternativa favorável ao tratamento da obesidade.

CONCLUSÃO

O sistema das melanocortinas constitui uma via fundamental na regulação do balanço energético, frequentemente associado a obesidade através da modulação da resposta hipotalâmica. Está claramente demonstrado que a administração de melanocortinas quer a nível central, quer periférico, promove a diminuição do peso corporal, da ingestão alimentar e aumenta o dispendio energético¹. Estes dados potenciam o sistema melanocortinérgico como um alvo no tratamento de distúrbios alimentares.

Embora muitas questões permaneçam por responder, o aumento do conhecimento dos mecanismos hormonais, moleculares e celulares envolvidos na regulação da homeostasia energética permite abrir novos caminhos à indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas drogas com fim ao tratamento da obesidade.

AGRADECIMENTOS

Os nossos agradecimentos à Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo e à Abbott Laboratórios pela atribuição da Bolsa de Investigação em Obesidade 2009 e à POCI 2010, FSE e Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento da Adriana Rodrigues (SFRH/BD/41024/2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mountjoy KG. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J* 2010;428(3):305-24.
2. Wikberg JE, Mutulis F. Targeting melanocortin receptors: an approach to treat weight disorders and sexual dysfunction. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(4):307-23.
3. Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(5):203-15.
4. Ford ES, Li C, Zhao G, Tsai J. Trends in obesity and abdominal obesity among adults in the United States from 1999-2008. *Int J Obes (Lond)* 2010.
5. Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 2008;8:200.
6. do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev* 2008;9(1):11-9.
7. Camoes M, Lopes C, Oliveira A, Santos AC, Barros H. Overall and central obesity incidence in an urban Portuguese population. *Prev Med* 2010;50(1-2):50-5.
8. Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ. Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 1983;306(5941):374-6.
9. Jacobowitz DM, O'Donohue TL. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(12):6300-4.
10. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997;278(5335):135-8.
11. Lu D, Willard D, Patel IR, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 1994;371(6500):799-802.
12. Tan CM, Brady AE, Nickols HH, Wang Q, Limbird LE. Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:559-609.
13. Getting SJ. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Ther* 2006;111(1):1-15.
14. Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 2005;18(6):393-410.
15. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992;257(5074):1248-51.
16. Slominski A, Ermak G, Mihm M. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(7):2746-9.
17. Boston BA, Cone RD. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 1996;137(5):2043-50.
18. Boston BA. The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:75-84.
19. Gantz I, Konda Y, Tashiro T, et al. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993;268(11):8246-50.
20. Butler AA, Kesterson RA, Khong K, et al. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 2000;141(9):3518-21.
21. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, et al. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000;26(1):97-102.
22. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411(6836):480-4.
23. Cone RD. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 2006;27(7):736-49.
24. Mountjoy KG, Wild JM. Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;107(2):309-14.
25. Tao YX. The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology. *Endocr Rev* 2010.
26. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997;88(1):131-41.
27. Martin WJ, MacIntyre DE. Melanocortin recep-

- tors and erectile function. *Eur Urol* 2004;45(6):706-13.
28. Starowicz K, Przewlocka B. The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci* 2003;73(7):823-47.
 29. Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, Cone RD. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 1997;91(6):789-98.
 30. Morgan C, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency in mice blocks a novel pathway influencing pheromone-induced aggression. *Behav Genet* 2006;36(2):291-300.
 31. Morgan C, Thomas RE, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behavior in male mice. *Horm Behav* 2004;45(1):58-63.
 32. Morgan C, Thomas RE, Ma W, Novotny MV, Cone RD. Melanocortin-5 receptor deficiency reduces a pheromonal signal for aggression in male mice. *Chem Senses* 2004;29(2):111-5.
 33. An JJ, Rhee Y, Kim SH, et al. Peripheral effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on fatty acid oxidation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2007;282(5):2862-70.
 34. Klebig ML, Wilkinson JE, Geisler JG, Woychik RP. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(11):4728-32.
 35. Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 1997;17(3):273-4.
 36. Qian S, Chen H, Weingarh D, et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 2002;22(14):5027-35.
 37. Flier JS. AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? *Cell Metab* 2006;3(2):83-5.
 38. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998;19(2):155-7.
 39. Krude H, Biebermann H, Schnabel D, et al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(10):4633-40.
 40. Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, et al. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 2002;11(17):1997-2004.
 41. Coll AP, Loraine Tung YC. Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;300(1-2):147-51.
 42. Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 1999;5(9):1066-70.
 43. Challis BG, Coll AP, Yeo GS, et al. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(13):4695-700.
 44. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997;16(3):303-6.
 45. Lloyd DJ, Bohan S, Gekakis N. Obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency in Pc1 mutant mice. *Hum Mol Genet* 2006;15(11):1884-93.
 46. Loos RJ, Rankinen T, Rice T, et al. Two ethnic-specific polymorphisms in the human Agouti-related protein gene are associated with macronutrient intake. *Am J Clin Nutr* 2005;82(5):1097-101.
 47. Bonilla C, Panguluri RK, Taliaferro-Smith L, et al. Agouti-related protein promoter variant associated with leanness and decreased risk for diabetes in West Africans. *Int J Obes (Lond)* 2006;30(4):715-21.
 48. Vink T, Hinney A, van Elburg AA, et al. Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 2001;6(3):325-8.
 49. Marks DL, Boucher N, Lanouette CM, et al. Ala67Thr polymorphism in the Agouti-related peptide gene is associated with inherited leanness in humans. *Am J Med Genet A* 2004;126A(3):267-71.
 50. Lee YS, Poh LK, Loke KY. A novel melanocortin

