

*Angela Maria Ramos Lobo*

**Alteração dos ritmos diários de temperatura e  
atividade motora provocada pelo diabetes  
induzido por estreptozotocina em ratos wistar**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla-Neto

Versão original

São Paulo  
2013

## RESUMO

Ramos Lobo AM. Alteração dos ritmos diários de temperatura e atividade motora provocada pelo diabetes induzido por estreptozotocina em ratos Wistar. [dissertação (Mestrado em Ciências)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Nos mamíferos, os núcleos supraquiasmáticos coordenam a ritmicidade biológica, regulando os ritmos circadianos e sazonais do organismo. A melatonina, hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, é conhecida por ser um importante agente regulador dos ritmos endógenos, incluindo atividade motora (AM) e temperatura corporal (TC), sendo a sua produção influenciada por diversos fatores, como por exemplo, o diabetes mellitus tipo I (DM1). No rato, o DM1 promove a diminuição da TC, da AM e da síntese de melatonina, e o tratamento com insulina reverte tanto o efeito sobre a média da TC quanto sobre a síntese de melatonina, porém não reverte à diminuição da média da AM. No entanto, ainda não são conhecidos, nesse modelo experimental, os perfis diários da TC e da AM, marcadores do sistema circadiano. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do DM1 sobre os ritmos de TC e AM, seus parâmetros rítmicos (MESOR, amplitude e acrofase), peso e glicemia, assim como as modificações resultantes dos tratamentos tardios e precoces com insulina (6U/dia) (INSt e INSp), melatonina (0,5mg/kg/dia) (MELt e MELp) ou ambos (INS+MELt e INS+MELp). Ratos Wistar (200-250g), implantados com um transmissor tiveram sua temperatura e atividade motora registradas com um sistema de telemetria durante 55 dias. Após uma semana de registro, o diabetes foi induzido com estreptozotocina (60mg/kg) e os animais divididos em seis grupos: INSt, MELt, INS+MELt iniciando os tratamentos após 33 dias de diabetes, e INSp, MELp, INS+MELp, tratados após de 3 dias da indução, passando por um intervalo de 15 dias sem tratamentos e restituídos por mais 15 dias. O grupo controle foi injetado com veículo (tampão citrato). Trinta e três dias de diabetes levaram a ruptura do ritmo de TC junto com a redução da TC média, e a diminuição da AM com alteração do seu ritmo. Os tratamentos (INSt e INS+MELt) reverteram o quadro, sendo o INS+MELt mais eficiente. MELt restaurou apenas alguns parâmetros rítmicos, sendo mais eficiente sobre a AM. O grupo controle não apresentou modificações na TC nem na AM ao longo do experimento. Três dias de DM1 alteraram o ritmo da TC, mas não o de AM nem as médias de TC e AM. Os tratamentos precoces restauraram as alterações do diabetes no ritmo de TC. A interrupção dos tratamentos diminuiu as médias de temperatura e atividade e alterou parcialmente os ritmos. A restituição dos tratamentos melhorou o quadro diabético, porém diferente do controle. Esses resultados mostram que, além da hipotermia, a redução de peso, a hiperglicemia e a diminuição na média da atividade motora, o estado diabético leva a uma ruptura do ritmo diário de TC e uma forte alteração no ritmo de AM. Os tratamentos INSt e INS+MELt revertem os efeitos deletérios, sendo mais eficiente quando combinado com a melatonina. A MELt atenua os efeitos deletérios, sendo mais evidente na AM. A ação da insulina é mais rápida, mais duradoura e mais eficiente do que a melatonina, a qual tem melhor ação sobre a atividade, e essas melhoras são dependentes da continuidade dos tratamentos.

**Palavras-chave:** Ritmos biológicos. Diabetes. Temperatura corporal. Atividade motora. Insulina. Melatonina.

## ABSTRACT

Ramos Lobo AM. Streptozotocin-induced diabetes disrupts body temperature and home cage activity daily rhythms in Wistar rats. [Masters thesis in Human Physiology] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

In mammals, body temperature (BT) and home cage activity (HCA) rhythms are two of the diverse rhythms in the body regulated by the circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nuclei (SCN), and are considered “marker rhythms” of the circadian pacemaker. Melatonin, the pineal gland hormone, is a major regulator of the endogenous rhythms including BT and HCA. Its production is influenced by many factors, such as type 1 *diabetes mellitus*. In rats, T1DM leads to hypothermia and reduced melatonin synthesis and HCA; insulin treatment reestablishes normal BT and melatonin but not HCA. However, the BT and HCA rhythms, in this experimental model, remain unknown. The present work studied the effects of diabetes on the BT and HCA rhythms and the possible modifications resulting from early and late treatment with insulin (6U/day) (L-INS and E-INS), melatonin (daily 0.5mg/kg) (L-MEL and E-MEL), or both (L-INS+MEL and E-INS+MEL) on daily BT and HCA rhythms, its rhythmic parameters (MESOR, amplitude and acrophase), glycaemia and body weight on streptozotocin-induced (60mg/kg) Wistar rats (250g) for 55 days. After a week of control registration, diabetes was induced by a streptozotocin injection (60mg/kg) and the animals were divided in six groups: L-INS, L-MEL, L-INS+MEL, starting treatments after 33 days of diabetes, and E-INS, E-MEL, E-INS+MEL, treated after 3 days of diabetes for 15 days, with an interval of 15 days off treatments and then restored for 15 more days. Control group was injected with citrate buffer. Thirty three days of diabetes led to hypothermia and loss of BT rhythm, reduced HCA and its rhythm altered. L-INS and L-INS+MEL treatments reverted to normal, being L-INS+MEL more efficient. L-MEL restored some of the rhythmic parameters but had no effect on body weight and glycaemia. BT and HCA rhythms were not modified in control group. Three day diabetes altered BT, but not HCA rhythms nor mean BT and HCA. All early treatments reverted alterations in BT rhythm; however E-MEL had no effect on body weight and glycaemia. Interruption of treatments reduced mean BT and HCA and altered their rhythms. Restitution of treatments attenuated the deleterious effects, but did not restore normal parameters. Taken together, T1DM leads to disruption of BT and alteration of HCA rhythms. Late treatments with insulin restore normal rhythms, being more efficient when combined with melatonin. Melatonin attenuates the deleterious effects, being more evident on HCA. Insulin effects are faster, last longer and are more efficient than melatonin, which are more evident in HCA, and these effects depend on the maintenance of the treatments.

**Keywords:** Biological rhythms. Diabetes. Body temperature. Home cage activity. Insulin. Melatonin.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ritmos biológicos

Os ritmos biológicos circadianos, ubíquos nos seres vivos, constituem uma adaptação altamente eficiente uma vez que garantem a relação temporal entre os seres vivos e seu meio ambiente, em geral sincronizada pelo ciclo claro escuro do dia e da noite. Para isso, o sistema de temporização circadiana, organiza temporalmente todos os processos fisiológicos e comportamentais de forma que os sistemas funcionais no organismo se expressam com intensidades e qualidades diferentes de acordo com a hora do dia, garantindo, assim, essa relação temporal vital entre os seres vivos e seu ambiente, contribuindo com a sobrevivência individual e da espécie (Cipolla-Neto, 1988).

A persistência da ritmicidade circadiana em um ambiente carente de pistas externas sugere a existência de um sistema que mantém a organização temporal interna, chamado de oscilador interno (Benstaali et al., 2001).

A capacidade do oscilador interno de ajustar sua frequência a dos ritmos ambientais é chamada de *sincronização*. Os diversos ciclos ambientais capazes de regular o período e a fase dos osciladores internos são chamados de *Zeitgebers*, em alemão, “doador de tempo” (*Zeit*=tempo; *Geber*=doador), “sincronizadores”, ou “agentes arrastadores” (Cipolla-Neto, 1988).

Para a maioria dos organismos, e principalmente os roedores, o agente sincronizador mais importante é o ciclo claro/escuro, porém outros fatores ambientais periódicos também podem cumprir o papel de agentes sincronizadores, como a temperatura ambiental, os ciclos de disponibilidade de alimento, fatores sociais, etc (Cipolla-Neto, 1988).

Apesar dos vários ritmos de um organismo estarem sincronizados entre si, eles apresentam uma dispersão de fase ao longo do dia. Assim, diversos ritmos biológicos exibem seus picos de máximo (hora do dia em que é mais provável que a variável estudada atinja seu valor máximo na oscilação) em diferentes momentos do ciclo de 24 h. No entanto, a relação de fase entre eles é estável, garantindo a manutenção da ordem temporal interna circadiana (Cipolla-Neto, 1988). Isto significa que os ritmos de sistemas e órgãos de um organismo mantêm relações de fase

estáveis entre si e com o ciclo claro escuro ambiental (Marques, Menna-Barreto, 2003).

A nível sistêmico, a ritmicidade circadiana (*circa* = aproximadamente; *diana* = referente a um dia) depende do oscilador central, capaz de impor sua frequência de oscilação aos outros osciladores presentes no organismo. Os marca-passos circadianos podem ser únicos como os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) em roedores, ou múltiplos, como os NSQ e a pineal em aves (Cipolla-Neto, 1988). O fato dos osciladores centrais serem capazes de impor seu período aos osciladores secundários caracteriza uma hierarquia funcional dentro da estrutura multioscilar dos vertebrados. A ablação neonatal dos NSQ em ratos elimina permanentemente os ritmos de atividade locomotora e de ingestão de água, o que sugere que outras áreas do cérebro não têm a capacidade de reorganizar e suprir a função desempenhada pelos NSQ (Marques et al., 1997). Por outro lado, várias secreções endócrinas podem, por sua vez, influenciar o período e a sincronização do oscilador central. Isso indica que osciladores subordinados, como algumas glândulas endócrinas, podem retroagir, modulando a função dos osciladores centrais. A hierarquia da estrutura multioscilar dos vertebrados mencionada acima depende da modulação por retroalimentação dos outros osciladores periféricos para que se dê a sua expressão funcional.

Em nível comportamental, a estrutura circadiana dos surtos de atividade e de repouso é fundamental para observar as outras distribuições temporais. Atividade e repouso são categorias definidas, em geral, a partir da observação comportamental. Desta forma, distinguem-se da vigília e o sono, cuja caracterização básica provém, principalmente, da análise de parâmetros fisiológicos (atividade elétrica cerebral, muscular, ocular, parâmetros neurovegetativos, etc.). Nem sempre a categoria atividade, comportamentalmente definida, corresponde a um estado fisiológico de vigília; assim como o repouso comportamental nem sempre corresponde a estados de sono, fisiologicamente definidos (Cipolla-Neto, 1988). Por outro lado, o ritmo de temperatura é um dos diversos ritmos no organismo regulado pelo sistema oscilador circadiano. Devido a sua robustez e a facilidade relativa para seu monitoramento, foi estabelecido como um dos “ritmos marcadores” do marca-passo circadiano (Hanneman, 2001; Kelly, 2006; Minors et al., 1996). Scheer et al. (2005) descreveram um efeito dual dos NSQ na termorregulação de ratos, levando a

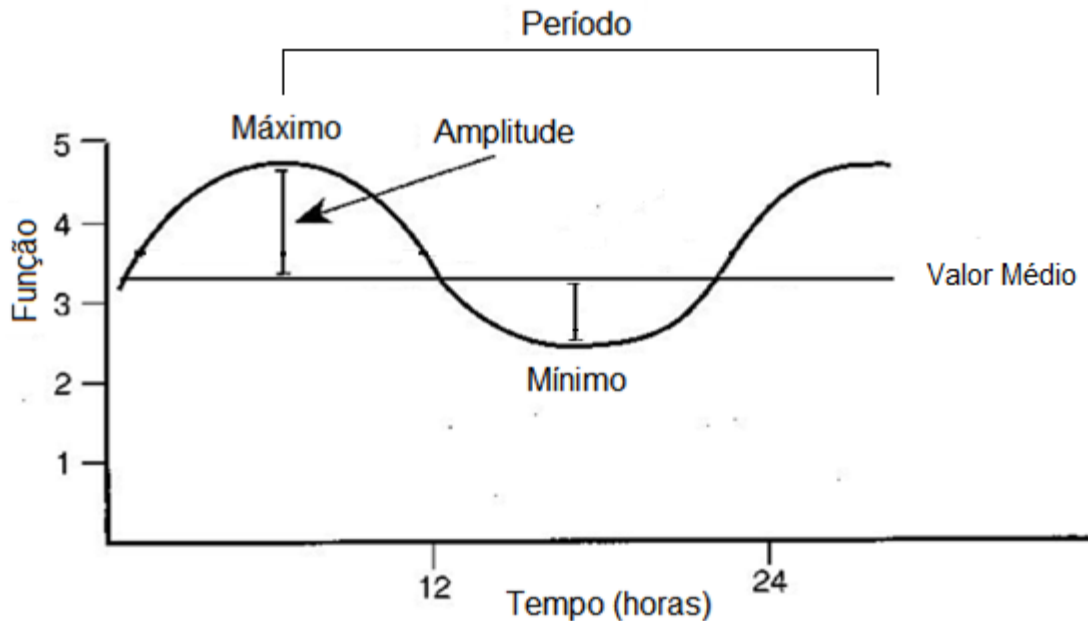
diminuição da temperatura corporal durante a fase clara e ao aumento durante a fase escura, independentemente da atividade motora. Além disso, os NSQ são fundamentais para a determinação dos ritmos metabólicos tais como as mudanças na glicemia, no cortisol e melatonina plasmáticos (Goncharova et al., 2005; Korkmaz et al., 2009; la Fleur et al., 2001a,b; Peschke et al., 2006, 2007; Reiter et al., 2009).