- 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1423-6.
51. Rached M, Buronfosse A, Begeot M, Penhoat A. Inactivation and intracellular retention of the human I183N mutated melanocortin 3 receptor associated with obesity. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689(3):229-34.
 52. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, et al. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet* 2009;18(6):1140-7.
 53. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 2000;106(2):253-62.
 54. Lubrano-Berthelie C, Dubern B, Lacorte JM, et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(5):1811-8.
 55. Chagnon YC, Chen WJ, Perusse L, et al. Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Mol Med* 1997;3(10):663-73.
 56. Peter JC, Bekel A, Lecourt AC, et al. Anti-melanocortin-4 receptor autoantibodies in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(3):793-800.
 57. Mohan C, Agarwal AK. Melanocortin-4-receptor autoantibodies: a new player in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(3):757-9.
 58. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138(10):4489-92.
 59. Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998;47(2):294-7.
 60. Mizuno TM, Mobbs CV. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 1999;140(2):814-7.
 61. Pierroz DD, Ziotopoulou M, Ungsuan L, Moschos S, Flier JS, Mantzoros CS. Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2002;51(5):1337-45.
 62. McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279(2):R695-703.
 63. Koevler FH, Grove KL, Schiffmacher A, Smith MS, Cameron JL. Central melanocortin receptors mediate changes in food intake in the rhesus macaque. *Endocrinology* 2001;142(6):2586-92.
 64. Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, et al. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 1999;21(1):119-22.
 65. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998;139(10):4428-31.
 66. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385(6612):165-8.
 67. Small CJ, Kim MS, Stanley SA, et al. Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 2001;50(2):248-54.
 68. Hillebrand JJ, Kas MJ, Adan RA. To eat or not to eat; regulation by the melanocortin system. *Physiol Behav* 2006;89(1):97-102.
 69. Williams DL, Grill HJ, Weiss SM, Baird JP, Kaplan JM. Behavioral processes underlying the intake suppressive effects of melanocortin 3/4 receptor activation in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;161(1):47-53.
 70. Samama P, Rumennik L, Grippio JF. The melanocortin receptor MCR4 controls fat consumption. *Regul Pept* 2003;113(1-3):85-8.
 71. Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ, de Krom M. The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol* 2006;149(7):815-27.
 72. Strader AD, Shi H, Ogawa R, Seeley RJ, Reizes O. The effects of the melanocortin agonist (MT-II) on subcutaneous and visceral adipose tissue in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322(3):1153-61.

73. Bluher S, Ziotopoulou M, Bullen JW, Jr., et al. Responsiveness to peripherally administered melanocortins in lean and obese mice. *Diabetes* 2004;53(1):82-90.
74. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, et al. Elevated plasma levels of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) are correlated with insulin resistance in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(10):1260-4.
75. Hoggard N, Johnstone AM, Faber P, et al. Plasma concentrations of alpha-MSH, AgRP and leptin in lean and obese men and their relationship to differing states of energy balance perturbation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61(1):31-9.
76. Donahoo WT, Hernandez TL, Costa JL, et al. Plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone: sex differences and correlations with obesity. *Metabolism* 2009;58(1):16-21.
77. Nam SY, Kratzsch J, Kim KW, Kim KR, Lim SK, Marcus C. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of leptin, NPY, and alpha-MSH in obese women and their relationship to negative energy balance. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4849-53.
78. Gavrilu A, Chan JL, Miller LC, Heist K, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone levels in relation to body composition: alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(2):1047-54.
79. Hoch M, Eberle AN, Wagner U, Bussmann C, Peters T, Peterli R. Expression and localization of melanocortin-1 receptor in human adipose tissues of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15(1):40-9.
80. Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38(1):73-80.
81. Smith SR, Gawronska-Kozak B, Janderova L, et al. Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52(12):2914-22.
82. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Rayner DV. Regulation of adipose tissue leptin secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system. *J Mol Endocrinol* 2004;32(1):145-53.
83. Cho KJ, Shim JH, Cho MC, et al. Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 2005;96(4):869-78.
84. Rodrigues AR, Pignatelli D, Almeida H, Gouveia AM. Melanocortin 5 receptor activates ERK1/2 through a PI3K-regulated signaling mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 2009;303(1-2):74-81.
85. Safarinejad MR, Hosseini SY. Salvage of sildenafil failures with bremelanotide: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *J Urol* 2008;179(3):1066-71.
86. Lansdell MI, Hepworth D, Calabrese A, et al. Discovery of a selective small-molecule melanocortin-4 receptor agonist with efficacy in a pilot study of sexual dysfunction in humans. *J Med Chem* 2010;53(8):3183-97.
87. Safarinejad MR. Evaluation of the safety and efficacy of bremelanotide, a melanocortin receptor agonist, in female subjects with arousal disorder: a double-blind placebo-controlled, fixed dose, randomized study. *J Sex Med* 2008;5(4):887-97.
88. Krishna R, Gumbiner B, Stevens C, et al. Potent and selective agonism of the melanocortin receptor 4 with MK-0493 does not induce weight loss in obese human subjects: energy intake predicts lack of weight loss efficacy. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(6):659-66.
89. Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 2004;56(1):1-29.
90. Coll AP. Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential? *Clin Sci (Lond)* 2007;113(4):171-82.
91. Lee M, Wardlaw SL. The central melanocortin system and the regulation of energy balance. *Front Biosci* 2007;12:3994-4010.