Na década de 60 se acreditava que, em roedores noturnos, o aumento na atividade durante a fase escura do ciclo claro/escuro poderia ser responsável pelo pico diário da temperatura (Abrams, Hammel, 1965). Contudo, De Castro (1978) concluiu que no rato a variação diária da temperatura central é produto do ciclo diário de atividade e do ciclo diário do limite superior da termorregulação; o limite inferior é mantido constante. Atualmente ainda está em discussão se os ritmos de temperatura e atividade dos ratos são controlados pelo mesmo oscilador ou por osciladores diferentes no NSQ.

## **1.2 Características dos ritmos circadianos**

O termo *ritmo biológico* é aplicado a qualquer oscilação de uma variável biológica, seja qual for o nível de organização considerado, que se repete com o mesmo período. O período é então o intervalo de tempo em que um ciclo se completa (Figura 1). Cada um dos valores que a variável assume durante um ciclo define uma *fase* do ritmo. Apesar de *fase* significar cada um dos momentos de um ritmo, esse termo é empregado para exprimir os estados de um processo ou de um ciclo ambiental. Assim, no ritmo de atividade fala-se de “fase de repouso” e “de atividade”; no ciclo de um dia, designa-se a “fase clara” e “escura”; no ciclo de temperatura, distingue-se a “fase quente” da “fase fria” (Marques et al., 1997).

**Figura 1** – Parâmetros que definem uma oscilação circadiana.



Oscilação de uma função biológica hipotética ajustada a uma curva cosseno e os parâmetros rítmicos que a definem. A duração do ciclo completo (período) é aproximadamente de 24 h. A amplitude é uma medida do grau de variação dentro da oscilação, ou seja, é a diferença entre o valor máximo (ou mínimo) e o valor médio.

Fonte: Adaptado de Cardinali et al., 1994.

Para poder estudar a variável biológica desejada, são utilizadas funções matemáticas como o ajuste da oscilação a uma função cosseno, conhecido como o *método do Cosseno* ou *Cosinor*. Na curva ajustada, o valor médio da oscilação é chamado de *MESOR* (Midline Estimating Statistic Of Rhythm), e a medida do tempo transcorrido entre um instante de referencia e o instante no qual é maior a probabilidade de ser encontrado o máximo é chamada de *acrofase*. A duração da oscilação é definida como *período* e a medida do grau de variação dentro da oscilação (entre o valor máximo ou mínimo e o MESOR) é chamada de *amplitude*. Com esses parâmetros rítmicos (MESOR, amplitude, acrofase) e a curva ajustada é possível definir qualquer função biológica no tempo. No caso das variáveis com oscilação diária que estão sincronizadas ao ciclo claro-escuro, o período é definido e de 24 h.

Um organismo sadio é caracterizado por um alto grau de ordem temporal na sua organização circadiana, também chamado de *acoplamento*, entre os osciladores

do organismo, que resulta em seu funcionamento coordenado ou *ordem temporal interna* (Marques, Menna-Barreto, 2003). Os desvios desta ordem temporal interna (desacoplamento) podem caracterizar uma doença crônica. Um indicador da alteração cronobiológica consiste na diminuição da amplitude dos ritmos (Cardinali et al., 1994).

A adaptação temporal envolve diversas etapas, todas elas mediadas pelo oscilador interno, permitindo ao organismo organizar recursos e atividades antes da ocorrência do momento em que sejam necessários (Pittendrigh, 1960). Assim, as transições entre estados, como do sono à vigília ou do jejum à alimentação, na verdade, são preparadas progressivamente, antes que o indivíduo acorde ou se alimente. Por sua parte, também é observado esse fenômeno de antecipação nas migrações sazonais.

### **1.3 Controle neural da síntese de melatonina**

Em mamíferos, a informação das condições de luminosidade ambiental chega às retinas sendo captada pelas células ganglionares e levada até a glândula pineal, que na fase escura tem um aumento do seu produto de secreção, o hormônio melatonina (Figura 2).

O sistema neural responsável pela síntese de melatonina envolve o núcleo paraventricular (PVN), na sua porção parvicelular, que através de vias diretas e indiretas, projeta-se sobre a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal. As fibras pré-ganglionares simpáticas projetam-se sobre o gânglio cervical superior que, por sua vez se projeta sobre a glândula pineal.

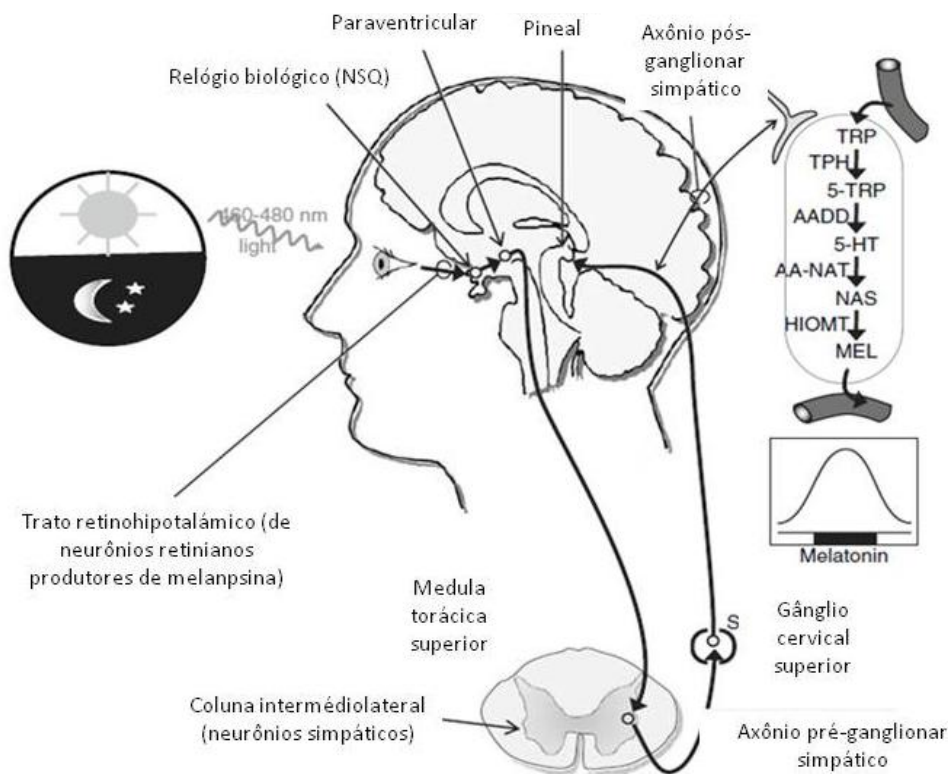
A produção de melatonina se dá de forma rítmica e circadiana devido a um controle direto dos núcleos supraquiasmáticos sobre o PVN. Os NSQ orquestram os ritmos circadianos através da informação temporal por vias neurais e humorais.

Nos mamíferos de hábito diurno, os NSQ modulam o sistema nervoso autonômico e permitem o controle simpático do metabolismo, fenômeno do amanhecer. Nesse momento, o conteúdo plasmático de epinefrina, norepinefrina, e o cortisol estão elevados. O sistema de temporização circadiana faz com que, no período de maior atividade e alimentação, os tecidos sejam mais tolerantes à glicose além de aumentar a sensibilidade à insulina. No final dessa fase, as retinas são expostas à escuridão e tem início o processo de síntese de melatonina pela glândula



pineal. Ao mesmo tempo, os NSQ bloqueiam a tonicidade simpática e permitem o controle parassimpático do metabolismo, fenômeno do entardecer. A presença de luz durante a fase escura induz uma reação de alerta com mobilização do sistema simpático, sendo este um efeito *mascarador* (neste caso, tratando-se de um processo externo que produz a modificação da expressão do ritmo biológico, chama-se *maskamento externo*). Os NSQ inibem a secreção de melatonina da pineal e, dependendo do momento da noite em que ocorre a foto-estimulação, atrasa o pico da melatonina se for ao começo da noite ou adianta-o no dia seguinte se ocorrer no fim da noite (Korkmaz et al., 2009). Dado que a melatonina é produzida sempre na fase escura independente dos organismos serem de hábitos diurnos ou noturnos, nesses últimos a regulação do metabolismo se dá de forma inversa, ou seja, na fase escura ocorre o controle simpático do metabolismo e na fase clara, o controle do parassimpático do metabolismo.

**Figura 2** – Sistema de temporização do sistema circadiano na síntese de melatonina.



Controle neural da síntese de melatonina, e as estruturas que participam desse processo.  
Fonte: Adaptado de Kormaz et al., 2009.

#### 1.4 Glândula pineal e melatonina

A melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, é sintetizada exclusivamente na fase escura em resposta ao estímulo noradrenérgico proveniente do gânglio cervical superior, que por sua vez está subordinado aos núcleos paraventriculares hipotalâmicos. Esse sistema neural é temporizado circadianamente pelos NSQ que, por sua vez, sincronizam-se ao claro-escuro ambiental pela via retino-hipotalâmica. A síntese de melatonina envolve uma cascata enzimática que começa na hidroxilação do aminoácido essencial triptofano pela triptofano hidroxilase (TPH), gerando 5-hidroxitriptofano. Este por sua vez é transformado em 5-hidroxitriptamina (serotonina) por uma descarboxilase inespecífica de aminoácidos aromáticos. A serotonina é então N-acetilada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), gerando N-acetilserotonina, que é transformada em melatonina pela hidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT). A secreção de melatonina dá-se por um mecanismo de difusão simples e por ser uma molécula anfifílica difunde-se em meios aquosos ou lipídicos, não sendo armazenada em vesículas. A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos em ratos, e sua metabolização periférica se dá essencialmente pela transformação hepática (aproximadamente 90% da melatonina circulante) em 6-hidroximelatonina que após conjugação com sulfatos (a maior parte) ou com glucoronídeos é excretada na urina. No sistema nervoso central e na própria glândula pineal a melatonina pode ser transformada em quinuraminas sob a ação da 2,3 indolamina dioxigenase (Castro Afeche, Cipolla-Neto, 2008).

A administração farmacológica de melatonina é capaz de sincronizar ritmos circadianos em ratos em livre-curso (Rebolledo et al., 1983), e esse efeito depende da integridade dos NSQ (Cassone et al., 1986). Parece claro que a melatonina atua diretamente sobre os NSQ, pois a administração do hormônio durante a noite subjetiva deprime a atividade metabólica do NSQ (Cassone et al., 1988) e provoca deslocamentos de fase na atividade elétrica do NSQ *in vitro* (McArthur et al., 1991). Além disso, Vanecek et al. (1987) e Reppert et al. (1988) encontraram uma alta densidade de receptores de melatonina nos NSQ de roedores.

A duração das fases de claro e de escuro é fundamental para o desencadeamento da resposta fotoperiódica e também para a regulação dos ritmos diários. A duração da noite pelo organismo é avaliada a partir de um sinal humoral

dados pela melatonina (Arendt, 1988, 1995; Armstrong, Redman, 1985; Brown et al., 1981; Cardinali, 1981; Cardinali, Vacas, 1981; Goldman, 1983; Vollrath, 1981; Pevet, 1987; Reiter, 1983, 1987). A pineal nos mamíferos tem propriedades de transdutor neuroendócrino, pois a informação fóptica canalizada através de um sinal da via simpática chega à glândula e regula a secreção de melatonina. A pineal é o principal mediador da mudança fotoperiódica ambiental na preparação da resposta fisiológica nos ritmos circanuais e um poderoso modulador dos ritmos circadianos. Ela é a principal interface entre o ciclo claro/escuro ambiental e os sistemas nervoso central e endócrino. Uma característica notável da bioquímica da pineal é a capacidade de suas enzimas responderem imediatamente a mudanças fópticas ambientais, apresentando uma atividade maior na fase escura e uma atividade inibida pela luz. Essa regulação aloca a síntese de melatonina exclusivamente na fase escura, proporcionando ao organismo um sinal circulante indicativo da duração da fase escura (Cardinali, 1981; Honma et al., 1992).

É importante ressaltar que dentre suas ações, a melatonina promove a sincronização das funções centrais (Gillette, Mitchell 2002) e periféricas (Alonso-Vale et al., 2006, 2008; Lima et al., 1998; Picinato et al., 2002a), desempenhando um papel importante no metabolismo energético, na ação (Anhê et al., 2004, Lima et al., 1994) e secreção (Picinato et al., 2002a,b, 2008) da insulina, assim como na função do tecido adiposo (Alonso-Vale et al., 2004a,b, 2005).

## **1.5 Diabetes**

O diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas crônicas que se manifesta quando o pâncreas não produz insulina adequadamente ou quando o corpo não consegue utilizar apropriadamente a insulina que produz e, portanto impede que as células incorporem glicose do sangue e a use para convertê-la em energia, ocorrendo em ambos os casos um aumento da glicemia. A condição diabética está associada a dano em longo prazo em vários órgãos e sistemas de todo o organismo (Federação Internacional de Diabetes, IDF, 2012). Existem evidências que indicam que a destruição das células  $\beta$  do pâncreas (responsáveis pela síntese e secreção da insulina), por meio de mecanismos autoimunes, seria a causa predominante do diabetes mellitus de tipo I (Andersson et al., 2001).

O diabetes mellitus constitui um problema de saúde mundial. A IDF (2012) estima que 8% da população mundial padecem de diabetes (371 milhões de pessoas). O número de mortes atribuídas ao diabetes em 2012 foi de 4.8 milhões. Em 2007 a mesma instituição mostrou que no Brasil havia uma prevalência do diabetes de 5.8% (6.913.300 pessoas) com idades entre 20-79 anos e estimou que em 2025 haveria 11.4% de prevalência. Em 2012 os estudos da IDF mostraram que existem 13.8 milhões de pessoas diabéticas no Brasil (IDF, 2012).

Em 1997, a Associação Americana de Diabetes (ADA) estabeleceu novos critérios de classificação para cada tipo de diabetes e diagnóstico. Essa classificação do diabetes inclui quatro classes clínicas (ADA, 2009):

- Diabetes do tipo I (DM1) - que resulta da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, geralmente levando a uma deficiência absoluta de insulina, pode ser de origem autoimune ou idiopática;
- Diabetes do tipo II (DM2) - graus variados de diminuição da secreção e resistência à insulina;
- Outros tipos específicos devido a outras causas - defeitos genéticos da função da célula  $\beta$ , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (ex. fibrose cística) e indução por drogas ou produtos químicos (como no tratamento da SIDA ou após transplante de órgão);
- Diabetes gestacional – diabetes diagnosticada durante a gravidez.

Quando a hiperglicemia se torna crônica, o substrato que normalmente é utilizado como fonte de energia se torna tóxico. Cronicamente, a alta concentração de glicose é a maior causa de retinopatias, nefropatias, neuropatias e doenças vasculares (Gul et al., 2008).

É por essa razão que o estudo de modelos em animais diurnos e noturnos que permitam conhecer mais a respeito dessa patologia resulta de uma ajuda inestimável.

A indução experimental do diabetes é feita por drogas químicas que agem através da destruição seletiva das células  $\beta$  nas ilhotas pancreáticas. As principais substâncias utilizadas são a estreptozotocina (STZ) e a aloxana, que podem induzir tanto diabetes do tipo I como diabetes do tipo II (Szkudelski, 2001). A STZ é uma alquil-nitrosourea isolada a partir da bactéria *Streptomyces achromogenes*. Devido a sua semelhança com a glicose essa molécula entra seletivamente na célula  $\beta$

através do transportador de glicose GLUT2 (Karunanayake et al., 1976; Tjälve et al., 1976). A ação intracelular tóxica da STZ é devido à atividade alquilante do seu grupamento metil-nitrosurea, que transfere o seu grupo metil para a molécula de DNA, resultando em fragmentação do DNA. Em resposta aos danos causados ao DNA, a enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) tem sua ativação aumentada, resultando na diminuição de NAD<sup>+</sup> e dos estoques de ATP. Essa depleção no estoque de energia celular resulta em necrose das células  $\beta$  (Lenzen, 2008; Rakietyen et al., 1963).

Uma hipótese alternativa propõe que parte do efeito diabetogênico da STZ se deve a sua capacidade doadora de óxido nítrico (NO), porém o agente alquilante metil-metanosulfonato, que possui a maior toxicidade em células produtoras de insulina, não é uma molécula doadora de NO, indicando que o NO não é um pré-requisito para a obtenção da ação tóxica da família dos agentes alquilantes à qual a STZ pertence (Delaney et al., 1995). O tratamento de ratos jovens com STZ produz um estado diabético caracterizado pela perda de peso, polidipsia, poliúria, glicosúria, polifagia, hipoinsulinemia e hiperglicemia (Hakim et al., 1997). A ação coletiva da STZ resulta na destruição das células  $\beta$  e conseqüentemente na hipoinsulinemia e hiperglicemia resultantes. (Szkudelski, 2001).

### **1.6 Diabetes, atividade motora, temperatura corporal e melatonina**

Evidências na literatura mostram que o diabetes induzido por uma única injeção de STZ é capaz de produzir modificações tanto na temperatura corporal, quanto na média da atividade motora e na frequência cardíaca. Ele age diminuindo os três parâmetros em curto prazo e perdura até dez dias após a injeção de STZ. O efeito do diabetes experimental sobre esses parâmetros foi agudo, porém atingiram um estado estável aproximadamente 10 dias após a indução do diabetes. A redução na atividade precedeu as reduções no batimento cardíaco e temperatura corporal (Howarth et al., 2005a, b).

Além disso, também existem evidências da ação do diabetes a longo prazo, observadas em até 5 meses. Após 4 semanas da indução do diabetes, tanto a atividade física, quanto a temperatura foram significativamente menores do que as observadas nos animais controles. A glicemia permaneceu elevada mesmo após 22

semanas da indução. Esses efeitos são parcialmente normalizados pelo tratamento com insulina, em um período de três semanas (Howarth et al., 2005b). Em outro trabalho do grupo de Howarth et al. (2006) foi demonstrado que o tratamento com insulina foi capaz de reverter a diminuição da temperatura média mas não a diminuição na atividade motora média provocada pelo diabetes. A captação de glicose durante o tratamento com insulina produz substratos necessários para gerar energia e promover o subsequente aumento da temperatura corporal (Howarth et al., 2006). Além disso, o hipotireoidismo é uma doença associada com os modelos mais comuns de diabetes (STZ e aloxana) (Katovitch et al., 1993; Rodgers et al., 1991; Rondeel et al., 1992; Schroder-Van Der Elst, Van Der Heide, 1992; Sochor et al., 1987; Sundaresan et al., 1984). Mais recentemente foi demonstrado que o diabetes induzido por STZ provoca um verdadeiro hipotireoidismo (valores diminuídos de T3 e T4 livres, junto com os sinais clínicos de hipotireoidismo, como frequência cardíaca diminuída, intervalo Q-T aumentado e menor temperatura retal), além de uma queda significativa na temperatura com oito semanas de diabetes, porém, não com duas semanas. Foi demonstrada uma correlação negativa entre a glicemia e o conteúdo de T3 e T4 livre. O tratamento com insulina preveniu todos os sinais de hipotireoidismo e restaurou os conteúdos de T3 e T4 livre. Já o tratamento com T3 normalizou a temperatura, a frequência cardíaca e o intervalo Q-T, mas não teve efeito sobre a glicemia. Esse dado sugere que esses efeitos observados nos animais diabéticos seriam decorrentes do hipotireoidismo secundário ao diabetes induzido pela STZ (Zhang et al., 2002).

Dados da literatura mostram que o diabetes experimental provoca uma redução na síntese e nos níveis circulantes de melatonina. Outros dados também mostram certa controvérsia, Herichová et al., (2005) não encontraram diminuição na síntese de melatonina pineal em ratos Wistar após 7 dias de indução de diabetes com uma única dose de STZ (100 mg/kg) e outro trabalho mostra concentração aumentada de melatonina plasmática pós-indução com STZ (Peschke et al., 2008). No caso de animais com diabetes tipo II, uma maior concentração de insulina está acompanhada da redução de melatonina (Peschke et al., 2008). Contudo, dados do grupo (Amaral, 2009) indicam que o diabetes induzido por STZ causa uma diminuição (50%) na produção de melatonina pela glândula pineal. Essa perda não é por necrose ou apoptose dos pinealócitos e reflete um desarranjo no metabolismo

pineal. A menor concentração de melatonina circulante pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento da doença, não só por diminuir a capacidade do organismo de combater o estresse oxidativo, mas também por provocar alterações na organização rítmica circadiana e prejudicar o importante papel exercido pela melatonina na potenciação da ação da insulina *in vitro* (Garcia et al., 2008).

Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a insulina atua na glândula pineal de ratos potencializando a síntese de melatonina dependente de noradrenalina, através da regulação da atividade das enzimas envolvidas na síntese de melatonina e que esse efeito de potencialização tem a participação da PI3K. Esse efeito potencializador está restrito a dois períodos específicos da fase escura, um no começo e outro no fim, portanto a glândula pineal apresenta duas janelas de sensibilidade à ação da insulina durante a fase noturna, quando há a presença de noradrenalina (Garcia et al., 2008, 2010).

Embora os efeitos da melatonina na modulação da glicemia em humanos não estejam totalmente estabelecidos, pacientes com diabetes mellitus do tipo II (DM2) apresentam uma diminuição no conteúdo plasmático de melatonina e um aumento dos receptores de melatonina pancreáticos (Peschke et al., 2006; Tutuncu et al., 2005). Além disso, Barone e Menna-Barreto (2011) demonstraram, em pacientes com diabetes do tipo I, uma correlação negativa entre a hiperglicemia e a produção de melatonina avaliada pela 6-sulfatoximelatonina urinária.

A diminuição da amplitude circadiana do sinal de melatonina endógena (devido ao envelhecimento ou à luz durante a fase escura) pode resultar em um aumento da massa corporal, da adiposidade visceral e as consequências metabólicas adversas. Existem evidências na literatura de que a suplementação com melatonina em ratos de meia idade consegue melhorar algumas respostas reguladoras do metabolismo energético como a diminuição da massa corporal, da adiposidade intra-abdominal, e das concentrações plasmáticas de insulina e leptina sem alterar o consumo alimentar nem a adiposidade total, assim como aumentar a temperatura corporal, a atividade física e o conteúdo plasmático de corticosterona, que são características de indivíduos jovens (Rasmussen et al., 1999; Wolden-Hanson et al., 2000; Zanuto et al., 2013).

A suplementação em horários inapropriados (durante a fase clara) pode reduzir sua habilidade de controlar a massa corporal (Wolden-Hanson et al., 2000).

A suplementação no horário apropriado (na fase escura) pode potencialmente funcionar como uma terapia ou prevenção para a resistência à insulina, o aumento na gordura intra-abdominal e para patologias resultantes do envelhecimento (Mendes et al., 2013; Rasmussen et al., 1999).



## 1.7 Justificativa

Com todas essas evidências descritas, ainda não é conhecido o efeito do diabetes sobre o perfil diário da temperatura corporal, nem sobre o ritmo de atividade motora. Sabe-se que na falta de insulina e conseqüentemente no desenvolvimento do diabetes a síntese de melatonina diminui, sendo restaurada no tratamento com insulina exógena. Além disso, o tratamento com insulina restabelece os parâmetros metabólicos dos animais diabéticos. Por outro lado, e levando em consideração que existe uma forte relação entre a melatonina, insulina e o metabolismo, é de suma importância estudar os efeitos da insulina e da melatonina sobre os distúrbios causados na ritmicidade de animais diabéticos, e se existe uma ação complementar dos dois hormônios, assim como avaliar a ação desses hormônios em animais tratados no início da doença.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o diabetes do tipo I causa ruptura do ritmo diário de temperatura corporal e severas alterações no ritmo de atividade motora, junto com uma diminuição significativa da temperatura e da atividade média; quando a doença é tratada, a insulina é capaz de restaurar o ritmo e reverter a hipotermia, porém não tem efeito no ritmo da atividade; a melatonina não restaura o ritmo nem reverte a hipotermia, mas restaura parcialmente o ritmo de atividade; o tratamento conjunto de insulina e melatonina restaura completamente os ritmos e a temperatura e a atividade média normal. Os tratamentos logo após o início da doença agem precocemente prevenindo os efeitos deletérios do diabetes sobre os ritmos. A melatonina atenua os efeitos deletérios e aumenta parcialmente a temperatura, porém não é suficiente para manter o ritmo normal, tendo uma ação mais importante sobre a atividade. A insulina e a melatonina agem de forma complementar, resultando em um tratamento mais eficiente, quando administrados tanto de forma precoce quanto tardia. Todos os tratamentos atuam de forma dependente da continuidade dos mesmos, sendo os tratamentos precoces mais eficientes que aqueles administrados quinze dias após interrupção.

## REFERÊNCIAS\*

- Abrams R, Hammel HT. Circadian variations in hypothalamic temperatures in unanesthetized rats. *Am J Physiol.* 1965;208:698-702.
- Aguzzi J, Bullock NM, Tosini G. Spontaneous internal desynchronization of locomotor activity and body temperature rhythms from plasma melatonin rhythm in rats exposed to constant dim light. *J Circadian Rhythms.* 2006;4:6.
- Alonso-Vale MI, Anhe GF, Borges-Silva C, Andreotti S, Peres SB, et al. Pinealectomy alters adipose tissue adaptability to fasting in rats. *Metabolism.* 2004a;53:500-6.
- Alonso-Vale MI, Borges-Silva CN, Anhe GF, Andreotti S, Machado MA, et al. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. *Horm Metab Res.* 2004b;36:474-9.
- Alonso-Vale MI, Adreotti S, Peres SB, Anhe GF, Borges-Silva C, Cipolla-Neto J, Lima FB. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am J Phys End Met.* 2005;288(4):805–12.
- Alonso-Vale MI, Adreotti S, Borges-Silva C, Mukai PY, Cipolla-Neto J, Lima FB. Intermittent and rhythmic exposure to melatonin in primary cultured adipocytes enhances the insulin and dexamethasone effects on leptin expression. *J Pin Res.* 2006;41(1):28–34.
- Alonso-Vale MI, Andreotti S, Mukai PY, Borges-Silva CN, Peres SB, Cipolla-Neto J, Lima FB. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pin Res.* 2008;45(4):422–29.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 2008;31(Suppl 1):S55-S60.
- Amaral F, Turati A, Barone M, Scialfa J, Buonfilgio D, Peres R, et al. Naughty hyperglycemia: diabetes and melatonin synthesis disruption. *J Clin Invest.* In press.
- Andersson AK, Sandler S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1 [beta]-induced damage of rodent pancreatic [beta]-cells. *J Pin Res.* 2001;30(3):157-65.
- Anhe GF, Caperuto LC, Pereira-da-Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso LA, et al. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J Neurochem.* 2004;90 (3):559–66.
- Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrin.* 1988;29:205-29.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. London, Chapman & Hall. 1995.

Armstrong SM, Redman J. Melatonin administration: Effects on rodent rhythms. In: Photoperiodism, Melatonin and the Pineal. In: Everett D, Clarck S, organizers. Ciba Foundation Symposium, 117. London, Pitman; 1985. p. 188-207.

Aschoff J, Gerecke U, Weaver R. Desynchronization of human circadian rhythms. *Jpn J Physiol.* 1967;17:450-7.

Barone MT, Menna-Barreto L. Diabetes and sleep: a complex cause-and-effect relationship. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;91(2):129-37.

Benstaali C, Mailloux A, Bogdan A, Auzéby A, Touitou Y. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle. *Life Sci.* 2001;68(24):2645-56.

Brown G, Grotta L, Niles L. Melatonin origin, control of circadian rhythm and site of action. *Adv Biosc.* 1981;29:193-6.

Cagnacci A, Elliott JA, Yen SS. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75: 447-52.

Cardinali DP. Melatonin: A mammalian pineal hormone. *Endocr Ver.* 1981;2: 327-46.

Cardinali DP, Jordá Catalá JJ, Sánchez Barceló EJ. Introducción a la Cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos. Ed. Universidad de Cantabria; 1994.

Cardinali DP, Vacas MI. Molecular endocrinology of melatonin receptor sites in brain and peripheral organs. *Adv Biosci.* 1981;29:237-46.

Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol & Behav.* 1986;36:1111-21.

Cassone VM, Roberts MH, Moore RY. Effects of melatonin on 2-deoxy(1-14C) glucose within the rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol.* 1988;255:R332-R37.

Castro Afeche S, Cipolla-Neto J. Fisiologia. In: Aires, MM. Ed. Guanabara Koogan Ltda. São Paulo, 2008. Capítulo 4.

Cipolla-Neto, J. Introdução ao Estudo da Cronobiologia. In: Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto LS, editores. Ícone. São Paulo. 1988. Capítulo 2.

Cosana. Benedito Silva. Brasil. Software.

Clement JG, Mills P, Brockway B. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. *J Pharm Met.* 1989;21:129-40.

De Castro JM. Diurnal rhythms of behavioral effects on core temperature. *Physiol Behav.* 1978;21:883-6.

Delaney CA, Dunger A, DiMatteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(12):2015-20.

do Carmo Buonfiglio D, Peliciari-Garcia RA, do Amaral FG, Peres R, Nogueira TC, et al. Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:7416-22.

El Temps. Diez-Noguera. Barcelona. España. Software.

Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9:25-53.

Garcia RAP, Afeche SC, Scialfa JH, Amaral FG, Santos SHJ, Lima FB, et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sciences.* 2008;82 (1–2):108–14.

Garcia RAP, Marçal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, Afeche SC, et al. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sciences.* 2010;87:169–74.

Gillette MU, Mitchell JW. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell and Tissue Research.* 2002;309 (1):99–107.

Goldman BD. The physiology of melatonin in mammals. *Pineal Res Rev.* 1983;1: 145-82.

Goncharova ND, Vengerin AA, Khavinson V, Lapin BA. Pineal peptides restore the age-related disturbances in hormonal functions of the pineal gland and the pancreas. *Exp Gerontol.* 2005;40:51-7.

GraphPad Prism 5. GraphPad Software.

Gubin DG, Gubin GD, Waterhouse J, Weinert D. The circadian body temperature rhythm in the elderly: effect of single daily melatonin dosing. *Chronobiol Int.* 2006;23:639-58.

Gül M, Emre S, Eşrefoğlu M, Vard N. Protective effects of melatonin and aminoguanidine on the cornea in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cornea.* 2008;27(7):795-801.

Hanneman SK. Measuring circadian temperature rhythm. *Biol Res Nurs.* 2001;2: 236-48.

- Hakim ZS, Patel BK, Goyal RK. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Pharmacol.* 1997;41:353-60.
- Harkin A, O'Donnell JM, Kelly JP. A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav.* 2002;77:65-77.
- Herichova I, Zeman M, Stebelova K, Ravingerova T. Effect of streptozotocin-induced diabetes on daily expression of *per2* and *dbp* in the heart and liver and melatonin rhythm in the pineal gland of wistar rat. *Mol Cell Biochem.* 2005;270:223-9.
- Honma S, Katsumno Y, Honma K. Light suppression of nocturnal pineal and plasma melatonin in rats depends on wavelength and time of day. *Neurosci Lett.* 1992;147:201-4.
- Howarth FC, Jacobson M, Naseer O, Adeghate E. Short-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol.* 2005a;90:237-45.
- Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol.* 2005b;90:827-35.
- Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E. Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33:327-31.
- Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Ljubisavljevic M, Adeghate E. Heart rate, body temperature and physical activity are variously affected during insulin treatment in alloxan-induced type 1 diabetic rat. *Physiol Res.* 2011;60:65-73.
- International Diabetes Federation. The Diabetes Atlas. Third Edition. Brussels: International Diabetes Federation. 2007.
- Karunanayake EH, Baker JR, Christian RA, Hearse DJ, Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (<sup>14</sup>C)-streptozotocin in the rat. *Diabetologia.* 1976;12:123-8.
- Katovich MJ, Marks KS, Sninsky CA. Effect of insulin on the altered thyroid function and adrenergic responsiveness in the diabetic rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993;71:568-75.
- Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009;10:261-70.
- Krauchi K, Cajochen C, Wirz-Justice A. A relationship between heat loss and sleepiness: effects of postural change and melatonin administration. *J Appl Physiol.* 1997;83:134-9.
- la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 2001a;50:1237-43.

la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, van der Vliet J, Buijs RM. Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.* 2001b;13:1025-32.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216-26.

Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SM, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJ, Carvalho CR, Cipolla-Neto J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Phys.* 1998;275(6 Pt 1):934-41.

Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(4):995-1000.

Lin MT, Chuang JI. Melatonin potentiates 5-HT(1A) receptor activation in rat hypothalamus and results in hypothermia. *J Pineal Res.* 2002;33:14-19.

Lund R. Personality factors and desynchronization of circadian rhythms. *Psychomon Med.* 1974;36:224-8.

Marques MD, Golombek D, Moreno C. Cronobiologia: Princípios e aplicações. In: Marques N, Menna-Barreto LS, editores. Ed. Fiocruz. São Paulo, 1997. Capítulo 3.

Marques N, Menna-Barreto LS. Cronobiologia: Princípios e aplicações. Ed. Edusp. 3ra ed. São Paulo, 2003.

Matsen ME, Thaler JP, Wisse BE, Guyenet SJ, Meek TH, et al. In uncontrolled diabetes, thyroid hormone and sympathetic activators induce thermogenesis without increasing glucose uptake in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304:E734-46.

McArthur A, Gillette M, Prosser P. Melatonin resets the rat suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. *Brain Res.* 1991;565:158-61.

Mendes C, Lopes AM, do Amaral FG, Peliciari-Garcia RA, Turati AD, Hirabara SM, Scialfa Falcão JH, Cipolla-Neto J. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *J Pineal Res.* 2013; doi:10.1111/jpi.12065.

Minors DS, Folkard S, Waterhouse JM. The shape of the endogenous circadian rhythm of rectal temperature in humans. *Chronobiol Int.* 1996;13:261-71.

Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, et al. Diabetic goto kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res.* 2006;40:135-43.

Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, et al. Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res.* 2007;42:350-8.

Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I, Ponicke K, Muhlbauer E. Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res.* 2008;45:439-48.

Pevet P. Environmental control of the annual reproductive cycle in mammals. Role of the pineal gland. *Comp Physiol Environm Adapt.* 1987;3:82-100.

Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res.* 2002a;172-7.

Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pin Res.* 2002b;33(3):156–60.

Pittendrigh CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp Q nat Biol.* 1960;25:159-84.

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chem other Rep.* 1963;29:91-108.

Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology.* 1999;140:1009-12.

Rebolledo OR, Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science.* 1983; 219:1089-91.

Refinetti R, Menaker M. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav.* 1992;51: 613-37.

Refinetti R. Phase relationship of the body temperature and locomotor activity rhythms in free-running and entrained rats. *Biol Rhythm Res.* 1997;28:19-24.

Refinetti R. Relationship between the daily rhythms of locomotor activity and body temperature in eight mammalian species. *Am J Physiol.* 1999;277:R1493-R1500.

Reiter RJ. Pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. *Psychoneuroendocrinology.* 1983;8:31-40.

\_\_\_\_\_. The melatonin message: Duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci.* 1987;40:2119-31.

Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. *J Hypertens Suppl.* 2009;27:S17-20.

Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science.* 1988;242:78-81.

Rodgers RL, Davidoff AJ, Mariani MJ. Cardiac function of the diabetic renovascular hypertensive rat: effects of insulin and thyroid hormone treatment. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991;69:346-54.



Rondeel JM, de Greef WJ, Heide R, Visser TJ. Hypothalamo-hypophysial-thyroid axis in streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*. 1992;130: 216-20.

Scheer FA, Pirovano C, Van Someren EJ, Buijs RM. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience*. 2005;132:465-77.

Schroder-van der Elst JP, van der Heide D. Effects of streptozocin-induced diabetes and food restriction on quantities and source of T4 and T3 in rat tissues. *Diabetes*. 1992;41:147-52.

Sochor M, Baquer NZ, Ball MR, McLean P. Regulation of enzymes of glucose metabolism and lipogenesis in diabetic rat liver by thyroid hormones. *Biochem Int*. 1987;15:619-27.

Sundaresan PR, Sharma VK, Gingold SI, Banerjee SP. Decreased beta-adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology*. 1984;114:1358-63.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50:537-46.

Tjälve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol*. 1976;69:455-6.

Tutuncu NB, Batur MK, Yildirim A, Tutuncu T, Deger A, Koray Z. Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. *J Pineal Res*. 2005;39:43-9.

Vanecek J, Pavlik A, Illenerová H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*. 1987;435:359-62.

Vollrath L. *The Pineal Organ*. Berlin, Springer. 1981.

Wever R. Phase-shifts of human circadian rhythms due to shifts of artificial zeitgebers. *Chronobiologia*. 1980;7:303-27.

Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, et al. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology*. 2000;141:487-97.

Yang YL, Shen ZL, Tang Y, Wang N, Sun B. Simultaneous telemetric analyzing of the temporal relationship for the changes of the circadian rhythms of brown adipose tissue thermogenesis and core temperature in the rat. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2011;27: 348-52.

Zanuto R, Siqueira-Filho MA, Caperuto LC, Bacurau RF, Hirata E, Peliciari-Garcia RA, et al. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. *J Pineal Res*. 2013;doi:10.1111/jpi.

Zhang L, Parratt JR, Beastall GH, Pyne NJ, Furman BL. Streptozotocin diabetes protects against arrhythmias in rat isolated hearts: role of hypothyroidism. *Eur J Pharmacol.* 2002;435:269-76.